

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und
Buttersäure-bildenden Bakterien aus Biogasanlagen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Katharina Gabriela Cibis

geboren am 19. Juni 1987 in Worms

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 2015

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biogasanlagen: Gewinnung von Energie und Forschungsschwerpunkt	1
1.2 Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen	4
1.3 Aufbau und Betrieb von Biogasanlagen	8
1.4 Substrate für den Betrieb von Biogasanlagen	12
1.5 Mikrobielle Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure	13
1.6 Ziele der Arbeit	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Gase	25
2.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits	27
2.3 Geräte und Hilfsmittel	28
2.4 Verbrauchsmaterialien	30
2.5 Mikrobiologische Methoden	31
2.5.1 <i>Organismen</i>	31
2.5.2 <i>Untersuchte Biogasanlagen</i>	31
2.5.3 <i>Nährmedien zur Isolierung und Kultivierung von Säure-bildenden Bakterien</i>	33
2.5.4 <i>Methoden zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien</i>	37
2.5.5 <i>Physiologische Charakterisierung der Isolate</i>	39
2.6 Analytische Methode: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	41
2.7 Molekularbiologische Methoden	42
2.7.1 <i>DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Biogasanlagen</i>	42
2.7.2 <i>Amplifizierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens</i>	42
2.7.3 <i>Agarosegelelektrophorese</i>	43
2.7.4 <i>Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA-Sequenz</i>	44
2.7.5 <i>Vergleich der Isolate mittels Restriktionsverdau</i>	45
2.7.6 <i>Vergleich der Isolate mittels SAPD-PCR</i>	45
2.7.7 <i>Phylogenetische Untersuchung der Isolate</i>	46
2.7.8 <i>Entwicklung Isolat-spezifischer Primer</i>	47

2.7.9	<i>Titerbestimmung der Isolate in Biogasanlagen mittels qPCR</i>	51
2.7.10	<i>Manuelle Annotation des Genoms von dem Isolat <i>Defluviitoga tunisiensis</i> L3</i>	54
3.	Ergebnisse	56
3.1	Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildende Bakterienisolate	56
3.1.1	<i>Säure-bildende Isolate aus einer thermophilen Biogasanlage</i>	56
3.1.2	<i>Säure-bildende Isolate aus mesophilen Biogasanlagen</i>	59
3.1.3	<i>Säure-bildende Isolate aus Hochdruck-Biogas-Laborfermentern</i>	62
3.1.4	<i>Phylogenetische Analyse der erhaltenen Isolate</i>	64
3.2	Physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate	67
3.3	Überprüfung der Primerspezifität	71
3.4	Titer der Isolate in den untersuchten Biogasanlagen	74
3.5	Kohlenhydrat-Verwertung durch das Isolat <i>Defluviitoga tunisiensis</i> L3	78
4.	Diskussion	84
4.1	Säure-bildende Isolate in Biogasanlagen	84
4.2	Identifizierung und Phylogenie der Säure-bildenden Isolate	86
4.3	Bedeutung der Säure-bildenden Isolate in Biogasanlagen	88
4.4	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> : ein Schlüsselbakterium im anaeroben Abbau?	101
4.5	Ausblick	103
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literatur	108
7.	Anhang	119
7.1	Substratverwertungsversuche	119
7.2	Quantifizierung der Isolate mittels qPCR	124
8.	Eidesstattliche Erklärung	127
9.	Danksagungen	128
10.	Lebenslauf	129

Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absatz
ALB	Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e.V.
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Biogasanlage
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
bp	Basenpaare
ca.	Circa
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld
CoA	Coenzym A
COG	Cluster of Orthologous Groups of Proteins
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ΔG^0	Freie Energie unter biochemischen Standardbedingungen
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (engl. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC-Nummern	Numerisches Klassifikationssystem für Enzyme (engl. Enzyme Commission number)
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FP	Flüssigpumpe
G	Gerste
GS	Grassilage
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
LRW	Langachsrührwerk
MS	Maissilage
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RG	Rindergülle
RM	Fester Rindermist
SG	Schweinegülle
<i>T.</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i>
<i>Tepid.</i>	<i>Tepidanaerobacter</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMRW	Tauchmotorrührwerk
TS	Trockensubstanz
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
VFA	Leicht flüchtige Fettsäuren (engl. volatile fatty acids)
vgl.	Vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Biogasanlagen: Gewinnung von Energie und Forschungsschwerpunkt

Als zentrale Säule der Energiewende sollen die erneuerbaren Energien in der Bundesrepublik Deutschland ausgebaut werden, wodurch die Unabhängigkeit von knapper werdenden, fossilen Ressourcen verbessert und eine klimaverträglichere Stromversorgung sichergestellt werden sollen (BMW, 2015a). Bereits im Jahr 2000 wurde durch die Bundesregierung das Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) zur Förderung erneuerbarer Energien verabschiedet, welches in den vergangenen Jahren häufiger überarbeitet wurde und dessen letzte Reform am 1. August 2014 in Kraft getreten ist. Gemäß § 5 Abs. 14 EEG werden Wasserkraft, Windenergie, solare Strahlungsenergie, Geothermie und Energie aus Biomasse als erneuerbare Energien bezeichnet. Zu Energiequellen, welche aus Biomasse gewonnen werden, zählen hierbei Biogas, Biomethan, Deponiegas, Klärgas und biologisch abbaubare Anteile aus Haushalts- und Industrieabfall. Durch das EEG sollen eine nachhaltige Entwicklung der Energieversorgung ermöglicht und die volkswirtschaftlichen Kosten der Energieversorgung reduziert werden. Weitere Ziele sind die Schonung fossiler Energieressourcen sowie die Förderung zur Weiterentwicklung von Technologien zur Stromerzeugung mittels erneuerbarer Energien (§ 1 Abs. 1 EEG). Im Jahr 2014 hatte die Energie aus Biomasse einen Anteil von 6,9 % an der Bruttostromerzeugung in Deutschland. Der Anteil aller erneuerbarer Energien insgesamt betrug 25,8 % (Abbildung 1.1a; BMW, 2015b). In den nächsten Jahren soll nach § 1 Abs. 2 EEG der Anteil der erneuerbaren Energien stetig und kosteneffizient erhöht werden. Es ist geplant, die erneuerbaren Energien bis zum Jahr 2025 auf 40 - 45 %, bis zum Jahr 2035 auf 55 - 60 % und bis zum Jahr 2050 auf mindestens 80 % zu erhöhen. Wie aus Abbildung 1.1b deutlich wird, hat die Entwicklung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien in Deutschland seit Inkrafttreten des EEG im Jahr 2000 stark zugenommen. Vor allem ist eine Zunahme der Stromerzeugung durch Windenergie, Biomasse und Photovoltaik zu beobachten (BMW, 2015c). In Deutschland gab es im Jahr 2014 knapp 8000 Biogasanlagen (Fachverband Biogas, 2015). In Biogasanlagen wird unter anaeroben Bedingungen erneuerbare Biomasse durch eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft zu energiereichem Biogas umgesetzt. Zur technischen Biogasgewinnung werden hierbei mikrobiologische Prozesse nutzbar gemacht, wie sie schon seit langem aus natürlichen Habitaten bekannt sind. Als erste beschrieben Robert Boyle und Denis Papin im Jahr 1682 die Bildung von Gas bei der Zersetzung von pflanzlichen und tierischen Bestandteilen (Braun, 2007). Alessandro Volta berichtete im Jahr

1776 über Versuche mit Sumpfgas am Lago Maggiore und über die Entdeckung dieser „entzündlichen Luft“. In Explosionsversuchen beobachtete er, dass das Sumpfgas einen höheren Brennwert aufwies als Wasserstoff (Schink, 1989).

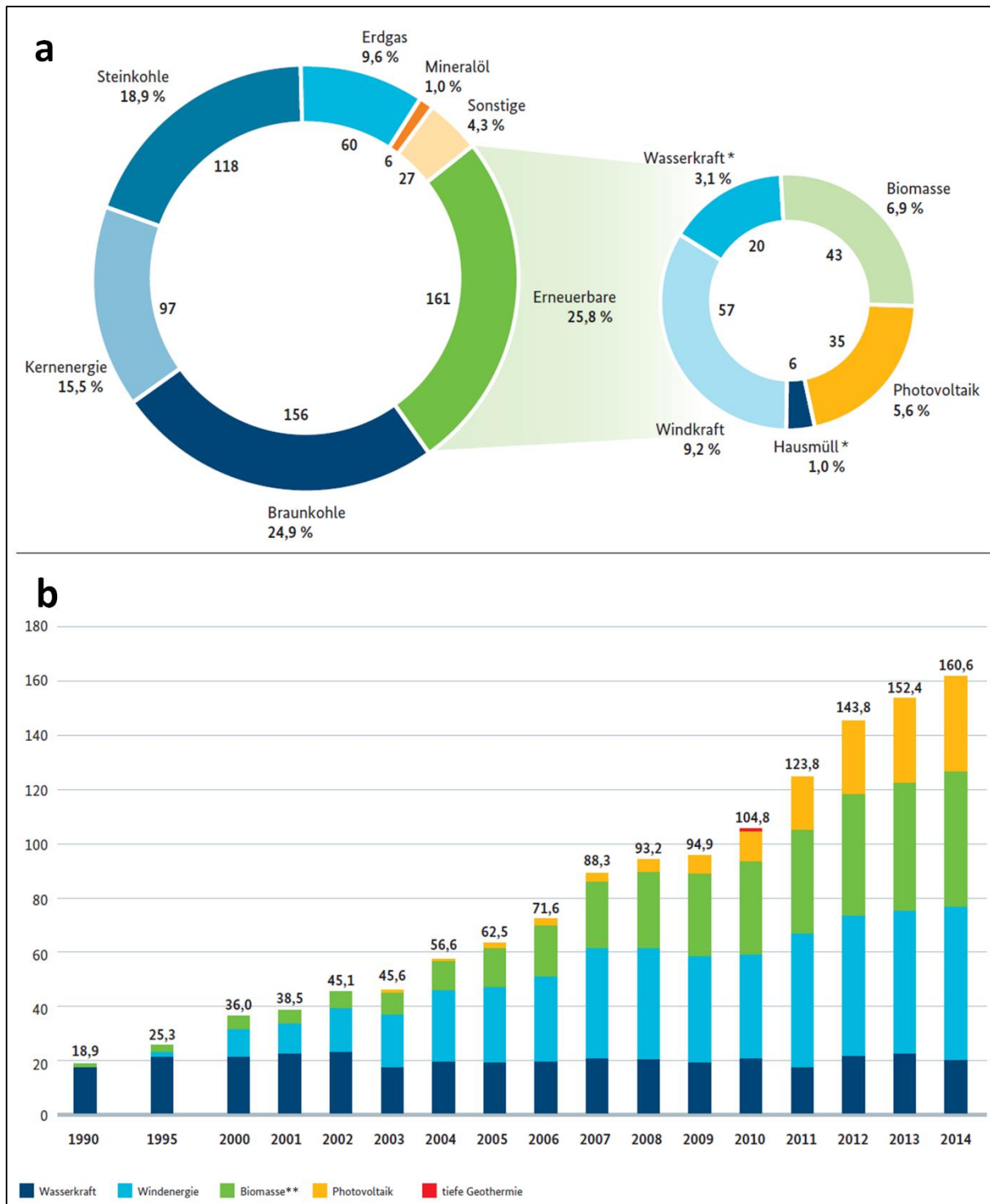


Abbildung 1.1: Bruttostromerzeugung in der Bundesrepublik Deutschland. (a) Anteil verschiedener Energieträger an der Gesamtbruttostromerzeugung im Jahr 2014; (b) Entwicklung der Bruttostromerzeugung aus erneuerbaren Energien zwischen 1990 - 2014. Wegen geringer Strommengen ist die geothermische Stromerzeugung nicht gezeigt. * regenerativer Anteil, ** hierzu zählen feste und flüssige Biomasse, Biogas, Biomethan, Klär- und Deponiegas und biogener Anteil des Abfalls. Ab 2013 wird auch Klärschlamm dazugezählt. Verändert nach BMWi (2015b, 2015c).

Methanbildung unter anaeroben oder sauerstofflimitierten Bedingungen ist auch bekannt aus marinen Sedimenten, Süßwassersedimenten, Reisfeldern, Pansen von Rindern sowie dem Darm von Menschen und Termiten (Liu und Whitman, 2008). Beim anaeroben Abbau von Biomasse entsteht energiereiches Methan, welches den Hauptanteil des Biogases ausmacht. Es wird aus organischem Material in Habitaten gebildet, in welchen Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, Eisen(III) oder Sulfat limitiert sind. Methanogene Archaeen können zur Energiegewinnung Fermentationsprodukte wie Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, Acetat, Methanol oder Methylamine in Methan umwandeln. Die Gewinnung von Biogas aus organischer Masse ist technisch interessant, da neben der Energiegewinnung auch die Gärrückstände als Dünger auf landwirtschaftlichen Nutzflächen verwendet werden können. Es gibt verschiedene Substrate, welche zur Biogasgewinnung eingesetzt werden. In landwirtschaftlichen Biogasanlagen kommen häufig nachwachsende Rohstoffe (NawaRo) wie Mais oder Zuckerrüben sowie Wirtschaftsdünger (Schweine- und Rindergülle) zum Einsatz. Aber auch biologisch abbaubare Abfälle aus Haushalten (Bioabfall, Speisereste) und aus der Industrie werden in Deponien als Substrate verwendet. In Kläranlagen wird meist Klärschlamm in Faultürmen vergoren (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

In der Vergangenheit gab es viele Untersuchungen zum anaeroben Abbau organischer Biomasse in Biogasanlagen und Laborfermentern. Hierbei konzentrierten sich die meisten Studien auf kultivierungsunabhängige Methoden (z. B. molekularbiologische Analysen). In Metagenomstudien mit Gesamt-DNA aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurden beispielsweise die bakterielle und archaeelle Biodiversität und die Übereinstimmungen mit den COG (Cluster of Orthologous Groups of Proteins)-Kategorien via 454-Pyrosequenzierung untersucht (Schlüter *et al.*, 2008). Weiterhin gab es Studien mit Klonbibliotheken und DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)-Analysen mit extrahierter DNA aus Biogasanlagen (Kröber *et al.*, 2009, Röske *et al.*, 2014). Neben Studien zur mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen gab es auch viele Untersuchungen mit Laborfermentern, welche ein Inokulum einer Biogasanlage beinhalteten. In diesen Studien wurde meist der Effekt verschiedener Parameter (z. B. Temperatur, Inputstoffe) untersucht und mit den genannten molekularbiologischen Studien verglichen. Mit diesen Laborexperimenten wurden Aussagen über dominante Gruppen unter den gewählten Bedingungen gemacht (Wagner *et al.*, 2013). Es zeigte sich aber auch, dass die mikrobiellen Biozöosen in Biogasanlagen zu einem Großteil noch unbekannt sind, weshalb sie häufig als „black box“ bezeichnet werden (Collins *et al.*, 2006). Es existieren nur wenige Berichte über kulturabhängige Studien, speziell über die Isolierung von Bakterien aus landschaftlichen Biogasanlagen, obwohl viele Sequenzen molekularbiologi-

scher Methoden aufgrund mangelnder Referenzdaten nicht zugeordnet werden können. Beispielsweise isolierten Koeck *et al.* (2014b) Stämme von *Clostridium thermocellum*, Hahnke *et al.* (2014) die neue Art *Clostridium bornimense* und Stantscheff *et al.* (2014) methanogene Archaeen aus Biogasanlagen oder Laborfermentern. Großer Forschungsbedarf besteht noch in Hinblick auf die Bildung und den Abbau organischer Säuren durch Mikroorganismen.

Beim anaeroben Abbau organischer Masse zu Biogas kommt es zur Bildung von leicht flüchtigen Fettsäuren (VFA, volatile fatty acids), zu denen Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure zählen. Mengenmäßig kommen Essigsäure und Propionsäure am häufigsten in Biogasanlagen vor. Hierbei sollte die Konzentration von Essigsäure unterhalb von 3000 mg/l liegen, die von Propionsäure unterhalb von 1000 mg/l und die von iso-Buttersäure unterhalb von 500 mg/l. Optimal ist ein Verhältnis zwischen Essigsäure und Propionsäure von 2:1 (Kaiser *et al.*, 2008). Während Essigsäure ein wichtiges Substrat der Methanogenese ist, können Propionsäure und Buttersäure bei Anreicherung in Reaktoren zu Störungen führen. Die leicht flüchtigen Fettsäuren, vor allem Propionsäure, Buttersäure oder iso-Buttersäure, werden auch als gute Indikatoren für Prozessstörungen in anaeroben Fermentern vorgeschlagen (Ahring *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 2007). Gründe für Störungen des anaeroben Abbaus können Überladung des Fermenters mit organischem, leicht abbaubarem Substrat, inorganische oder organische Toxine sowie Temperatur- oder Substratwechsel sein (Ahring *et al.*, 1995). Der Hauptgrund für die toxische Wirkung hoher Konzentrationen an leicht flüchtigen Fettsäuren ist der Abfall des pH-Wertes im Fermenter, welcher das Wachstum verschiedener, am anaeroben Abbau beteiligter Organismengruppen hemmen kann.

1.2 Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen

In Biogasanlagen setzt eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft organische Masse unter anaeroben Bedingungen stufenweise zu Biogas um. Der Prozess der Biogasbildung kann in vier sukzessive Schritte eingeteilt werden, an denen verschiedene Gruppen von Mikroorganismen die jeweiligen Produkte der vorigen Stufe weiter verwerten. In vielen Fermentern laufen die Vorgänge des anaeroben Abbaus parallel ab (zeitlich und räumlich). Ziel des anaeroben Abbaus in Biogasanlagen ist die Bildung von Biogas, welches nach einer Aufbereitung in das Erdgasnetz oder nach Verbrennung in Blockheizkraftwerken ins Stromnetz eingespeist werden kann. Die Zusammensetzung von Biogas variiert und ist abhängig von Substrat, Anlagensystem, Temperatur, Verweilzeit und Raumbelastung. Grundsätzlich setzt sich Biogas folgen-

dermaßen zusammen: 50 - 75 % Methan, 25 - 45 % Kohlenstoffdioxid, 2 - 7 % Wasser, 0 - 2 % Stickstoff, 0 - 1 % Wasserstoff, 0 - 2 % Sauerstoff und 0 - 2 % Schwefelwasserstoff (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

Die mikrobiologischen Prozesse des anaeroben Abbaus können in folgende vier Stufen eingeteilt werden: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese (Abbildung 1.2).

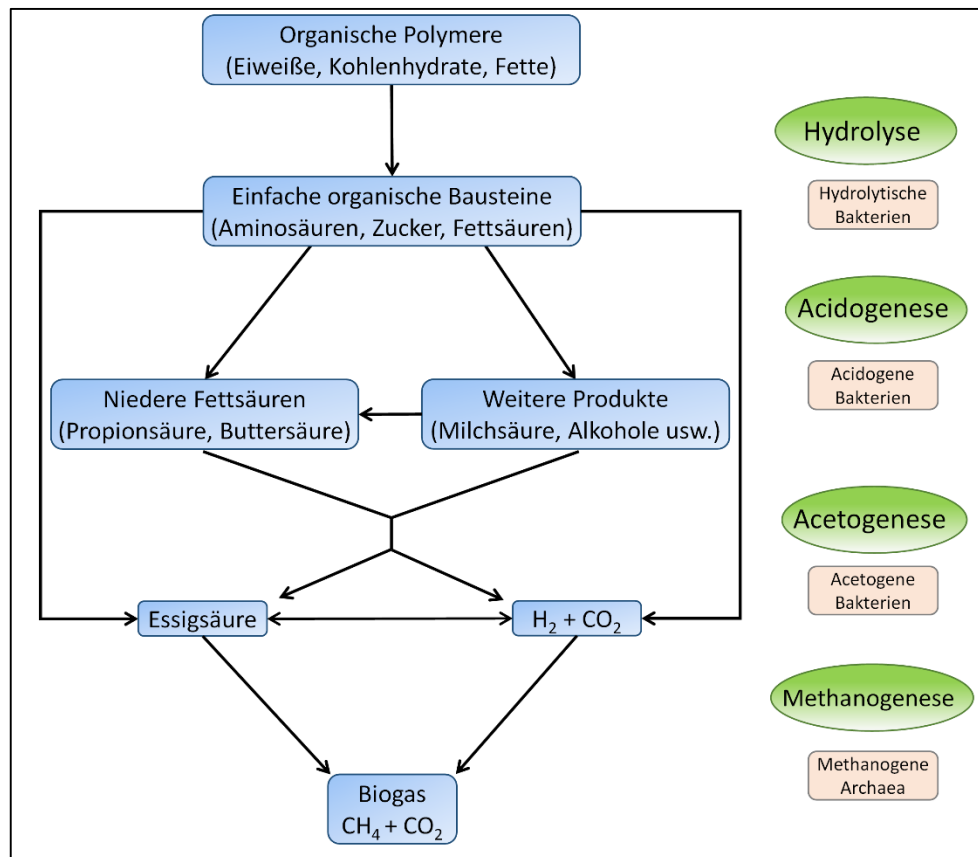


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des anaeroben, mikrobiellen Abbaus von organischen Polymeren zu Biogas. Berücksichtigt sind die wichtigsten Substrate, Stoffwechselflüsse und beteiligten Mikroorganismengruppen.

Hydrolyse

In der ersten Abbaustufe, der Hydrolyse, werden organische Polymere (Kohlenhydrate, Fette und Proteine) mit Wasser in niedermolekulare Verbindungen gespalten (Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren). Hierfür setzen die Bakterien hydrolytische Enzyme frei, beispielsweise Cellulasen, Cellobiasen, Xylanasen, Amylasen, Lipasen und Proteasen (Weiland, 2010; Merlin Christy *et al.*, 2014). Hydrolytische Bakterien sitzen meist an der Oberfläche von festen Substratbestandteilen (z. B. Pflanzenfasern) und exkretieren die genannten Enzyme. Die durch Enzymaktivität freigesetzten Oligo- und Monomere können anschließend durch die hydrolytischen Bakterien selbst oder durch andere Bakterien weiter umgesetzt werden. An der Hydrolyse sind beispielsweise Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*,

Fusobacterium, *Selenomonas* und *Streptococcus* beteiligt (Merlin Christy *et al.*, 2014). Cirne *et al.* (2007) beschreiben in ihrer Arbeit *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fervidobacterium*, *Spirochaeta*, *Thermotoga*, *Fibrobacter* und *Ruminococcus* als anaerobe cellulolytische Bakterien. Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Clostridium* und *Bacteroides* konnten mehrfach durch molekularbiologische Studien in Biogasanlagen nachgewiesen werden (Krause *et al.*, 2008; Schlüter *et al.*, 2008). Der Abbau von Cellulose, Hemicellulose und Lignin, welche Bestandteile von Pflanzen sind, wird als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in Biogasanlagen beschrieben, da diese Substanzen nur langsam abgebaut werden (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007; Merlin Christy *et al.*, 2014).

Acidogenese

Die bei der Hydrolyse entstehenden einfachen organischen Bestandteile wie Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren werden in der zweiten Stufe, der Acidogenese, weiter in niedermolekulare organische Säuren und Alkohole umgesetzt. Hierbei kann das bei mikrobiellen Gärungen während der Glycolyse entstehende Pyruvat je nach Organismus zu leicht flüchtigen Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure), anderen organischen Säuren (Ameisensäure, Milchsäure, Bernsteinsäure), Alkoholen (z. B. Ethanol), Ketonen oder Aldehyden umgesetzt werden. Beim Abbau von Aminosäuren und Fettsäuren können durch reduktive Desaminierungen, spezifische fermentative Stoffwechselwege oder durch die Sticklandreaktion kurzkettenförmige, leicht flüchtige Fettsäuren (C2 - C5) entstehen. Weiterhin werden bei mikrobiellen Gärungen auch die Gase Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet. Mit der Bildung von Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff entstehen somit schon während der Acidogenese wichtige Substrate für die Methanogenese. Aus schwefel- oder stickstoffreichen Verbindungen können während des anaeroben Abbaus Schwefelwasserstoff und Ammoniak gebildet werden, welche in hohen Konzentrationen schädlich für Menschen, Umwelt und den Prozess der Biogasbildung sein können. Dies kann verstärkt in Anlagen auftreten, welche mit proteinreichen (z. B. Klee gras) oder fettreichen (z. B. Rapsöl) Substraten gefüttert werden. Vertreter der acidogenen Stufe des anaeroben Abbaus sind beispielsweise *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* und *Bacteroides* (ALB, 2010; Merlin Christy *et al.*, 2014). Auf die mikrobielle Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus verschiedenen Substraten wird in Abschnitt 1.5 näher eingegangen.

Acetogenese

Die dritte Abbaustufe wird als Acetogenese bezeichnet, in welcher die niedermolekularen organischen Säuren und Alkohole der Acidogenese weiter zu Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut werden. Hauptsächlich werden diese Reaktionen von strikt anaero-

ben und langsam wachsenden syntrophen Bakterien, sogenannten sekundären Gärern, durchgeführt. Die Reaktionen des Abbaus leicht flüchtiger Fettsäuren sind endergon und können nur durch die Entfernung eines Produktes (Wasserstoff oder Essigsäure) durch andere Organismen exergon werden und damit zu einem geringen Energiegewinn führen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Wasserstoff in Wasser steigt die Wasserstoffkonzentration in der Umgebung der syntrophen Bakterien schnell an. Dies resultiert in einer Endprodukthemmung, welche den Stoffwechsel der sekundären Gärer inhibiert. Hydrogenotrophe Archaeen können den Wasserstoff zur Methanbildung verwerten, weshalb beide Gruppen nahe beieinander wachsen. Da bei dieser Symbiose Elektronen in Form von Wasserstoff zwischen zwei unterschiedlichen Mikroorganismen übertragen werden, wird dies auch als „Inter-Spezies-Elektronentransfer“ bezeichnet (ALB, 2010). Im Allgemeinen sind Vertreter syntropher Bakterien *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora*, *Syntrophus*, *Propionibacter*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Thermoanaerobium*, *Pelotobacter*, *Smithella* und *Clostridium* (Bauer *et al.*, 2009). In Propionsäure-abbauenden Anreicherungskulturen aus Biogasanlagen konnten *Pelotomaculum* sp., *Syntrophobacter sulfatireducens* und *Candidatus „Cloacamonas“* sp. als Schlüsselspezies identifiziert werden (Ahlert, 2015). Neben den syntrophen Bakterien sind aus der Literatur auch Sulfatreduzierer (z. B. *Desulfotomaculum* sp.) bekannt, welche in der Lage sind, Propionsäure oder Milchsäure ohne einen symbiontischen Partner abzubauen. *Syntrophobacter pfennigii* kann mit Sulfat als externen Elektronenakzeptor Propionsäure oder Milchsäure in Reinkultur abbauen (Wallrabenstein *et al.*, 1995). *Desulfatirhabdium butyrativorans* ist ein weiterer Sulfatreduzierer, welcher aus einem anaeroben Bioreaktor isoliert wurde und in Anwesenheit von Sulfat Propionsäure und Buttersäure verwerten konnte (Balk *et al.*, 2008). Als dritte Gruppe können homoacetogene Bakterien genannt werden, welche Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu Essigsäure umsetzen können. Als Beispiele können hier *Acetobacterium woodii* und *Clostridium aceticum* genannt werden (Gottschalk, 1979; Braun *et al.*, 1981).

Methanogenese

In der letzten Stufe der anaeroben Abbaukette, der Methanogenese, bilden methanogene Archaeen Methan. Während Mikroorganismen der ersten drei Abbaustufen zu der Domäne Bacteria zählen, gehören die methanogenen Organismen der Domäne der Archaea an. Methanogene Archaeen sind strikt anaerob und wachsen im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (pH 6,8 - 7,5). Nach ihren Reaktionswegen der Methanogenese und den dabei verwerteten Substraten werden drei Gruppen unterschieden. Hydrogenotrophe Archaeen reduzieren Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu Methan und Wasser (*Methanobacterium formicicum*, *Me-*

thanoculleus bourgensis, *Methanobacterium bryantii*, *Methanothermobacter wolfeii*). Die meisten hydrogenotrophen Archaeen können neben Wasserstoff auch Formiat als Elektronendonator nutzen (Merlin Christy *et al.*, 2014). Bei der acetoklastischen Methanogenese wird Acetat zu Methan und Kohlenstoffdioxid abgebaut. Ein Beispielorganismus hierfür ist *Methanoseta* (Weiland, 2010). Bei der methylo trophen Methanogenese können Methanol oder methylierte Substanzen zur Methanbildung genutzt werden (z. B. *Methanosarcina* sp.; Borrel, *et al.*, 2013).

1.3 Aufbau und Betrieb von Biogasanlagen

Der anaerobe Abbau von organischem Material zu Biogas durch Mikroorganismen kann in Biogasanlagen zur industriellen Gewinnung von Energie genutzt werden. Bereits die Fermenterbauform und Prozessparameter wie Temperatur, Art der Durchmischung des Fermenterinhalt, Verweilzeit und Raumbelastung haben einen großen Einfluss auf die mikrobielle Biozönose. Der anaerobe Abbau kann in Biogasanlagen unter mesophilen (32 - 42 °C) oder thermophilen (50 - 57 °C) Bedingungen ablaufen. Thermophile Anlagen weisen in der Regel eine geringere Biodiversität sowie höhere Umsatzraten und kürzere hydraulische Verweilzeiten der Substrate auf. Da die meisten bekannten Bakterien und methanogenen Archaeen ein Wachstumsoptimum im mesophilen Bereich besitzen, wird die Mehrheit der Anlagen mesophil betrieben (Kaiser *et al.*, 2008). In Bezug auf die Verweildauer und Menge der Substrate in Biogasanlagen werden zwei wichtige Parameter beschrieben: Unter der hydraulischen Verweilzeit wird die durchschnittliche Zeit des Aufenthalts von Substrat im Fermenter verstanden. Demgegenüber zeigt die Raumbelastung an, wieviel organische Trockensubstanz dem Fermentervolumen in einer bestimmten Zeit zugeführt wird. In der Regel kann mit längeren Verweilzeiten eine erhöhte Abbauleistung und Gasbildung erzielt werden. Bei einer schnellen Substratzufuhr besteht die Gefahr der Übersäuerung des Fermenters (Ahring *et al.*, 1995; Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Des Weiteren hat auch die Art der Durchmischung einen Einfluss auf die Biogasbildung. Die Notwendigkeit des Durchmischens besteht darin, den Kontakt zwischen Substrat und Mikroorganismen zu verstärken und Temperatur- und Konzentrationsunterschiede im Gärsubstrat auszugleichen. Weiterhin werden dadurch Schicht- und Schwimmdeckenbildung im Fermenter vermieden. Allerdings sollte die Durchmischung durch langsam rotierende Rührwerke erfolgen, damit symbiontisch lebende Mikroorganismen (acetogene Bakterien und methanogene Archaeen) nicht voneinander getrennt werden. Der Prozess der Biogasbildung in Biogasanlagen kann in vier verschiedene Verfah-

rensschritte (Abbildung 1.3) eingeteilt werden. Biogasanlagentechnik, Substratwahl und Betriebsführung lassen viele unterschiedliche Konstellationen und Varianten zu. Daher wird im Folgenden die Gewinnung von Biogas anhand der beiden Anlagentypen samt Prozessparametern vorgestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien beprobt wurden.

Bis zu ihrem Eintrag in die Biogasanlage müssen die eingesetzten Substrate aufbereitet und gelagert werden. Eine Zerkleinerung der Substrate führt zu einer Vergrößerung der Oberfläche und aufgrund der größeren Angriffsfläche zu einer Beschleunigung des Abbauprozess durch Mikroorganismen. Zusätzlich wird einer Verstopfung von Rohren und einer Sedimentation der Feststoffe im Fermenter entgegengewirkt. Für einen effektiven Abbauprozess ist eine kontinuierliche Fermenterbeschickung mit einer ähnlichen Substratzusammensetzung vorteilhaft, damit die Mikroorganismen nicht ständig wechselnden Milieubedingungen ausgesetzt werden. Nach der Zerkleinerung des Pflanzenmaterials wird dieses bei der Silierung durch die Aktivität von Milchsäurebakterien unter Ausschluss von Sauerstoff angesäuert und dadurch konserviert. Ein weiterer Vorteil der Silage-Herstellung besteht in der Erhaltung energiereicher Bestandteile der Substrate, indem eine aerobe Oxidation vermieden wird.

Die beprobten Biogasanlagen verfügten über ein Nassvergärungsverfahren, bei welchem die Fermenterflüssigkeit bis zu 12 % Trockensubstanzgehalte aufweisen darf. Die Beschickung der Fermenter erfolgte kontinuierlich mit Gülle (Rinder- oder Schweinegülle) als Stickstoffquelle und den jeweils verwendeten festen Substraten (hauptsächlich Maissilage) über Dosierstationen mit Förderschnecken und Pumpen (Abbildung 1.3a). Vor der Einbringung wurden oft auch feste und flüssige Substrate gemischt und zusammen in den Fermenter eingebracht. Das C/N(Kohlenstoff/Stickstoff)-Verhältnis sollte hierbei zwischen 15 und 30 liegen (Weiland, 2010).

Die in dieser Arbeit untersuchten Biogasanlagen unterschieden sich hinsichtlich der oben genannten Parameter. Die mesophilen Biogasanlagen wiesen ein zweistufiges Anlagensystem auf, wie es in Abbildung 1.3b1 dargestellt ist (vgl. Tabelle 2.2, Abschnitt 2.5.2). Diese Anlagenart ist in Deutschland weit verbreitet. Das in den Fermenter eingebrachte Substrat wird mesophil (32 - 42 °C) vergoren. Die Durchmischung der Substrate erfolgt durch Langachs-rührwerke oder Tauchmotorrührwerke. Nach einer Verweilzeit von 60 - 150 Tagen im Fermenter wird das Substrat in einen Nachgärer geleitet, in dem schwer umsetzbare Substanzen weiter vergoren werden. Mit Hilfe eines Nachgärers kann der Gesamtmethanertrag gesteigert werden.

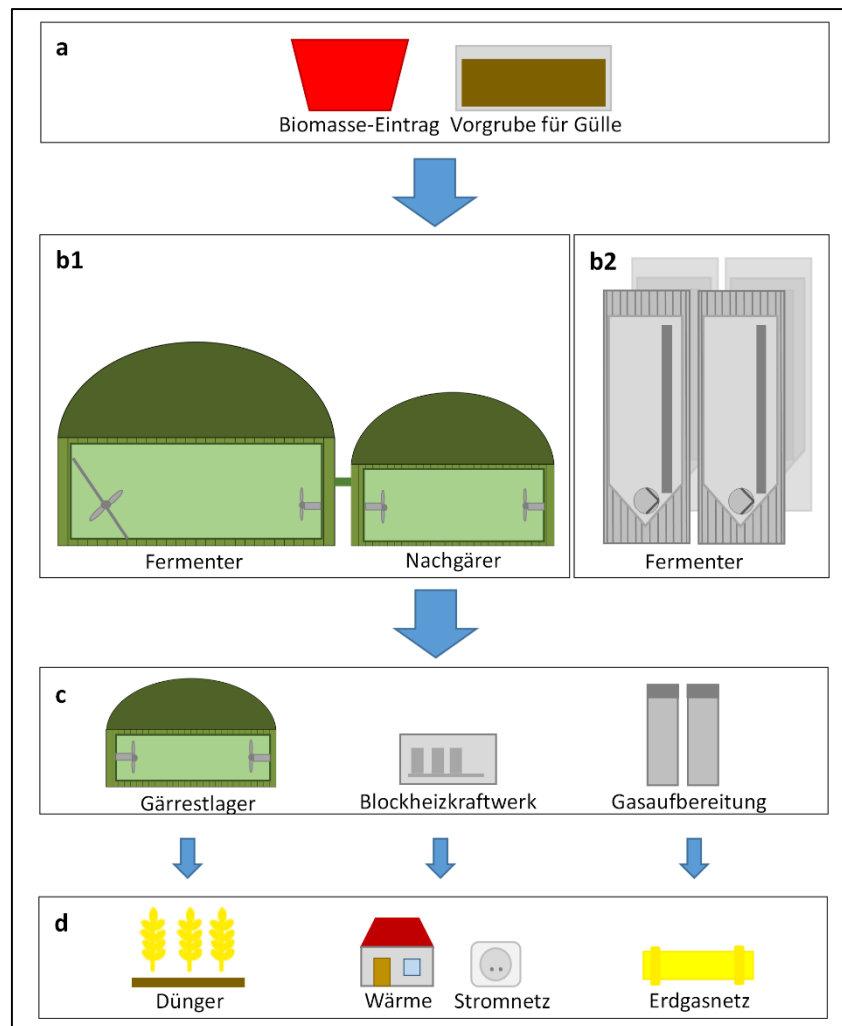


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der einzelnen Verfahrensschritte und Biogasanlantypen zur Biogasgewinnung. Flüssige und feste Inputstoffe (a) werden in mesophile (b1) oder thermophile (b2) Biogasanlagen befördert und dort mikrobiell zu Biogas abgebaut. Entstehendes Biogas kann in einem Blockheizkraftwerk verbrannt und ins Stromnetz eingespeist werden. Die entstehende Wärme kann zur Beheizung genutzt werden. Des Weiteren kann das Biogas aufbereitet und dem Erdgasnetz zugeführt werden. Das vergorene Substrat kann in ein Gärrestlager überführt und auf landwirtschaftliche Nutzflächen aufgebracht werden (c und d).

Im Vergleich zu den mesophilen Biogasanlagen besaß die thermophile (54 °C) Biogasanlage eine andere Fermenterbauform und Anlagentechnik (Abbildung 1.3b2). Durch eine siloformige Fermenterbauform nehmen sie nur wenig Platz in Anspruch. Die Durchmischung der Substrate erfolgt über eine Pumpe, wodurch zusätzlich eine Schwimmdeckenbildung vermieden wird. Hierbei wird das Substrat über eine Fermentersteigleitung dem Gärraum im oberen Teil wieder zugeführt. Ein Rührwerk ist in diesem Fermenter somit nicht erforderlich. In einem konusförmig-vertieften Boden des Gärraums können sich Steine und nicht abbaubare feste Materialien ansammeln, welche dort abgesaugt werden können. Diese Fermenterbauweise besitzt ein Hydrolyserohr, in welchem das Substrat ein bis zwei Stunden verbleibt und von der

nächsten Fütterungscharge in den Gärraum gedrückt wird. Der Vorteil besteht darin, dass die Hydrolyse innerhalb des Fermenters, aber in einem separaten Raum (Hydrolyserohr) stattfindet. Dadurch wird das Substrat vom restlichen Fermenter vorgewärmt und der Abbau beschleunigt. Die Verweilzeit in diesem Anlagentyp ist mit 28 Tagen viel kürzer als in den mesophilen Anlagen.

Generell kann die Speicherung des gebildeten Biogases im Fermenter selbst stattfinden, beispielsweise durch Einsatz von Folienhauben (Abbildung 1.3b1). Bei dieser Speicherart wird die Folie gasdicht an der Oberkante des Fermenters aufgebracht, worunter ein Traggestell eingebaut ist, damit je nach Füllstand des Gasspeichers die Folie dem Gestell aufliegen kann. Im Falle der hier erwähnten thermophilen Anlagentechnik wird das Gas extern gespeichert. Das entstandene Biogas enthält neben den Hauptbestandteilen Methan und Kohlenstoffdioxid auch Spurengase wie z. B. Schwefelwasserstoff, welcher für Mensch und Umwelt toxisch ist. Zusätzlich wirkt er auf Bestandteile der Anlage (z. B. Verbrennungsmotoren) stark korrosiv. Allerdings ist Schwefelwasserstoff auch eine wichtige Schwefelquelle für Methanbakterien. Durch schwefeloxidierende Bakterien kann Schwefelwasserstoff in elementaren Schwefel oder Sulfat umgewandelt werden, wozu oft in Biogasanlagen eine geringe Menge an Sauerstoff zugeführt werden muss. Im dritten und vierten Verfahrensschritt zur Biogasgewinnung wird der Fermenterinhalt in ein Gärrestlager befördert bzw. das Biogas verstromt oder ins Erdgasnetz eingebracht (Abbildung 1.3c und 1.3d). Die Verbrennung des Gases erfolgt in einem Blockheizkraftwerk z. B. mit einem Gas-Otto-Motor, an den ein Generator zur Stromerzeugung gekoppelt ist. Der Strom kann für den Eigenstrombedarf der Biogasanlage und für die Einspeisung ins öffentliche Stromversorgungsnetz genutzt werden. Die bei der Verbrennung entstehende Wärme kann zur Aufrechterhaltung des Gärprozesses oder zur Wärmeversorgung von nahegelegenen Ställen oder Häusern verwendet werden. Weiterhin ist mit der Wärme eine Trocknung landwirtschaftlicher Güter möglich. Neben der Verbrennung von Biogas und der Erzeugung von Strom kann das Biogas auch aufbereitet und in das Erdgasnetz eingespeist werden. Das vergorene Substrat der Biogasfermenter kann in ein Gärrestlager überführt und als Dünger auf landwirtschaftliche Nutzflächen aufgebracht werden (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

1.4 Substrate für den Betrieb von Biogasanlagen

Für die Erzeugung von Biogas werden in landwirtschaftlichen Biogasanlagen unterschiedliche Substrate eingesetzt. Zum Einsatz kommen hierbei Wirtschaftsdünger wie Schweinegülle, Rindergülle (als Stickstoffquelle), Rindermist oder Geflügelmist sowie nachwachsende Rohstoffe wie beispielsweise Maissilage, Getreide-Ganzpflanzensilage, Grassilage oder Rüben. Die genannten Substrate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Trockensubstanz (TS), organischen Trockensubstanz, Nährstoffe, ihrem Anteil an Polymeren sowie im Biogas- bzw. Methanertrag.

Unter Gülle wird ein Gemisch aus Kot und Harn verstanden, welches zusätzlich Wasser, Futterreste und geringfügige Mengen an Einstreu aufweist (Wendland und Attenberger, 2009). Der Nährstoffgehalt von Wirtschaftsdüngern zeigt je nach Tierart, Fütterung und TS-Gehalt große Schwankungen. Schweinegülle besitzt in etwa einen TS-Gehalt von 5 %, der Gehalt an Ammonium beträgt in Mastschweinegülle $2,3 \text{ kg/m}^3$. Dagegen ist der TS-Gehalt in Rindergülle (Milchviehgülle, Grünland) mit 7,5 % etwas höher und der Ammoniumgehalt mit $1,9 \text{ kg/m}^3$ niedriger (Wendland und Attenberger, 2009). Der Methangehalt aus Rindergülle ist geringfügig niedriger (55 %) als der von Schweinegülle (58 %; Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

Neben Gülle wird dem Fermentationsprozess größtenteils Mais und Gras in silierter Form hinzugegeben. Bei der Herstellung von Silage wird Pflanzenmaterial zunächst gehäckselt, verdichtet und luftdicht abgeschlossen. Durch die einsetzende Milchsäuregärung wird die Silage angesäuert und dadurch haltbar gemacht (Fuchs, 2007). Der Methanertrag kann mit Maissilage (47 - 69 %) höher sein als mit Grassilage (52 - 56 %; Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Der geringere Methanertrag mit Grassilage kann auf den höheren Gehalt an Rohprotein erklärt werden, denn mit steigendem Rohproteingehalt kann ein erhöhter Ammoniumgehalt im Gärsubstrat auftreten. Da in wässriger Lösung Ammonium und Ammoniak im Gleichgewicht stehen, kann Ammoniak in die Zellen diffundieren und die ATP-Synthese entkoppeln (Kaiser *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2009).

Die Substratwahl kann einen großen Einfluss auf die Mikroflora im Fermenter haben, da je nach Substrat unterschiedliche Polymere und damit auch unterschiedliche Hydrolyseprodukte für die Säure-bildenden Bakterien zur Verfügung stehen. Beispielsweise sind Klee gras, Grassilage und Roggenganzpflanzensilage proteinreiche Substrate. Sie können zu erhöhten Konzentrationen an Ammonium und Schwefelwasserstoff führen, welche beim Abbau von Aminosäuren entstehen und für Biogasanlagen und manche Mikroorganismen toxisch sein können. Dagegen sind Sonnenblumen oder Raps reich an Fetten (Triglyceriden), welche den

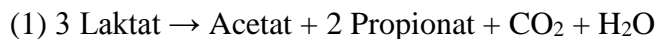
Pflanzen als Speicherstoffe dienen. Während der Hydrolyse entstehen durch die Aktivität von Lipasen langkettige Fettsäuren und der dreiwertige Alkohol Glycerin. Ein großer Anteil an Kohlenhydraten wird bei einer Zugabe von Maissilage, Zuckerrüben oder Kartoffeln der anaeroben Abbaukette zugeführt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Erntezeitpunkt von Maispflanzen (vor oder nach der Kolbenentwicklung) einen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung der Maissilage hat (z. B. in Bezug auf Zucker, Fette, Rohprotein; Arrigo und Stoll, 2012). Als wichtigste Polymere sind Stärke, Cellulose und Hemicellulose zu nennen. Stärke wird von den Pflanzen als Speicherstoff gebildet (z. B. Getreidekorn, Maiskorn, Kartoffel; ALB, 2010). Sie besteht aus D-Glucoseeinheiten, welche α -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Die enzymatische Spaltung erfolgt durch Amylasen (Anand *et al.*, 2009). Cellulosen und Hemicellulosen sind Bestandteile primärer und sekundärer Pflanzenzellwände. Cellulose besteht aus D-Glucoseeinheiten, welche β -1,4-glykosidisch verbunden sind. Dagegen kommen in Hemicellulosen verschiedene Zucker vor wie beispielsweise D-Xylose, D-Mannose, D-Galactose, D-Glucose, L-Arabinose, 4-O-Methyl-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure (Perez *et al.*, 2002). Beim Abbau von Cellulose exkretieren Mikroorganismen Cellulasen (Endo-1,4- β -Glucanasen und Exo-1,4- β -Glucanasen). Clostridien besitzen sogenannte Cellulosomen, Multienzymkomplexe aus Cellulose- und Xylan-spaltenden Enzymen, auf der Zelloberfläche (Fuchs, 2007). Die entstehende Cellobiose wird weiter durch Cellobiasen abgebaut (Perez *et al.*, 2002). Hemicellulosen werden bezüglich ihrer Hauptzuckerkomponente in Xylane, Mannane und Galactane unterschieden (Fuchs, 2007).

1.5 Mikrobielle Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure

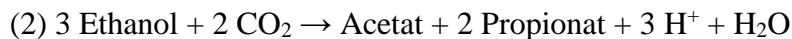
Unter anaeroben Bedingungen können Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure über verschiedene Stoffwechselwege gebildet werden. Teilweise entstehen diese Säuren als Hauptfermentationsprodukte, teilweise auch nur in geringen Mengen als Nebenprodukte. Je nach Stoffwechselweg können zusätzlich weitere Nebenprodukte wie Ethanol, Milchsäure, Succinat oder Essigsäure gebildet werden. Im Folgenden werden zunächst die wichtigsten Stoffwechselwege der Propionsäure- und Buttersäurebildung vorgestellt. Im Anschluss daran erfolgt eine Zusammenstellung von Mikroorganismen, welche diese Reaktionen durchführen.

Für die anaerobe Bildung von Propionsäure durch Mikroorganismen sind drei Stoffwechselwege bekannt, welche als Methylmalonyl-CoA-Weg (Abbildung 1.4a), Acrylyl-CoA-Weg

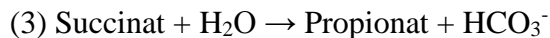
(Abbildung 1.4b) und Succinat-Decarboxylierung (Abbildung 1.4c) bezeichnet werden. Es gibt verschiedene Ausgangssubstrate, welche über die genannten Wege in Propionsäure umgewandelt werden können. Beispielsweise können über den Methylmalonyl-CoA-Weg Glucose, Glycerin, Ethanol, Laktat und Glutamat in Propionsäure umgesetzt werden, welche zunächst zu Pyruvat oxidiert werden (Abbildung 1.5). Die Reoxidation der Reduktionsäquivalente erfolgt unter Bildung von Propionsäure. Laktat, Ethanol und Alanin sind Beispiele für Substrate, welche über den Acrylyl-CoA-Weg in Propionsäure umgesetzt werden. Beim dritten Stoffwechselweg, der Succinat-Decarboxylierung, wird Succinat unter Bildung von CO₂ zu Propionsäure umgesetzt. Beim Abbau der unterschiedlichen Substrate unter Verwendung der drei genannten Propionsäurebildungswege können unterschiedliche Energieausbeuten erzielt werden. Folgende Reaktionsgleichungen zeigen beispielhaft die Umsatzgleichungen von Laktat (1), Ethanol (2), Succinat (3) und Alanin (4).



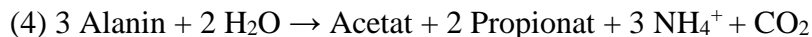
$\Delta G^0 = -162 \text{ kJ pro 3 Mol Laktat}$ (Seeliger *et al.*, 2002); Methylmalonyl-CoA-Weg/Acrylyl-CoA-Weg



$\Delta G^0 = -124 \text{ kJ pro 3 Mol Ethanol}$ (Seeliger *et al.*, 2002); Methylmalonyl-CoA-Weg



$\Delta G^0 = -20,6 \text{ kJ pro Mol Succinat}$ (Schink und Pfennig, 1982); Succinat-Decarboxylierung



$\Delta G^0 = -138 \text{ kJ pro Mol Acetat}$ (Hetzl *et al.*, 2003); Acrylyl-CoA-Weg

Beim Abbau von Laktat über den Methylmalonyl-CoA-Weg werden 3 Mol Laktat zunächst zu 3 Mol Pyruvat oxidiert, wovon 1 Mol Pyruvat zu Acetat und CO₂ weiteroxidiert wird (Abbildung 1.4a; Fuchs, 2007). Hierbei kommt es durch das Enzym Acetatkinase zur Energiegewinnung (ATP-Bildung). Die Reduktion von 2 Mol Laktat zu 2 Mol Propionsäure dient der Reoxidation der anfallenden Reduktionsäquivalente aus der Oxidation von Laktat zu Acetat. Hierbei werden 2 Mol Pyruvat durch eine Biotin-enhaltene Transcarboxylase zu 2 Mol Oxalacetat carboxyliert, welche durch Enzyme des reduktiven Citratzyklus über die Zwischenprodukte Malat und Fumarat zu 2 Mol Succinat reduziert werden. Während der Fumaratreduktion zu Succinat kommt es zu einer zusätzlichen Energiegewinnung durch Elektronentransportphosphorylierung (Seeliger *et al.*, 2002). Nach Aktivierung von Succinat durch eine CoA-Transferase, welche Propionyl-CoA als Donor verwendet, entsteht durch eine Coenzym B12 abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase das charakteristische Zwischenprodukt Methylmalonyl-CoA. Dieses wird durch die eben erwähnte Transcarboxylase zu Propionyl-CoA decarboxyliert, welches als CoA-Donor der eben genannten CoA-Transferase dient

und am Ende als Propionat freigesetzt wird. *Veilonella parvula* zeigt eine Variation im Methylmalonyl-CoA-Weg. Für die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat verwendet *Veilonella parvula* nicht die Transcarboxylase, welche Methylmalonyl-CoA als Donor nutzt, sondern eine ATP-verbrauchende Pyruvatcarboxylase. Die Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA ist an die Bildung eines transmembranen Na^+ -Ionen-Gradienten gekoppelt (Seeliger *et al.*, 2002).

Der zweite Stoffwechselweg, bei welchem Propionsäure gebildet wird, ist der Acrylyl-CoA-Weg (Abbildung 1.4b). Hierbei wird Laktat durch eine CoA-Transferase zu Laktyl-CoA und weiter durch Wasserabspaltung zu Acrylyl-CoA umgesetzt. Durch Reduktion der Doppelbindung mittels einer Acrylyl-CoA-Reduktase entsteht Propionyl-CoA, welches durch die genannte CoA-Transferase zu Propionsäure umgesetzt wird.

Ein weiterer Weg der mikrobiellen Propionsäure-Bildung ist die Succinat-Decarboxylierung. Der Abbau ist in Abbildung 1.4c schematisch dargestellt, wie er für *Propionigenium modestum* beschrieben ist (Dimroth und Schink, 1998). Bei der Succinat-Decarboxylierung wird die CoA-Gruppe von Propionyl-CoA durch eine Succinat-Propionyl-CoA:CoA-Transferase auf Succinat übertragen. Durch Reaktionen der Methylmalonyl-CoA-Mutase und der Methylmalonyl-CoA-Isomerase wird Succinyl-CoA zunächst zu (R)-Methylmalonyl-CoA und anschließend zu (S)-Methylmalonyl-CoA umgewandelt. Das Schlüsselenzym der Energiekonservierung ist eine membrangebundene Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, welche (S)-Methylmalonyl-CoA decarboxyliert und gleichzeitig als Na^+ -Pumpe agiert. Durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase wird ein Na^+ -Ionen-Gradient aufgebaut, welcher durch eine Na^+ -transportierende ATPase zur Energiegewinnung genutzt wird (Dimroth und Schink, 1998).

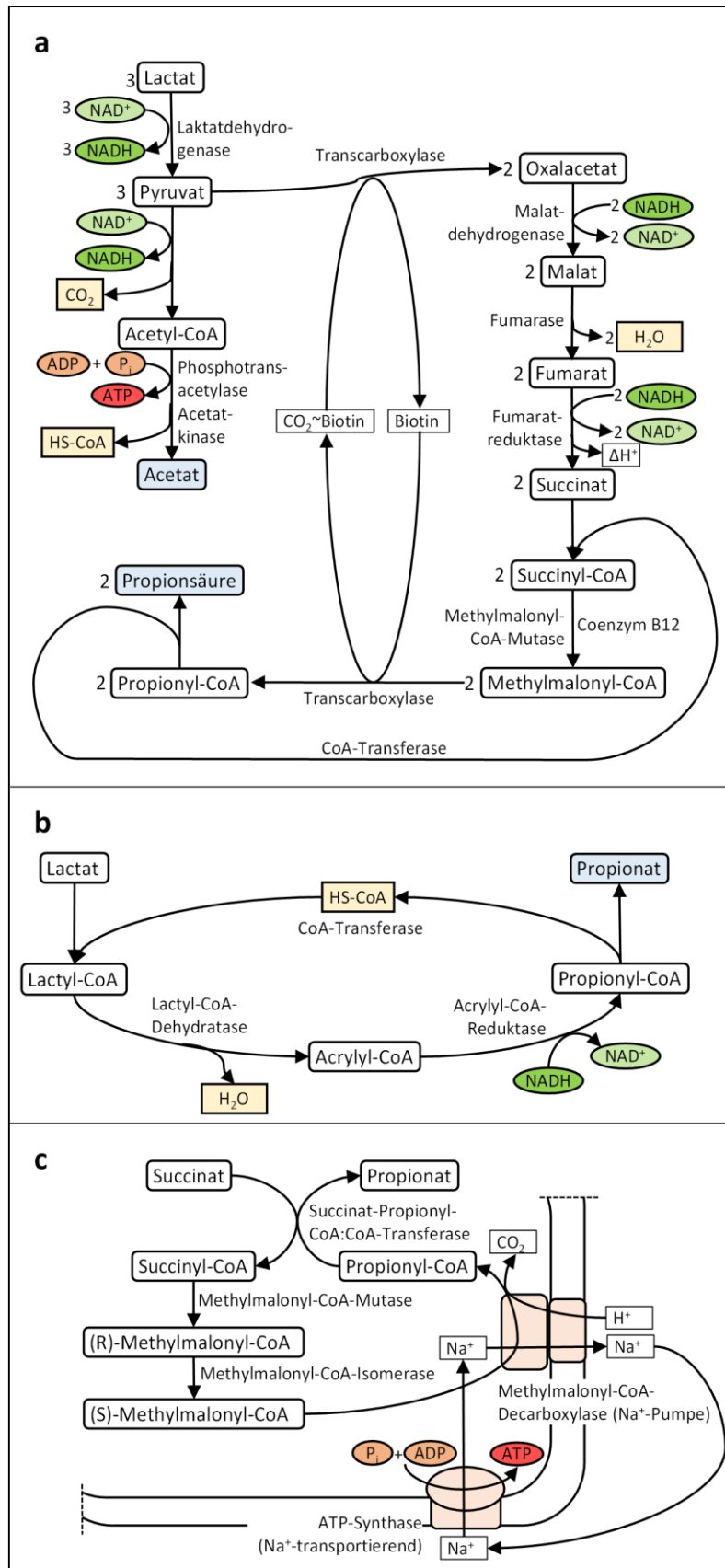


Abbildung 1.4: Mikrobielle Stoffwechselwege zur Bildung von Propionsäure. (a) Methylmalonyl-CoA-Weg; (b) Acrylyl-CoA-Weg; (c) Succinat-Decarboxylierung. Weitere Erläuterungen sind im Text aufgeführt. Verändert nach Dimroth und Schink (1998) und Fuchs (2007).

Wie bereits erwähnt, können verschiedene Substrate über den Methylmalonyl-CoA-Weg oder den Acrylyl-CoA-Weg in Propionsäure umgesetzt werden. Abbildung 1.5 zeigt schematisch, durch welche enzymatischen Reaktionen die verschiedenen Substrate diesen Stoffwechselwegen zugeführt werden können. Der dreiwertige Alkohol Glycerin kann zunächst durch eine Glycerindehydrogenase zu Dihydroxyaceton oxidiert und im Anschluss durch eine Dihydroxyacetonkinase zu Dihydroxyacetonphosphat phosphoryliert werden. Die weitere Oxidation zu Pyruvat erfolgt wie bei Glucose über die Glycolyse (Abbildung 1.5a; Da Silva *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Glycerin kann Ethanol durch eine Alkohol- und eine Aldehyd-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. In anschließenden Reaktionen kann Acetyl-CoA weiter zu Acetylphosphat und Acetat durch die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase umgewandelt werden, wobei es zur Bildung von ATP kommt. Über eine ferredoxinabhängige Pyruvatsynthase kann Acetyl-CoA zu Pyruvat carboxyliert werden. Bei manchen Mikroorganismen erfolgt die weitere Propionsäurebildung über den Methylmalonyl-CoA-Weg (Abbildung 1.5a; z. B. *Pelobacter propionicus*; Schink *et al.*, 1987) oder über den Acrylyl-CoA-Weg (*Clostridium neopropionicum*; Tholozan *et al.*, 1992). Bei letztgenanntem Weg wird Pyruvat zunächst durch das Enzym Laktat-Dehydrogenase reduziert, bevor es dem reduktiven Teil des Acrylyl-CoA-Wegs zugeführt wird (Abbildung 1.5b). Die Aminosäure Glutamat wird über mehrere Reaktionsschritte durch die Enzyme Glutamat-Mutase, Methylaspartase, Mesaconase und Citramalat-Lyase in Pyruvat umgewandelt, welches im Methylmalonyl-CoA weiter reduziert werden kann (Abbildung 1.5a; Buckel, 2001). Eine andere Möglichkeit, wie Aminosäuren zu Propionsäure umgewandelt werden, wird durch den Abbau von Alanin deutlich. Eine Aminotransferase überträgt die Aminogruppe von Alanin auf 2-Oxoglutarat, wobei Pyruvat und Glutamat als Produkte entstehen. Anschließend kann Pyruvat durch eine Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert werden, welches dann für den Acrylyl-CoA-Weg zur Verfügung steht (Abbildung 1.5b; Schweiger und Buckel, 1984).

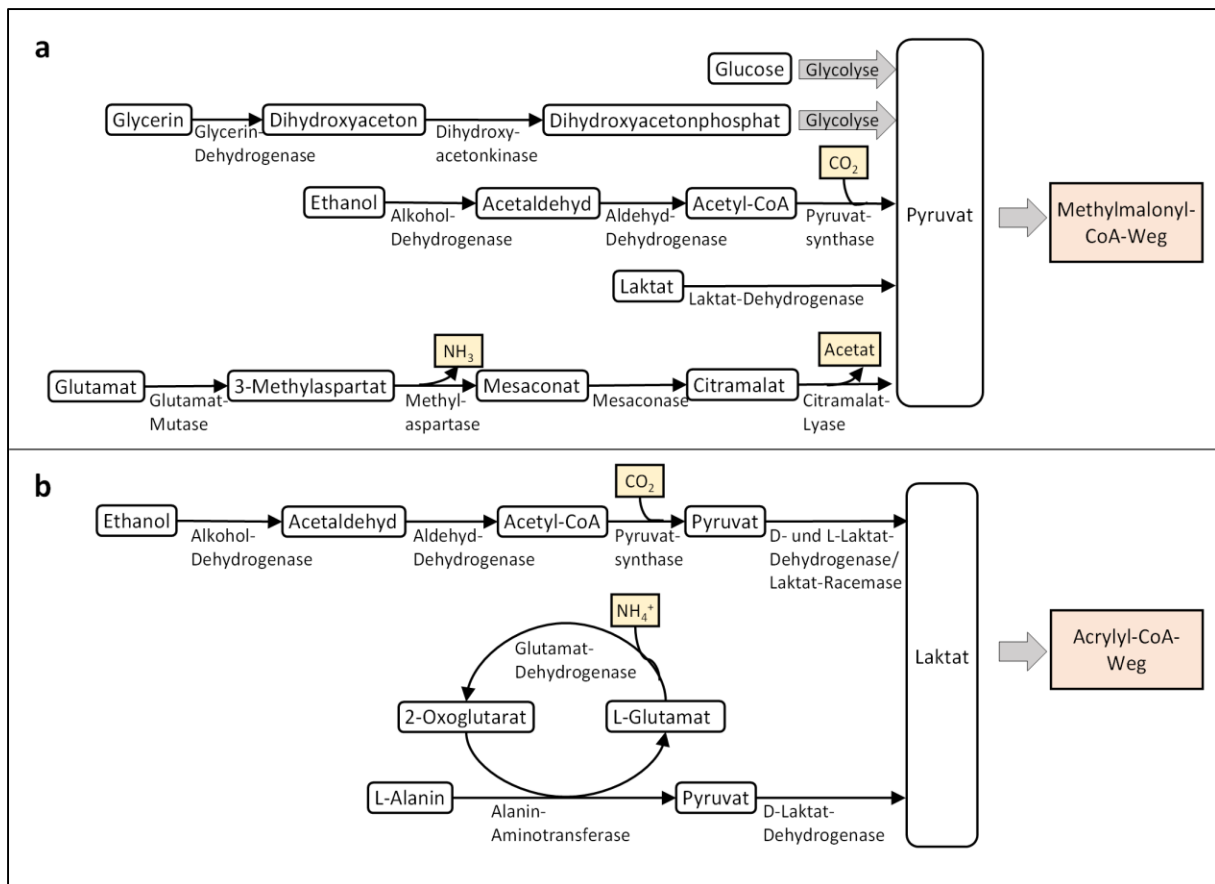


Abbildung 1.5: Vereinfachtes Schema zur Propionsäurebildung aus verschiedenen Substraten. (a) Substrate, welche über den Methylmalonyl-CoA-Weg zu Propionsäure umgesetzt werden. Hierzu zählen Glucose, Glycerin, Ethanol, Laktat und Glutamat; (b) Substrate, welche über den Acrylyl-CoA-Weg zu Propionsäure umgesetzt werden (z. B. Ethanol und L-Alanin).

Die Buttersäuregärung wird typischerweise von grampositiven anaeroben Endosporenbildnern durchgeführt. Es werden saccharolytische und peptolytische Buttersäuregärer unterschieden (Fuchs, 2007). Kohlenhydrate, wie z. B. Glucose, können zunächst über die Glycolyse zu Pyruvat oxidiert werden, welches durch eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA und CO_2 weiteroxidiert wird. Die bei dieser Reaktion freigesetzten Elektronen werden auf Ferredoxine übertragen. Diese elektronenübertragenden Eisen-Schwefel-Proteine können als Elektronendonoren für eine Hydrogenase dienen, welche die Ferredoxine unter Bildung von H_2 reoxidiert. Die nachfolgenden Schritte der Buttersäurebildung dienen der Regeneration der Reduktionsäquivalente der Glycolyse. In einer Kondensationsreaktion werden zunächst 2 Mol Acetyl-CoA durch eine Thiolase zu Acetoacetyl-CoA umgesetzt. Daraufhin wird Acetoacetyl-CoA durch die Enzyme 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, Crotonase und Butyryl-CoA-Dehydrogenase zu Butyryl-CoA reduziert, wobei 2 Mol NADH oxidiert werden und 1 Mol Wasser entsteht (Buckel, 2001; Pryde *et al.*, 2002; Fuchs, 2007). Am Ende der

Buttersäuregärung kann je nach Mikroorganismus Butyryl-CoA durch eine CoA-Transferase, welche den CoA-Thioester auf Acetat überträgt, zu Butyrat umgesetzt werden (Abbildung 1.6 ①). Diese Reaktion wird beispielsweise von *Roseburia hominis* durchgeführt (Louis *et al.*, 2007). Das entstandene Acetyl-CoA kann über eine Phosphotransacetylase und eine Acetatkinase zur ATP-Bildung genutzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Bildung von Butyrat durch die Aktivität einer Phosphotransbutyrylase und einer Butyratkinase (Abbildung 1.6 ②). *Clostridium acetobutylicum* führt diesen Stoffwechselweg durch (Louis *et al.*, 2004). Neben der Bildung von Butyrat können auch geringe Mengen an Essigsäure und Ethanol (Abbildung 1.6) oder Milchsäure gebildet werden.

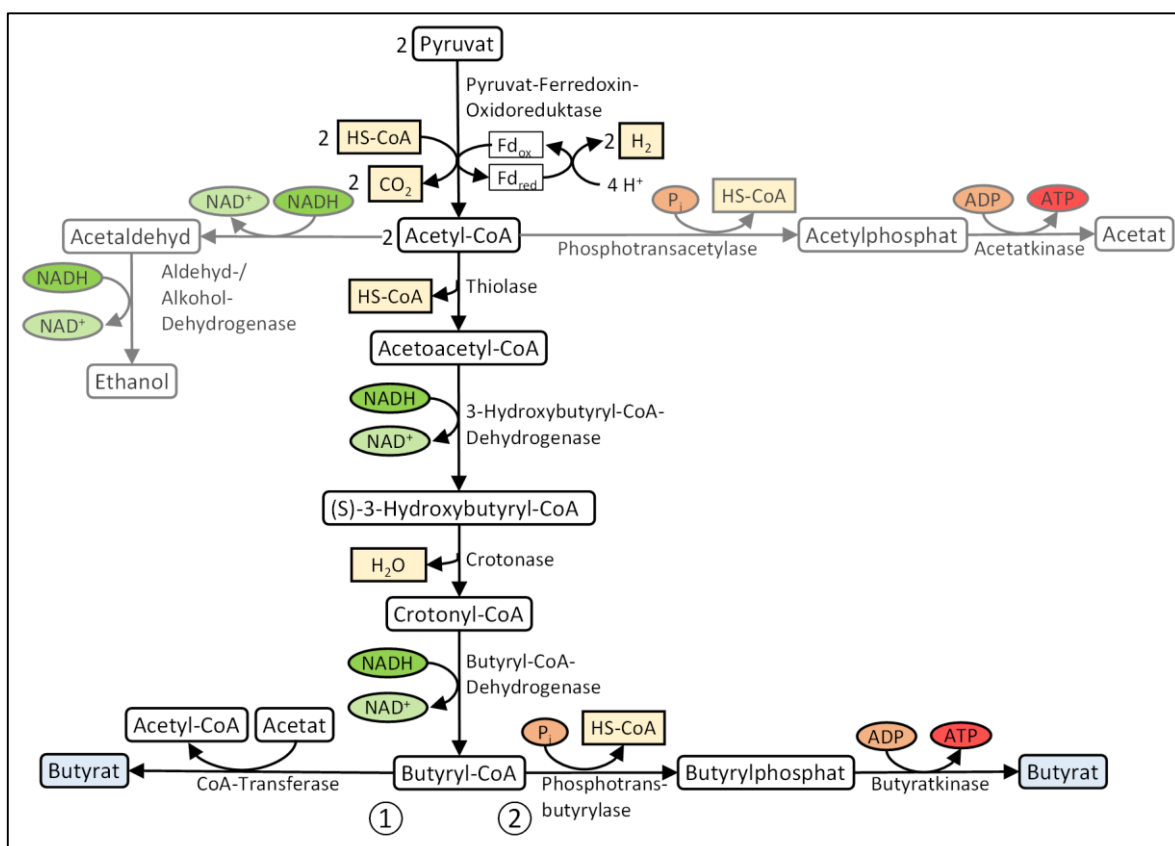
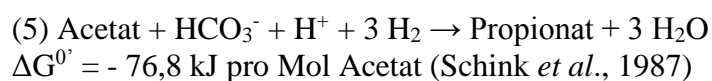


Abbildung 1.6: Buttersäuregärung. Die Bildung von Buttersäure dient der Regeneration der Reduktionsäquivalente aus der Glycolyse. Bildung von Buttersäure über eine CoA-Transferase (①) oder durch die Enzyme Phosphotransbutyrylase und Butyratkinase (②). Verändert nach Buckel (2001) und Fuchs (2007).

Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure können anaerob durch Mikroorganismen aus Zuckern, Säuren, Alkoholen, aromatischen Verbindungen, Polyaminen, CO₂ und Aminosäuren gebildet werden. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick, durch welche Mikroorganismen diese Substrate zu Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure umgesetzt werden können.

Wie bereits erwähnt, können Zucker über die Propionsäure- oder Buttersäuregärung zu den jeweiligen Säuren umgewandelt werden. Glucose kann in der Propionsäuregärung zu Propionsäure und Essigsäure vergoren werden. Als wichtigste Vertreter sind hierbei Spezies der Gattung *Propionibacterium* zu nennen. Weitere Vertreter, welche Glucose über den Methylmalonyl-CoA-Weg abbauen, sind *Arachnia propionica*, *Bacteroides fragilis* und *Selenomonas ruminantium* (Allen und Linehan, 1977; Macy *et al.*, 1978). Manche Stämme von *Selenomonas ruminantium* sind zusätzlich in der Lage, Laktat zu Essigsäure und Propionsäure zu vergären (Paynter und Elsdon, 1970). Bei der Buttersäuregärung kann Glucose zu Buttersäure, CO₂ und H₂ umgesetzt werden. Diese Reaktion wird von Vertretern der Gattungen *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* und *Fusobacterium* durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Essigsäure und Milchsäure aus Glucose durch *Bifidobacterium* sp. (Gottschalk, 1979).

Die Alkohole Glycerin und Ethanol können ebenfalls durch Mikroorganismen zu Propionsäure oder Buttersäure vergoren werden. *Propionibacterium acidipropionici* kann neben der Fermentation von Glucose und Laktat auch Glycerin zu Propionsäure umsetzen. Hierbei werden alle drei Substrate über den Methylmalonyl-CoA-Weg abgebaut (vgl. Abbildung 1.5a; Barbirato *et al.*, 1997). Verwertung von Glycerin zu Propionsäure wurde auch bei *Propionibacterium acnes* und *Clostridium propionicum* festgestellt (Barbirato *et al.*, 1997). *Pelobacter propionicus* und *Desulfobulbus propionicus* können Ethanol und CO₂ zu Essigsäure und Propionsäure umsetzen (Stams *et al.*, 1984; Schink *et al.*, 1987). *Desulfobulbus propionicus* bildet weiterhin Propionsäure aus Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Reaktionsgleichung (5) zeigt die Umsatzgleichung von Acetat zu Propionat.



Im Vergleich zu den genannten Organismen verwertet *Clostridium neopropionicum* Ethanol und CO₂ über den Acrylyl-CoA-Weg (Abbildung 1.5b; Tholozan *et al.*, 1992). Das strikt anaerobe Bakterium *Clostridium kluyveri* ist in der Lage, Ethanol in Kombination mit Essigsäure zu Butyrat, Caproat und Wasserstoff umzuwandeln. Hierbei oxidiert *Clostridium kluyveri* Ethanol durch eine Alkohol-Dehydrogenase und eine NAD(P)-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA. Durch Reduktion von Acetyl-CoA wird über mehrere Schritte wie bei der Buttersäuregärung (Abbildung 1.6) Butyryl-CoA gebildet, welches durch eine Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase bei gleichzeitiger Bildung von Acetyl-CoA in Butyrat umgesetzt wird (Seedorf *et al.*, 2008).

Tabelle 1.1: Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure durch Mikroorganismen im Allgemeinen.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Zucker			
Glucose	Propionsäure + Essigsäure	<i>Propionibacterium</i> sp. ¹ , <i>Arachnia propionica</i> ¹ , <i>Bacteroides fragilis</i> ¹ , <i>Selenomonas ruminantium</i> ¹	Pine und George, 1969; Paynter und Elsdon, 1970; Allen und Linehan, 1977; Macy <i>et al.</i> , 1978
Glucose	Buttersäure, CO ₂ , H ₂	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Gottschalk, 1979
Glucose	Essigsäure, Milchsäure	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Gottschalk, 1979
Alkohole			
Glycerin	Propionsäure	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ¹ , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Clostridium propionicum</i>	Barbirato <i>et al.</i> , 1997
Ethanol + CO ₂	Propionsäure + Essigsäure	<i>Pelobacter propionicus</i> ¹ , <i>Desulfobulbus propionicus</i> ¹ , <i>Clostridium neopropionicum</i> ²	Stams <i>et al.</i> , 1984; Schink <i>et al.</i> , 1987; Tholozan <i>et al.</i> , 1992
Ethanol + Essigsäure	Buttersäure + Caproat	<i>Clostridium kluyveri</i>	Seedorf <i>et al.</i> , 2008
Säuren			
Succinat	Propionsäure	<i>Propionigenium modestum</i> , <i>Propionigenium maris</i> , <i>Selenomonas acidaminovorans</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Sporomusa malonica</i>	Scheifinger und Wolin, 1973; Schink und Pfennig, 1982; Dehning <i>et al.</i> , 1989; Guangsheng <i>et al.</i> , 1992; Jansen und Liesack, 1995
Laktat	Propionsäure, Essigsäure, CO ₂ , H ₂ O	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ¹ , <i>Veillonella parvula</i> ¹ , <i>Propionispira arboris</i> ¹ , <i>Pelobacter propionicus</i> ¹ , <i>Clostridium propionicum</i> ² , <i>Megasphaera elsdenii</i> ² , <i>Clostridium homopropionicum</i> ²	Gottschalk, 1979; Schink <i>et al.</i> , 1982; Schink, 1984; Seeliger <i>et al.</i> , 2002
Laktat	Buttersäure	Milchsäurebakterien, <i>Eubacterium hallii</i> , <i>Anaerostipes caccae</i>	Duncan <i>et al.</i> , 2004
Essigsäure + CO ₂	Propionsäure	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Stams <i>et al.</i> , 1984; Schink <i>et al.</i> , 1987
Crotonsäure	Buttersäure + Essigsäure	obligat syntrophe Gärer	Fuchs, 2007
Citrat	Essigsäure + Formiat + HCO ₃ ⁻	<i>Bacteroides</i> sp.	Madigan <i>et al.</i> , 2001
Malonat	Essigsäure + HCO ₃ ⁻	<i>Malonomonas rubra</i> , <i>Sporomusa malonica</i>	Dehning und Schink, 1989; Dehning <i>et al.</i> , 1989
Urat	Essigsäure	<i>Clostridium acidi-urici</i> , <i>Clostridium cylindrosporum</i>	Gottschalk, 1979
Resorcinol, Putrescin, CO₂			
Resorcinol	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium</i> sp.	Madigan <i>et al.</i> , 2001
Putrescin	Buttersäure + Essigsäure	nicht klassifizierte grampositive, nicht sporenbildende Anaerobier	Madigan <i>et al.</i> , 2001
CO ₂	Essigsäure + H ₂ O	<i>Clostridium aceticum</i> , <i>Acetobacterium woodii</i>	Gottschalk, 1979; Braun <i>et al.</i> , 1981
Aminosäuren			
Glutamat	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium tetanomorphum</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Clostridium cochlearium</i> , <i>Clostridium saccarobutyricum</i> , <i>Clostridium microsporium</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Acidaminococcus fermentans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium fusiformis</i>	Buckel und Barker, 1974; Gottschalk, 1979
Glutamat	Propionsäure + Essigsäure	<i>Selenomonas acidaminophila</i> , <i>Barkera propionica</i>	Buckel, 2001
Lysin	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium sticklandii</i> , <i>Clostridium peptidivorans</i>	Mechichi <i>et al.</i> , 2000; Fonknechten <i>et al.</i> , 2010
Glycin	Essigsäure + CO ₂ + NH ₃	<i>Peptococcus anaerobius</i> , <i>Clostridium thermoaceticum</i> , <i>Clostridium formicoaceticum</i>	Gottschalk, 1979
Methionin	Propionsäure	<i>Clostridium peptidivorans</i>	Mechichi <i>et al.</i> , 2000
Alanin	Propionsäure + Essigsäure	<i>Clostridium propionicum</i> ²	Schweiger und Buckel, 1984
Threonin	Propionsäure + H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium propionicum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Clostridium sticklandii</i>	Gottschalk, 1979; Fonknechten <i>et al.</i> , 2010

Propionsäurebildung durch: ¹ Methylmalonyl-CoA-Weg, ² Acrylyl-CoA-Weg

Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure können auch aus Säuren gebildet werden, welche Zwischen- oder Endprodukte anderer Stoffwechselreaktionen sein können. Beispiele für solche Säuren sind Succinat, Laktat, Acetat, Crotonsäure, Citrat, Malonat oder Urat. Succinat kann beispielsweise von *Selenomonas ruminantium* zu Propionsäure decarboxyliert werden (Abbildung 1.4c), welches wie bereits erwähnt auch Glucose zu Propionsäure fermentieren kann. Succinat-Decarboxylierung unter Bildung von Propionsäure wurde ebenfalls bei *Propionigenium maris* und *Propionigenium modestum* festgestellt (Schink und Pfennig, 1982; Jannsen und Liesack, 1995). Zusätzlich wird Acetat und Propionat durch *Propionigenium modestum* bei der Fermentation von Fumarat, Aspartat, Malat, Pyruvat oder Oxalacetat gebildet (Schink und Pfennig, 1982). *Selenomonas acidaminovorans* kann ebenfalls Succinat zu Propionsäure decarboxylieren. Weiterhin kann dieser Organismus Glutamat, Histidin, Arginin, Ornithin, Citrullin und Threonin zu Essigsäure, Propionsäure und Wasserstoff fermentieren, wobei Propionsäure durch eine oxidative Decarboxylierung über α -Ketoglutarat und Succinyl-CoA gebildet wird (Guangsheng *et al.*, 1992). Das homoacetogene Bakterium *Sporomusa malonica* kann Succinat zu Propionsäure decarboxylieren und weiterhin Malat, Fumarat, Propanol und 1,2-Propandiol zu Essigsäure und Propionsäure umsetzen (Dehning *et al.*, 1989).

Propionibacterium freudenreichii, *Veilonella parvula*, *Propionispira arboris* und *Pelobacter propionicus* verwerten Laktat über den Methylmalonyl-CoA-Weg (Abbildung 1.4a; Schink *et al.*, 1982; Schink, 1984; Seeliger *et al.*, 2002). Dagegen fermentieren *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium propionicum* und *Clostridium homopropionicum* Laktat über den Acrylyl-CoA-Weg zu Propionsäure (Abbildung 1.4b; Gottschalk, 1979; Seeliger *et al.*, 2002). Laktat kann auch als Substrat zur Buttersäurebildung dienen. *Eubacterium hallii* und *Anaerostipes caccae* fermentieren beispielsweise Laktat über Acetyl-CoA zu Buttersäure (Duncan *et al.*, 2004). Essigsäure und Buttersäure können auch aus der aromatischen Verbindung Resorcinol oder dem Polyamin Putrescin gebildet werden (Madigan *et al.*, 2001). Bei *Clostridium acidi-urici* und *Clostridium cylindrosporium* handelt es sich um homoacetogene Bakterien, welche Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu Essigsäure und Wasser umsetzen können (Gottschalk, 1979; Braun *et al.*, 1981).

Als letzte Substratgruppe können Aminosäuren erwähnt werden, welche ebenfalls von Mikroorganismen zu Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure umgesetzt werden können. Propionsäure kann aus folgenden Aminosäuren gebildet werden: Alanin, Glutamat, Cystein, Methionin, Serin, Glycin, Tyrosin und Threonin. *Clostridium propionicum* verwertet Alanin über den Acrylyl-CoA-Weg (Abbildung 1.5b; Schweiger und Buckel, 1984). Dieser Organismus kann

darüber hinaus mit Hilfe der Enzyme Serin-Dehydratase und Threonin-Dehydratase Serin bzw. Threonin zu Propionsäure, Kohlenstoffdioxid und Ammonium abbauen (Hofmeister *et al.*, 1993). *Clostridium sticklandii* kann einerseits Lysin zu Buttersäure, Essigsäure und Ammonium abbauen und andererseits Threonin über eine Threonin-Dehydratase zu Ammonium und 2-Ketobutyrat, welche im Anschluss zu Propionat und Kohlenstoffdioxid oxidiert werden kann (Fonknechten *et al.*, 2010). Methionin kann beispielsweise von *Clostridium peptidivorans* zu Propionsäure umgesetzt werden (Mechichi *et al.*, 2000). *Selenomonas acidaminophila* und *Barkera propionica* können Glutamat zu Essigsäure und Propionsäure vergären (Abbildung 1.5a; Buckel, 2001).

Neben Lysin kann auch Glutamat zur Bildung von Buttersäure verwendet werden. Während *Clostridium tetani*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium saccharobutyricum* und *Clostridium tetanomorphum* Buttersäure über das Zwischenprodukt Methylaspartat bilden, wird Glutamat bei *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium microsporium*, *Fusobacterium nucleatum* und *Fusobacterium fusiformis* über die Bildung von Hydroxyglutarat zu Butyrat abgebaut (Buckel und Barker, 1974).

1.6 Ziele der Arbeit

Die Erforschung der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen ist deshalb von besonderem Interesse, da in den vergangenen Jahren der Anteil erneuerbarer Energien an der Stromversorgung der Bundesrepublik Deutschland stark zugenommen hat, zu welcher auch die Energiegewinnung aus Biogasanlagen zählt (BMW, 2015c). Zahlreiche kultivierungsunabhängige, molekularbiologische Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass eine Vielzahl der am anaeroben Prozess beteiligten Mikroorganismen unbekannt sind (z. B. Krause *et al.*, 2008). Für ein besseres Verständnis und eine Optimierung des Prozesses der Biogasbildung in landwirtschaftlichen Biogasanlagen ist eine Kenntnis über die am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismen sehr wichtig. Obwohl zentrale Stoffwechselwege und Modellorganismen gut untersucht sind, ist ein Großteil der mikrobiellen Biozönose noch unbekannt. Da die Biogasbildung durch ein Zusammenwirken mehrerer Organismengruppen bedingt ist, ist es wichtig zu wissen, welche Organismen am anaeroben Abbau in Biogasanlagen beteiligt sind und welche Rolle sie in der Abbaukette einnehmen. Während in der Vergangenheit viele Studien zur hydrolytischen Stufe und der Methanogenese-Stufe durchgeführt wurden (z. B. Cirne *et al.*, 2007; Maus *et al.*, 2013; Stantscheff *et al.*, 2014), gibt es bisher kaum Isolate und Studien

zu Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Isolaten aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen im Detail. Während Essigsäure ein wichtiges Substrat für die Methanogenese darstellt, können Propionsäure und Buttersäure durch eine Ansäuerung des Fermenters zu einer Prozessstörung der Biogasbildung führen (Ahring *et al.*, 1995).

Um weitere Einblicke in die anaeroben Abbauvorgänge in Biogasanlagen zu bekommen, sollten im Rahmen dieser Arbeit gezielt Bakterien isoliert werden, welche Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure bilden können. Durch die Isolierung bekannter, aber auch neuer Arten von Mikroorganismen können zusätzliche Referenzdaten für kultivierungsunabhängige Methoden geschaffen werden. Mit den gewonnenen Isolaten können gezielt Untersuchungen zur Charakterisierung oder deren Titer in den beprobten Biogasanlagen durchgeführt werden. Weiterhin sollte die Rolle der erhaltenen Isolate während des anaeroben Abbaus untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Gase

In den durchgeführten Versuchen wurden nachfolgende Chemikalien verwendet:

Chemikalie	Hersteller
Agar	Marcor, New Jersey, USA
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	Peqlab, Erlangen
L-Alanin	Roth, Karlsruhe
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
p-Aminobenzoesäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
D(-)-Arabinose	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(-)-Arabinose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Buttersäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Calciumpantothenat	Merck, Darmstadt
D(+)-Cellobiose	Roth, Karlsruhe
Cellulose (Sigmacell, Typ 20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cobalt(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Roth, Karlsruhe
Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumfumarat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst (99 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Folsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(-)-Fructose	Roth, Karlsruhe
D(+)-Galactose	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(-)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA

Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Karbol-Fuchsin	Merck, Darmstadt
Karbol-Gentianaviolett	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat(II)-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Laktose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Liponsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Lithium-Laktat	Merck, Darmstadt
Lugol'sche Lösung	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
D(+)-Maltose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Mangansulfat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
D(-)-Mannitol	Roth, Karlsruhe
D(+)-Mannose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Melibiose	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natrium-DL-Laktat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriummolybdat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
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
Polygalacturonsäure ($\geq 85\%$)	Roth, Karlsruhe
Propionsäure	Roth, Karlsruhe
Pyridoxinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
D(+)-Raffinose-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Resazurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Rhamnose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Riboflavin	Merck, Darmstadt
D(-)-Ribose	Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefel	Riedel-De Haen, Seelze
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe

L-Serin	Roth, Karlsruhe
Stärke	Roth, Karlsruhe
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Trehalose-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Marcor, New Jersey, USA
Vitamin B ₁₂	Roth, Karlsruhe
Xylan (aus Buchenholz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Xylose	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt

Zur Herstellung von Nährmedien wurden folgende Gase von der Firma Westfalen (Münster) bezogen: Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂ [v/v]), Gemisch Stickstoff/Kohlenstoffdioxid (80 % N₂, 20 % CO₂ [v/v]), Gemisch Wasserstoff/Kohlenstoffdioxid (80 % H₂, 20 % CO₂ [v/v]) und Stickstoff (100 % [v/v]).

2.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Im Folgenden werden die verwendeten Biochemikalien, Enzyme und Kits mit Herstellerangabe aufgeführt:

Biochemikalien und Enzyme	Hersteller
DNA-Größenstandard: 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: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)	Peqlab, Erlangen
Enhancer Solution P (5x)	Peqlab, Erlangen
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)	Peqlab, Erlangen
Oligonukleotide (100 µM)	
- für PCR	Sigma-Aldrich, Steinheim
- für qPCR	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PCR-Puffer Y mit (20 mM MgCl ₂ ; 10x)	Peqlab, Erlangen
PCR-Puffer <i>Pfu</i> mit MgCl ₂ (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
Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer	
- <i>Bsu</i> RI (10 U/µl) mit Puffer R (10x)	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - <i>HpaII</i> (10 U/μl) mit Puffer Tango | Thermo Fisher Scientific Waltham, USA |
| - <i>NotI</i> (10 U/μl) mit Puffer O (10x) | Thermo Fisher Scientific Waltham, USA |

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 |
|--------------------------------|-------------------------------|

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 |
|---|------------------------|

2.3 Geräte und Hilfsmittel

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Geräte und Hilfsmittel verwendet. Bei den Geräten wurde die vom Hersteller mitgelieferte Betriebssoftware verwendet.

Gerät**Hersteller**

Anaerobenzelt (Type B komplett)

Coy Laboratory Products, Michigan, USA

Autoklav: Tecnomara

Tecnomara, Fernwald

Brutschränke:

- | | |
|----------------------|--|
| - Heraeus (B 6120) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| - Memmert (GTR 0214) | Memmert, Schwabach |

Elektrophoresekammern:

- | | |
|--------------------------|------------------|
| - Sub-Cell® Model 96 | Bio-Rad, München |
| - Wide Mini-Sub® Cell GT | Bio-Rad, München |

Geldokumentationseinheit: Biovision CN3000

Vilber Lourmat, Eberhardzell

Heizblock HTM 130

HLC BioTech, Bovenden

Heizplatte mit Magnetrührer (RCT S26)

IKA®-Labortechnik, Staufen

HPLC:

- | | |
|--|------------------------|
| - Automatischer Probengeber: SIL-10A | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| - Controller: SCL-10AVP | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| - HPLC-Säule: Aminex®HPX-87H,
300 mm x 7,8 mm | Bio-Rad, München |
| - Pumpe: LC-10 ATVP | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| - Refraktometer: RID-10A | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| - Säulenofen: CTO-10A | Shimadzu, Kyoto, Japan |

- Vorsäule: Aminex®HPX-87H, 20 mm x 4,0 mm	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kulturschüttler	Brunswick Scientific, Edison, USA
Mikroskope:	
- Fluoreszenzmikroskop Modell BZ-8000 Filter DAPI-B (Ex 360/40; BA 460/50; DM 400)	Keyence, Neu-Isenburg
- Phasenkontrastmikroskop: Laborlux11	Leitz, Wetzlar
- Phasenkontrastmikroskop: Zeiss Axio-phot2	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
Software (ausgenommen Betriebssoftware von Laborgeräten)	
- Adobe Photoshop CS5 (Version 12.0 x 32)	Adobe Systems, München Altschul <i>et al.</i> , 1990
- BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (Stand: 06.10.2015)
- BlastP	
- ENZYME	Bairoch, 2000
- EzTaxon	Kim <i>et al.</i> , 2012
- FinchTV Version 1.4.0	Geospiza Inc, Seattle, USA
- GenDB	Meyer <i>et al.</i> , 2003
- MEGA6	Tamura <i>et al.</i> , 2013
- MetaCyc	Caspi <i>et al.</i> , 2014
- Microsoft Office 2010 und 2013	Microsoft, Redmond, USA
- Pfam	Finn <i>et al.</i> , 2014
- Priam	Claudel-Renard <i>et al.</i> , 2003
- Primer-Blast	Ye <i>et al.</i> 2012
- Random DNA Sequence Generator	http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm (Stand: 16.08.2015)
- ReversComplement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (Stand: 16.08.2015)
Spannungsgerät: Power Source 300 V	VWR, Darmstadt
Thermocycler:	
- S1000™ Thermal Cycler (PCR)	Bio-Rad, München
- Thermocycler Realplex ² egradient S Mastercycler (qPCR)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator FLX-20M	Vilber-Lourmat, Eberhardzell

Vakuumpumpen:

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| - Trivac D 4B | Leybold Vacuum, Köln |
| - Membran-Vakuumpumpe | Vacuubrand, Wertheim |
| Vortex-Gerät: Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, New York, USA |

Waagen:

- | | |
|-------------------|----------------------|
| - Laboratory L610 | Sartorius, Göttingen |
| - Analytic A120S | Sartorius, Göttingen |

Zählkammer (Kammertiefe 0,02 mm)

Brand, Wertheim

Zentrifugen:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| - Micro Star 17 | VWR, Darmstadt |
| - Sigma 2-16K | Sigma, Osterode |

2.4 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden bei der Durchführung der Versuche eingesetzt:

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

Einmalspritzen: Terumo syringe without needle

Leuven, Belange

Falcons: Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)

VWR, Darmstadt

Filter: (alle: 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:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - Bormioli: Injektionsflaschen (50 ml) mit Butylsepten und Alu-Bördelkappen | Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern |
| - Hungate-Röhrchen: Kulturröhrchen, 12,5 cm mit Lochkappe und Butylsepten | Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern |
| - Transfusionsflaschen mit Naturgummi-Septen und Aluminiumschraubkappen mit Loch | Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern |

Kanülen: BD Microlance™ 3 (verschiedene Durchmesser)

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Objekträger (76 x 26 cm)

Menzel, Braunschweig

Petrischalen aus Polystyrol

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Pipettenspitzen :

- TipOne: 10 µl, 200 µl und 1250 µl Starlab, Hamburg
- 10 ml Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße:

- PCR-Tubes (0,2 ml) 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

Vials für HPLC (mit Schraubkappen und Dichtscheiben) Macherey-Nagel, Düren

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Organismen

Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Organismen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und als Referenzstämme in molekularbiologischen Untersuchungen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in den Nährmedien DSMZ 104b mit Ausnahme des Stamms *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805 (Medium DSMZ 1328; vgl. Abschnitt 2.5.3). Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3, welches im Rahmen dieser Arbeit aus der thermophilen Biogasanlage in Viersen isoliert wurde, ist bei der DSMZ als Stamm DSM-29926 hinterlegt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Organismus	Sammlungsnummer	Medium ¹
<i>Clostridium kluyveri</i>	DSM-555	104b.1
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	DSM-1294	104b.1
<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	DSM-23805	1328a
<i>Dendrosporobacter quercicolus</i>	DSM-1736	104b.1 + Fructose statt Glucose
<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	DSM-21650	104b.1
<i>Selenomonas bovis</i>	DSM-23594	104b.1
<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	DSM-21804	287a + Glucose

¹ Zusammensetzung der Nährmedien vgl. Abschnitt 2.5.3.

2.5.2 Untersuchte Biogasanlagen

Für die Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Bakterien wurden eine thermophile Biogasanlage sowie drei mesophile Biogasanlagen beprobt. Diese wer-

den im Folgenden als BGA Butschen (thermophil), BGA Glahn, BGA Gebel und BGA Wagner (mesophil) gekennzeichnet. Die Anlagenparameter sowie die flüssigen und festen Inputstoffe sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Alle Biogasanlagen wurden mit dem nachwachsenden Rohstoff Maissilage gefüttert und wiesen pH-Werte zwischen 7,5 - 7,8 auf. Der Methangehalt betrug in den untersuchten Anlagen zwischen 51 und 56 %. Hinsichtlich der Verweilzeit und der Durchmischung der Substrate im Fermenter unterschied sich die thermophile von den mesophilen Biogasanlagen. Die Durchmischung der Substrate in der thermophilen BGA Butschen erfolgte durch eine Flüssigpumpe, die Verweildauer betrug 28 Tage. Dagegen war die Verweildauer der Substrate in den mesophilen Biogasanlagen länger (> 60 Tage), die Substrate wurden mit Rührwerken durchmischt.

Tabelle 2.2: Anlagenparameter der beprobten Biogasanlagen.

Anlagenparameter	BGA Butschen, Viersen	BGA Glahn, Zweibrücken	BGA Gebel, Oberthal	BGA Wagner, Steinweiler
Fermenter	NOVA-Fermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	FP ¹	LRW/TMRW ¹	LRW/TMRW ¹	LRW/TMRW ¹
V _{brutto} [m ³]	3 x 115	1 x 1200	1 x 1200	2 x 1000
Nachgärer	-	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	-	TMRW ¹	TMRW ¹	TMRW ¹
V _{brutto} [m ³]	-	1 x 1250	1 x 1200	1 x 1000
Hydrolyse	Hydrolyserohr	entfällt	entfällt	entfällt
Feste Inputstoffe	MS ² , RM ² , G ²	MS ² , GS ²	MS ² , GS ²	MS ²
Flüssige Inputstoffe	SG ²	SG ²	RG ²	-
Maisanteil	56 %	60 - 70 %	30 - 40 %	~ 100 %
Leistung	150 P _{el} [kW]	500 P _{el} [kW]	345 P _{el} [kW]	550 P _{el} [kW]
Temperatur	54 °C	ca. 43/53 °C ³	40 °C	45/46 °C
pH-Wert	7,8	7,8	7,5/7,6	7,8
Methangehalt	52 - 53 %	51 - 52 %	55 - 56 %	52 %
Verweilzeit	28 Tage	72 - 75 Tage	60 Tage	NV ¹

¹ FP = Flüssigpumpe; LRW = Langachsrührwerk; TMRW = Tauchmotorrührwerk; NV = keine Angaben verfügbar

² G = Gerste (Ganzpflanzensilage); GS = Grassilage; MS = Maissilage; RG = Rindergülle; RM = fester Rindermist; SG = Schweinegülle

³ Nachgärer thermophil

Von allen vier Biogasanlagen wurden Proben entnommen und für weitere Untersuchungen bei -18 °C eingefroren. Die Isolierung von Säure-bildenden Bakterien erfolgte aus frischem Probenmaterial (thermophile Biogasanlage Butschen) oder aus eingefrorenen Proben (mesophile Biogasanlagen). Weiterhin wurden Säure-bildende Bakterien aus zwei Hochdruck-Biogasfermentern der Universität Hohenheim isoliert. In diesen Fermentern (Füllvolumen 500 ml)

wurde mit Stickstoff ein Überdruck von 50 bzw. 100 bar eingestellt. Sie enthielten als Substrat Maissilage und hatten eine Prozesstemperatur von 38 °C. Nach 30 Tagen Versuchsdauer wurden aus den Fermentern Proben für die mikrobielle Analyse entnommen. Die Hochdruck-Biogas-Fermenter wurden für Untersuchungen zur direkten Einspeisung von aufgereinigtem Biogas in das Erdgasnetz entworfen.

2.5.3 Nährmedien zur Isolierung und Kultivierung von Säure-bildenden Bakterien

Für die Herstellung von anaeroben Nährmedien wurde zunächst entionisiertes Wasser durch Aufkochen entgast. Die Medienbestandteile wurden abgewogen und in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) unter Formiergasatmosphäre (95 % N₂/5 % H₂) mit dem abgekühlten Wasser vereinigt. Nach Zugabe der reduzierenden Agenzien Cystein-HCl x H₂O und Na₂S x 9 H₂O erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,8 - 7,0 mit konzentrierter Schwefelsäure oder Natriumhydroxid. Nach ca. 60 Minuten wurde das Nährmedium in Kulturgefäße aliquotiert, welche mit Butylstopfen verschlossen wurden. Die Nährmedien wurden mit N₂ bzw. N₂/CO₂ (80 % N₂: 20 % CO₂) begast (0,5 bar) und danach 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Bestandteile der Nährmedien sind in den Tabellen 2.3 - 2.6 aufgeführt.

Für die Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Bakterien wurde als Basis ein Mineralsalzmedium 287a verwendet (Tabelle 2.3; verändert nach DSMZ-Medium 287; DSMZ, 2007), welchem jeweils eine Haupt-Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurde. Als Kohlenstoffquellen wurden die Substrate Na⁺-DL-Laktat, Succinat, Glucose, Ethanol, Glycerin oder eine Mischung aus Aminosäuren (L-Alanin, L-Serin, L-Threonin, L-Glutaminsäure, L-Cystein und L-Methionin) hinzugefügt, aus welchen potentiell Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure durch Mikroorganismen gebildet werden können (vgl. Abschnitt 1.5).

Tabelle 2.3: Nährmedium 287a zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien (verändert nach DSMZ, 2007).

Nährmedium 287a	
KH ₂ PO ₄	0,30 g/l
NaCl	0,50 g/l
K ₂ HPO ₄	0,30 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,15 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,30 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g/l
NH ₄ Cl	2,00 g/l
NaHCO ₃	4,00 g/l
C-Quelle ¹	6,00 g/l
Vitaminstammlösung (Tabelle 2.4)	5,00 ml/l
Spurenelementstammlösung (Tabelle 2.4)	5,00 ml/l
Resazurin-stammlösung (1 mg/ml)	1,00 ml/l
destilliertes Wasser	990,00 ml
Agar (bei festen Nährmedien)	15,00 g/l
Cystein-HCl	0,50 g/l
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,50 g/l
pH-Wert	6,8 – 7,0
Atmosphäre	N ₂ bzw. N ₂ /CO ₂ (80/20)

¹ Zu dem Mineralsalzmedium wurde jeweils eine Kohlenstoffquelle (6 g/l) hinzugegeben: Na⁺-DL-Laktat, Succinat, Glycerin, Glucose, Ethanol oder eine Aminosäure-Mischung (mit jeweils 1 g/l L-Alanin, L-Serin, L-Threonin, L-Glutaminsäure, L-Cystein und L-Methionin).

In Tabelle 2.4 sind die Spurenelement- und Vitaminstammlösungen aufgeführt, welche dem Medium 287a hinzugefügt wurden.

Tabelle 2.4: Spurenelement- und Vitaminstammlösung für das Medium 287a (DSMZ, 2012a)

Spurenelementstammlösung		Vitaminstammlösung	
Nitrilotriessigsäure	1,50 g/l	Biotin	2,0 mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,00 g/l	Folsäure	2,0 mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0,50 g/l	Pyridoxin-HCl	10,0 mg/l
NaCl	1,00 g/l	Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	5,0 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g/l	Riboflavin	5,0 mg/l
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g/l	Nikotinsäure	5,0 mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g/l	D-Ca-Pantothenat	5,0 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g/l	Vitamin B ₁₂	0,1 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g/l	p-Aminobenzoessäure	5,0 mg/l
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,02 g/l	Liponsäure	5,0 mg/l
H ₃ BO ₃	0,01 g/l	destilliertes Wasser	1000,0 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g/l		
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g/l		
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,30 g/l		
destilliertes Wasser	1000,00 ml		
Zuerst die Nitrilotriessigsäure lösen und den pH-Wert mit KOH auf 6,5 einstellen, anschließend die anderen Bestandteile hinzugeben. Den pH-Wert final auf pH 7,0 (mit KOH) einstellen.			

Die weitere Kultivierung der gewonnenen Isolate erfolgte entweder in Medium 287a mit entsprechender Kohlenstoffquelle oder in den Medien 104b.1 (verändert nach DSMZ-Medium 104b; DSMZ, 2014) oder DSMZ 1328a (verändert nach DSMZ-Medium 1328; DSMZ, 2012b). Die Bestandteile der letztgenannten Nährmedien sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Nährmedium 1328a (verändert nach DSMZ, 2012b).

Nährmedium 1328a		Spurenelementlösung SL-10	
KH ₂ PO ₄	0,3 g/l	HCl (25 %; 7,7 M)	10,0 ml/l
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l	FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l	ZnCl ₂	70,0 mg/l
NaCl	1,0 g/l	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,0 mg/l
KCl	0,1 g/l	H ₃ BO ₃	6,0 mg/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g/l	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,0 mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g/l	CuCl ₂ 2 H ₂ O	2,0 mg/l
Spurenelementlösung SL-10	1,0 ml/l	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,0 mg/l
Hefeextrakt	1,0 g/l	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,0 mg/l
Schwefel (gepulvert)	10,0 g/l	destilliertes Wasser	990,0 ml/l
Trypton	2,0 g/l		
Na ₂ Fumarat	3,2 g/l	Zunächst FeCl ₂ x 4 H ₂ O in HCl lösen und mit Wasser verdünnen. Anschließend die restlichen Salze hinzufügen und auf 1000 ml auffüllen.	
NaHCO ₃	2,0 g/l		
Glucose	6,0 g/l		
Resazurinstammlösung (1 mg/ml)	1,0 ml/l		
destilliertes Wasser	1000,0 ml		
Cystein-HCl x H ₂ O	0,5 g/l		
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g/l		
pH-Wert	7,0		
Atmosphäre	N ₂ /CO ₂ (80/20)		

Tabelle 2.6: Nährmedium 104b.1 (verändert nach DSMZ, 2014).

Nährmedium 104b.1		Salzlösung 104	
Trypton	5,0 g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g/l
Hefeextrakt	10,0 g/l	K ₂ HPO ₄	1,00 g/l
Salzlösung 104	40,0 ml/l	KH ₂ PO ₄	1,00 g/l
Resazurinstammlösung (1 mg/ml)	1,0 ml/l	NaHCO ₃	10,00 g/l
Glucose	5,0 g/l	NaCl	2,00 g/l
destilliertes Wasser	960,0 ml	destilliertes Wasser	1000,00 ml
Cystein-HCl x H ₂ O	0,5 g/l		
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g/l		
pH-Wert	7,0		
Atmosphäre	N ₂		

2.5.4 Methoden zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien

Für die Isolierung von Säure-bildenden Bakterien aus Biogasanlagen wurden zunächst Anreicherungskulturen im Minimalmedium 287a mit jeweils einer spezifischen Kohlenstoffquelle hergestellt. Hierzu wurden 250 mg oder 500 mg einer Biogasprobe (Flüssigkeit mit Pflanzenresten) zu 5 ml oder 9 ml Nährmedium gegeben. Die Kulturen wurden als Standkultur bei 39 °C bzw. 54 °C inkubiert. Thermophile Anreicherungskulturen der BGA Butschen und Anreicherungskulturen der Hochdruck-Biogas-Fermenter wurden jeweils mit frischem Fermenterinhalt der jeweiligen Anlagen hergestellt. Für die Anreicherung von Säure-bildenden Bakterien aus den mesophilen Biogasanlagen wurden Fermenterproben aufgetaut, welche bei -18 °C eingefroren waren. Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die Isolierung von Säure-bildenden Bakterien aus Biogasanlagen. Nach Anreicherung der Bakterien in den Minimalmedien wurden diese zunächst in den entsprechenden Nährmedien dekadisch (10^{-1} bis 10^{-6}) verdünnt (Abbildung 2.1a). Für die Gewinnung von Reinkulturen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: anaerobes Ausplattieren (Abbildung 2.1b) und Tiefagar-Verdünnungsmethode (Abbildung 2.1c).

Anaerobes Ausplattieren

Beim anaeroben Ausplattieren wurden in einem Anaerobenzelt 50 - 100 µl einer verdünnten Anreicherungskultur auf Petrischalen ausplattiert, in welche zuvor das Nährmedium 287a mit jeweils einer Kohlenstoffquelle und 1,5 % (w/v) Agar gegossen wurde. Mit Hilfe von sterilen Einmalspateln und Einmalimpfösen wurden die Kulturen ausplattiert bzw. mittels Vereinzelungsausstrich vereinzelt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in speziellen Anaerobentöpfen, V2A-Edelstahlzylindern aus rostfreiem Stahl (Abbildung 2.1b). In diesen Anaerobentöpfen ist es möglich, die Gasatmosphäre auszutauschen und einen bestimmten Druck einzustellen. Die Methode des anaeroben Ausplattierens wurde mit Anreicherungskulturen der thermophilen BGA Butschen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 54 °C.

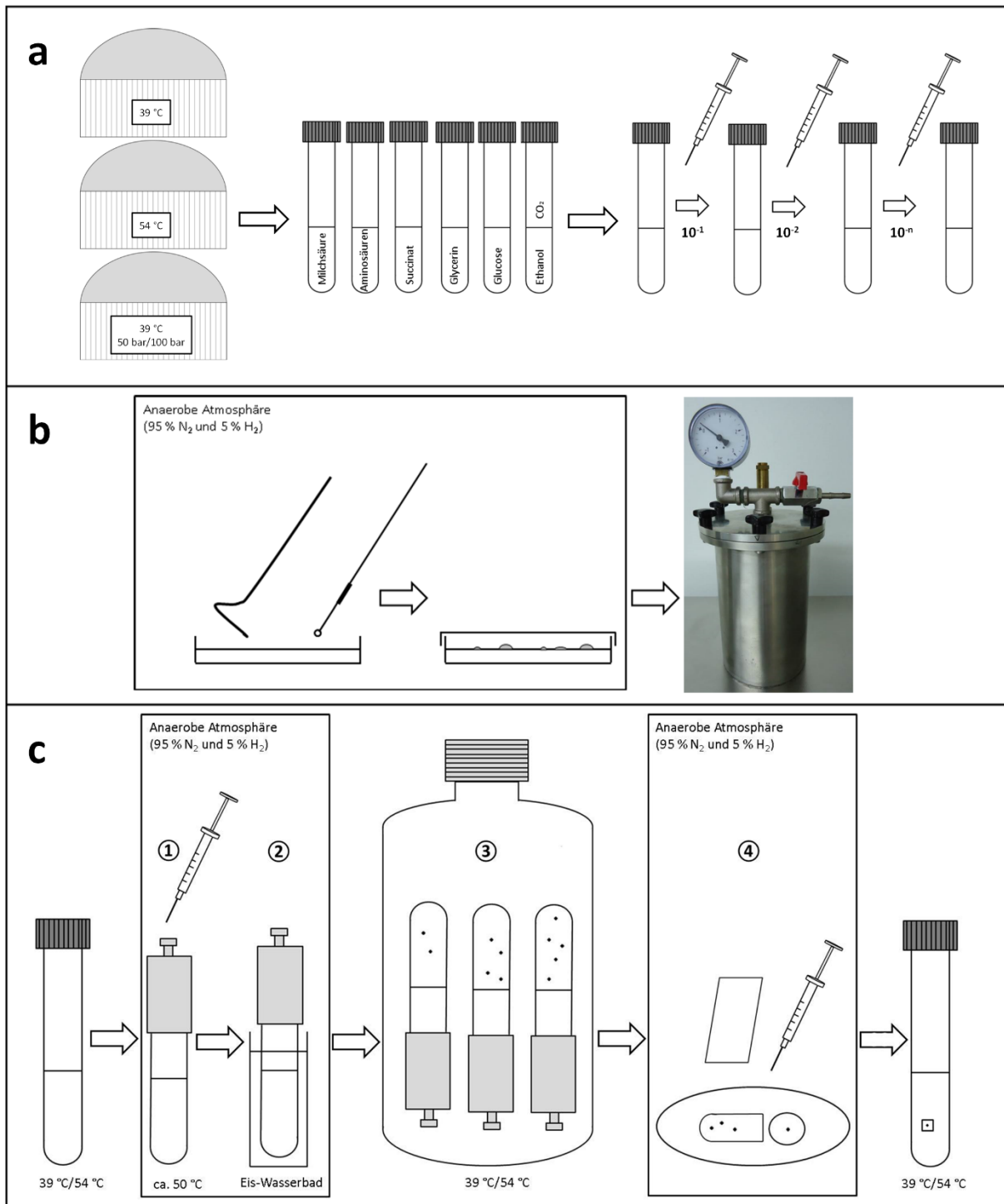


Abbildung 2.1: Isolierschema und Methoden zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien. (a) Für die Anreicherung von Säure-bildenden Bakterien wurden Proben aus Biogasanlagen entnommen und in Nährmedien mit verschiedenen C-Quellen inkubiert. Die Anreicherungskulturen wurden vor der weiteren Verwendung dekadisch verdünnt; (b) Anaerobes Ausplattieren und Inkubation der Kulturen in einem Anaerobentopf aus rostfreiem Stahl; (c) Tiefagar-Verdünnungsmethode: Dargestellt ist die Vorgehensweise. ① Aus einer (Anreicherungs-) Kultur wurde ein bestimmtes Volumen unter anaerober Atmosphäre entnommen und in etwa 50 °C heißem Tiefagar (Nährmedium mit 1,5 % [w/v] Agar) pipettiert. Nach Durchmischung wurde der noch flüssige Agar sofort in einem Eis-Wasser-Bad abgekühlt (②). ③ Die Kulturen wurden nach Aushärten des Agars kopfüber in einer Transfusionsflasche inkubiert, welche als „Anaerobentopf“ diente. ④ Bei Wachstum von Kolonien wurden diese mit Hilfe eines sterilen Deckgläschens und sterilen Kanülen unter anaerober Atmosphäre isoliert und in flüssiges Nährmedium überführt.

Tiefagar-Verdünnungsmethode

Als zweite Methode wurde die Tiefagar-Verdünnungsmethode angewendet. Abbildung 2.1c zeigt die einzelnen Arbeitsschritte dieser Methode. Unter anaerober Atmosphäre (95 % N₂/5 % H₂) wurden je 5 ml Nährmedium 287a in kurze Reagenzgläser überführt, in welche zuvor 1,5 % (w/v) Agar eingewogen wurden. Die Gefäße wurden anschließend mit einer Kappe verschlossen und in eine Transfusionsflasche (0,5 l bzw. 1 l) überführt, welche mit einem Septum und einem Aluminiumverschluss gasdicht verschlossen wurde. Die Transfusionsflasche diente als „Anaerobentopf“, in welcher ein Überdruck von 0,5 bar mit N₂ eingestellt wurde. Nach dem Autoklavieren wurden die Nährmedien auf ca. 50 °C abgekühlt. Zur Herstellung von Anreicherungskulturen in Tiefagar wurden 0,1 - 0,5 ml flüssige Anreicherungskultur in die auf 50 °C abgekühlten Nährmedien pipettiert und anschließend gemischt (Abbildung 2.1c ①), um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen im Nährmedium zu gewährleisten. Das Abkühlen der Tiefagar-Kulturen in einem Eis-Wasser-Bad verhinderte eine lange Aussetzung der Mikroorganismen in dem heißen Nährmedium (Abbildung 2.1c ②). Die auf diese Weise hergestellten Tiefagar-Röhrchen wurden kopfüber in einer Transfusionsflasche bei 39 °C oder 54 °C inkubiert (Abbildung 2.1c ③). Bei Wachstum von Kulturen im Tiefagar wurden die Agarstücke unter anaerober Atmosphäre (95 % N₂/5 % H₂) mit Hilfe einer sterilen Kanüle in eine sterile Petrischale überführt. Das Agarstück wurde anschließend mit sterilen Deckgläschen (24 mm x 60 mm) in Scheiben geschnitten. Die Kulturen wurden mittels Kanülen herauspräpariert und in flüssige Nährmedien überführt (Abbildung 2.1c ④), welche anschließend bei entsprechender Temperatur inkubiert wurden.

Zur Herstellung von Reinkulturen wurden die Isolate mindestens dreimal mit der jeweiligen Methode vereinzelt und mikroskopisch kontrolliert. Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; Abschnitt 2.3) wurden die Anreicherungskulturen und Isolate auf Säurebildung hin analysiert.

2.5.5 Physiologische Charakterisierung der Isolate

Um die Rolle der gewonnenen Isolate in Biogasanlagen zu untersuchen, wurden sechs Isolate (L3, L14, Gluc4, SG1.4B, GlyW3.4 und ASG2.3) ausgewählt, mit denen verschiedene physiologische Tests durchgeführt wurden. Hierbei wurden die Zellmorphologie und das Verhalten der Isolate bei der Gram-Färbung untersucht. Mit Hilfe von Substratverwertungsversuchen wurde untersucht, an welchen Stufen des anaeroben Abbaus die Isolate beteiligt sein können.

Zellmorphologie

Mikroskopische Untersuchungen der Isolate erfolgten mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops Zeiss Axiophot2 (Zeiss, Oberkochen) und dem Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence, Neu-Isenburg). Das letztgenannte Mikroskop besaß ein Filterset für 4'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ($\lambda_{\text{Absorption,max}} = 359 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission,max}} = 461 \text{ nm}$). Für die Anfärbung von Zellen mittels DAPI wurden 100 - 300 μl einer Flüssigkultur 2 Minuten bei 9600 x g abzentrifugiert und anschließend mit 300 μl steriler 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen. Das Zellpellet wurde in 300 μl steriler 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen und mit 1 μl einer DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Dunkeln wurden 30 - 50 μl der Bakteriensuspension auf einen Objektträger pipettiert, luftgetrocknet und im Anschluss mikroskopiert.

Gram-Färbung

Das Verhalten von Bakterien bei der Gram-Färbung aufgrund von unterschiedlichen Zellwandstrukturen ist ein wichtiges taxonomisches Merkmal. Im Gegensatz zu grampositiven Bakterien wird bei gramnegativen Bakterien der durch Gentianaviolett-Jodlösung gebildete Farbkomplex durch 96 %iges Ethanol extrahiert (Fuchs, 2007). Zur Untersuchung des Verhaltens der gewonnenen Isolate bei der Gram-Färbung wurden 5 - 10 μl einer Reinkultur auf einen Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und hitzefixiert. Die Zellen wurden anschließend für 3 Minuten mit Karbol-Gentianaviolett bedeckt. Die Färbelösung wurde mit Lugol'scher Lösung abgespült und 4 Minuten mit dieser Lösung bedeckt. Der Objektträger wurde im Anschluss daran in 96 % Ethanol eingetaucht, bis keine Farbwolken mehr aufgestiegen sind. Nach Abspülen der Objektträger mit Wasser wurden die Zellen mit Hilfe von Karbol-Fuchsin 10 Sekunden gegengefärbt, der Farbstoff mit Wasser abgespült und die Zellen mikroskopiert.

Substratverwertung

Für die Einordnung der ausgewählten Isolate in die Abbaustufen der anaeroben Abbaukette wurde die Substratverwertung der Isolate untersucht. Hierzu wurde das Minimalmedium 287a (Abschnitt 2.5.3) mit jeweils 0,3 - 0,5 % einer der folgenden Kohlenstoffquellen hergestellt: Arabinose, Buttersäure, Cellobiose, Cellulose (mikrokristallin), Essigsäure, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerin, H_2/CO_2 , Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Milchsäure, Polygalacturonsäure, Propionsäure, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Stärke, Trehalose, Xylan und Xylose. Im Falle von H_2/CO_2 wurde in den Reaktionsgefäßen ein Überdruck von 1,5 bar ein-

gestellt. Diese Nährmedien wurden mit 50 - 100 µl gut angewachsener Vorkulturen versetzt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt, die Auswertung erfolgte fünf bis acht Wochen später. Als Kontrollen dienten die unbeimpften Nährmedien. Die Verwertung der Substrate sowie die Bildung von Zwischen- oder Endprodukten (Buttersäure, Essigsäure, Milchsäure, Propionsäure) wurde mit Hilfe der HPLC (Abschnitt 2.6) nachgewiesen.

2.6 Analytische Methode: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In den Anreicherungs- und Vereinzlungskulturen wurde mit Hilfe der HPLC überprüft, ob aus den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure gebildet wurde. Diese Methode erlaubt eine Trennung von kleinen Stoffmengen. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standard konnten diese Stoffmengen identifiziert und quantifiziert werden.

Die Auftrennung der Proben erfolgte mit der Säule Hpx87 (Größe: 300 x 7,8 mm, 9 µm Partikelgröße) der Firma Bio-Rad (München) und die Analyse mit dem RI-Detektor RID-10A, (Shimadzu, Duisburg). Bei der verwendeten Säule handelt es sich um einen Kationenaustauscher auf Styrol-Divinyl-Basis in H-Form. Bei dieser Säule werden mehrere Trennprinzipien angewendet: Unter anderem erfolgt die Trennung aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen sowie unterschiedlicher Größe und Ladung der Substanzen. Folgende Substanzen konnten (Substrate, Stoffwechselprodukte) analysiert werden: Arabinose, Buttersäure, Essigsäure, Ethanol, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerin, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Milchsäure, Propionsäure, Rhamnose, Ribose, Trehalose und Xylose.

Als mobile Phase wurde 0,005 M Schwefelsäure eingesetzt. Hierfür wurde MilliQ-Wasser verwendet, welches zunächst mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen 0,2 µm-Cellulose-Acetat-Filter filtriert und im Anschluss im Exsikkator unter Vakuum entgast wurde. Folgende Parameter wurden bei der HPLC eingestellt: Injektionsvolumen 10 µl, Flussrate der Pumpe 0,6 ml/min. Die Temperatur des Säulenofens betrug 65 °C. Vor der Messung wurden die Proben durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 14300 x g und eine anschließende Aufreinigung durch einen Filter (0,2 µm Porengröße, Macherey-Nagel, Düren) vorbereitet.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Biogasanlagen

Für die Identifizierung von Bakterien-Isolaten sowie für weitere molekularbiologische Untersuchungen wurde genomische DNA aus Reinkulturen mit Hilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kits nach dem Protokoll für grampositive Bakterien (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurden je nach Zelldichte 600 - 1000 µl einer Flüssigkultur 5 Minuten bei 7500 x g abzentrifugiert und anschließend in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Die weitere Isolierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte in 180 µl statt in 200 µl AE-Puffer. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -18 °C gelagert.

Die Isolierung genomischer DNA aus Reaktorproben der untersuchten Biogasanlagen zur Quantifizierung der erhaltenen Isolate mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR) erfolgte mit Hilfe des „GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx“ (Roboklon, Berlin). Pro Biogasanlage wurden 200 mg Reaktorsubstrat in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß 10 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal in steriler 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und anschließend im Puffer der „Bead-Tubes“ des DNA-Isolierungskits aufgenommen. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die DNA isoliert und in 120 µl „Elution Buffer“ aufgenommen.

2.7.2 Amplifizierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens

Zur Identifizierung von unbekanntem Organismen werden häufig partielle Bereiche des ribosomalen 16S rRNA-Gens amplifiziert und mit hinterlegten Sequenzen in Datenbanken verglichen. Das 16S rRNA-Gen ist Teil der Ribosomen und kommt in allen Prokaryoten vor. Das Gen ist ca. 1500 bp lang und weist sowohl konservierte als auch variable Regionen auf. Bei der Amplifizierung binden die Oligonukleotide hierbei an konservierte Regionen am 5'- und 3'-Ende des 16S rRNA-Gens. Neben einem Vergleich der Sequenzen mit Datenbanken können die Sequenzen auch zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen verwendet werden (Abschnitt 2.7.7; Baker *et al.*, 2003; Pfannebecker, 2008). Weiterhin können die Amplifikate der 16S rDNA mit Restriktionsenzymen verdaut werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung können die Fingerprintmuster zur Identifizierung herangezogen werden (Abschnitt 2.7.5).

In Tabelle 2.7 sind das PCR-Programm und der PCR-Ansatz zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens angegeben.

Tabelle 2.7: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens.

PCR-Programm				PCR-Ansatz (1x, 50 µl)	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	15 min	Forward-Primer ¹	1,0 µl
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Reverse-Primer ¹	1,0 µl
3	Annealing	56 °C	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,0 µl
4	Elongation	72 °C	1,5 min	MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2			PCR-Puffer Y (10x)	5,0 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	Enhancer Solution P (5x)	5,0 µl
				PCR-Wasser	32,6 µl
				Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
				Template-DNA	2,0 µl
				Gesamtvolumen	50,0 µl

¹ Forward-Primer: PurEubak5 (10 µM); Reverse-Primer: PurEubak3 (10 µM).

Die Amplifizierung erfolgte mit Hilfe der konservierten Primer PurEubak5 und PurEubak3 (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Verwendete Primer zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Primer	Basensequenz (5' → 3')	Länge	GC-Gehalt	T _m	Literatur
PurEubak3	AGAAAGGAGGTGATCC	16 bp	50 %	54,1 °C	Pfannebecker, 2008
PurEubak5	AGAGTTTGATCMTGGCT	17 bp	44 %	53,5 °C	

T_m = Schmelztemperatur, bp = Basenpaare

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte zunächst elektrophoretisch analysiert, aufgereinigt und anschließend sequenziert (Abschnitte 2.7.3 und 2.7.4).

2.7.3 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der erhaltenen PCR-Amplifikate erfolgte in einem 1,5 %igen (w/v) Agarosegel bei 120 Volt. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer (1x) verwendet, welcher aus 10x-TBE-Puffer (Tabelle 2.9) hergestellt wurde. 5 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Ladepuffer (6x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als DNA-Größenstandard dient der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot).

Tabelle 2.9 Zusammensetzung des TBE-Puffers.

TBE-Puffer (10x)	
TRIS	108,00 g/l
Borsäure	55,00 g/l
Na ₂ EDTA	7,44 g/l
pH	8,3

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte wurde das Gel 20 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) inkubiert. Die photographische Dokumentation erfolgte in einer Geldokumentationseinheit unter UV-Licht (BioVison CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell). Die Bearbeitung der Gelbilder erfolgte mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, München).

2.7.4 Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA-Sequenz

Nach Amplifizierung des 16S rRNA-Gens und anschließender gelelektrophoretischer Analyse wurden die Amplifikate zunächst mit den PCR-Aufreinigungskits ‚GenElute™ PCR CleanUp Kit‘ der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) oder USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) aufgereinigt. Bei dem letztgenannten Aufreinigungskit wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP-IT-Reagenz 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend 25 Minuten bei 80 °C erhitzt.

Zur Sequenzierung der PCR-Fragmente wurden 2 µl je eines Primers zu dem aufgereinigten PCR-Produkt hinzugefügt. Die 16S rDNA wurde nach der Sanger-Methode durch die Firma LGC (Berlin) sequenziert. Die Auswertung der Sequenziererergebnisse erfolgte mit der Software FinchTV (Version 1.4.0) der Firma Geospiza (Seattle, USA). Bei einer Sequenzierung des PCR-Produkts mit Forward- und Reverse-Primer, wurde das Sequenziererergebnis eines Primers zunächst revers komplementär umgeschrieben (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html, Stand: 16.08.2015). Anschließend wurden die DNA-Sequenzen zusammengeführt.

Zur Identifizierung wurden 16S rDNA-Sequenzen der Isolate mit der GenBank-Datenbank BLAST (Altschul *et al.*, 1990) oder der Datenbank EzTaxon (Kim *et al.*, 2012) verglichen. Neben der Identifizierung der Isolate anhand der Sequenzen der 16S rDNA wurden manche Isolate auch mittels zweier molekularer Fingerprintmethoden verglichen und identifiziert: Restriktionsverdau und ‚Specifically amplified polymorphic DNA-PCR‘ (SAPD-PCR). Diese Methoden werden in den Abschnitten 2.7.5 und 2.7.6 erläutert.

2.7.5 Vergleich der Isolate mittels Restriktionsverdau

Bei der Methode des Restriktionsverdaus wurde zunächst das 16S rRNA-Gen mit Hilfe von Primern amplifiziert, welche an konservierte Bereiche des Gens banden. Anschließend wurden die entstandenen Amplifikate mittels Restriktionsenzymen an definierten Erkennungssequenzen geschnitten. Durch den Restriktionsverdau entstanden unterschiedlich lange DNA-Fragmente, welche nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu Fingerprintmuster führten. Anhand dieser Fingerprintmuster konnten Isolate der vorliegenden Arbeit in Gruppen zusammengefasst werden. Durch die Sequenzierung der 16S rDNA eines Isolates konnten somit auch die anderen Isolate dieser Gruppe identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das 16S rRNA-Gen mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 2.7.2). Anschließend wurden die entstandenen PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *BsuRI* (Schnittstelle 5'-GG[^]CC-3') bzw. *HpaII* (Schnittstelle 5'-C[^]CGG-3') verdaut. Zu 8,7 µl PCR-Produkt wurden 0,3 µl Restriktionsenzym sowie 1 µl Puffer pipettiert. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 30 °C über Nacht und die Inaktivierung des Restriktionsenzym am nächsten Tag für 15 Minuten bei 65 °C. Die Auswertung des Restriktionsverdaus erfolgte auf einem 2,5 %igem (w/v) Agarosegel bei 60 Volt für drei Stunden. In die Gel-taschen wurde der gesamte Restriktionsansatz pipettiert, welcher zuvor mit 2 µl Ladepuffer (6x) versetzt wurde. Die Dokumentation der Gele erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben. Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

2.7.6 Vergleich der Isolate mittels SAPD-PCR

Bei der Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) handelt es sich um eine weitere Fingerprint-Methode (Pfannebecker und Fröhlich, 2008). Der bei dieser Methode verwendete Primer ist von der Erkennungssequenz des *NotI*-Restriktionsenzym abgeleitet. Eine ‚Rampe‘ im PCR-Programm, ein schrittweiser Temperaturanstieg zwischen Annealing und Elongation des eingesetzten Primers, gewährleistet eine reproduzierbare Bindung des Primers an die Template-DNA. Wie auch beim Restriktionsverdau konnten die Fingerprintmuster der einzelnen Isolate nach elektrophoretischer Auftrennung zur Identifizierung dienen. Im Gegensatz zum Restriktionsverdau wurde bei der SAPD-PCR kein PCR-Produkt, sondern genomische DNA eingesetzt.

Die SAPD-PCR wurde gemäß Pfannebecker und Fröhlich (2008) durchgeführt. Das PCR-Programm sowie der Reaktionsansatz für die SAPD-PCR sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die SAPD-PCR.

PCR-Programm				PCR-Ansatz (1x 25 µl)	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initial-Denaturierung	95	5 min	Primer: A-Not (50 µM)	1,0 µl
2	Denaturierung	94	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,0 µl
3	Annealing	35	1 min	MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
4	Rampe	35 (+ 0,5)	12 s	PCR-Puffer Y (10x)	2,5 µl
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4			PCR-Wasser	12,5 µl
6	Annealing	42,5	1 min	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,0 µl
7	Rampe	42,5 (+ 0,5)	12 s	Template-DNA	5,0 µl
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7			Gesamtvolumen	25,0 µl
9	Elongation	72	5 min		
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2				
11	Finale Elongation	72	10 min		

Für die PCR wurde der Primer A-Not verwendet, dessen Sequenz in Tabelle 2.11 aufgeführt ist.

Tabelle 2.11: Verwendeter Primer für die SAPD-PCR.

Primer	Basensequenz (5' → 3')	Länge	GC-Gehalt	T _m	Literatur
A-Not	AGC GGC CGC A	10 bp	80 %	47,6 °C	Pfannebecker und Fröhlich, 2008

T_m = Schmelztemperatur, bp = Basenpaare

Für die Auswertung der SAPD-PCR wurden 7 µl SAPD-PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer vereinigt und in die Geltaschen eines 1,5 %igen Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 60 Volt für ca. 2,5 Stunden. Die Gele wurden wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben dokumentiert.

2.7.7 Phylogenetische Untersuchung der Isolate

Phylogenetische Untersuchungen wurden mit 16S rDNA-Sequenzen der Isolate sowie der nächst verwandten Referenzstämme durchgeführt. Entsprechende Referenzdaten wurden der GenBank-Datenbank entnommen. Auf Grundlage dieser Sequenzen wurde ein Stammbaum

nach dem Neighbor-Joining-Modell (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Alignments der Sequenzen sowie Berechnung und Konstruktion der Stammbäume erfolgten mit dem Programm MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Evolutionäre Distanzen wurden über dieses Programm nach der Maximum Composite Likelihood-Methode berechnet (Tamura *et al.*, 2004). Weiterhin wurden über dieses Programm zur statistischen Absicherung Bootstrap-Analysen mit 1000 Wiederholungen durchgeführt (Felsenstein, 1985).

2.7.8 Entwicklung Isolat-spezifischer Primer

Zur Detektion ausgewählter Isolate in Biogasanlagen sowie zu deren Quantifizierung mittels qPCR wurden Primer mit Hilfe des Programms Primer-Blast (Ye *et al.*, 2012) entwickelt. Hierbei wurden die Primer von 16S rDNA-Sequenzen der Isolate GlyW3.4, ASG2.3, ASG1.4, SG1.4, LG2.4 und L3 abgeleitet. Weiterhin wurden Primer aus 16S rDNA-Sequenzen von nahe verwandten Referenzstämmen konstruiert, welche bei GenBank hinterlegt sind: *Desulfotomaculum australicum* (Accession-Nr. M96665.1), *Proteiniborus ethanoligenes* (Accession-Nr. NR_044093.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Accession-Nr. EU563362.1) und *Tepidanaerobacter syntrophicus* (Accession-Nr. NR_040966.1).

Abbildung 2.2 zeigt die schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Entwicklung Isolat-spezifischer Primer. Die von Primer-Blast vorgeschlagenen Primer wurden zunächst auf ihre Spezifität hin untersucht. Hierzu wurden die Primer mit den Datenbanken ‚Nucleotide collection (nt)‘ und ‚Nucleotide collection (nt) - (Organism limited to Bacteria)‘ innerhalb des Programms Primer-Blast abgeglichen. Zur weiteren Überprüfung der Primer, welche nach Datenbankabgleich spezifisch waren, wurden diese von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und in PCR-Amplifikationen eingesetzt. Diese PCR-Reaktionen sollten Aufschluss darüber geben, ob die entwickelten Primer spezifisch für die jeweiligen Isolate oder Referenzstämmen der DSMZ waren. Weiterhin wurde die von Primer-Blast vorhergesagte PCR-Produktlänge überprüft. Durch den Einsatz von genomischer DNA aus Biogasanlagen als Template-DNA wurde einerseits der Nachweis der Isolate in den Anlagen und andererseits die Generierung unspezifischer PCR-Produkte untersucht.

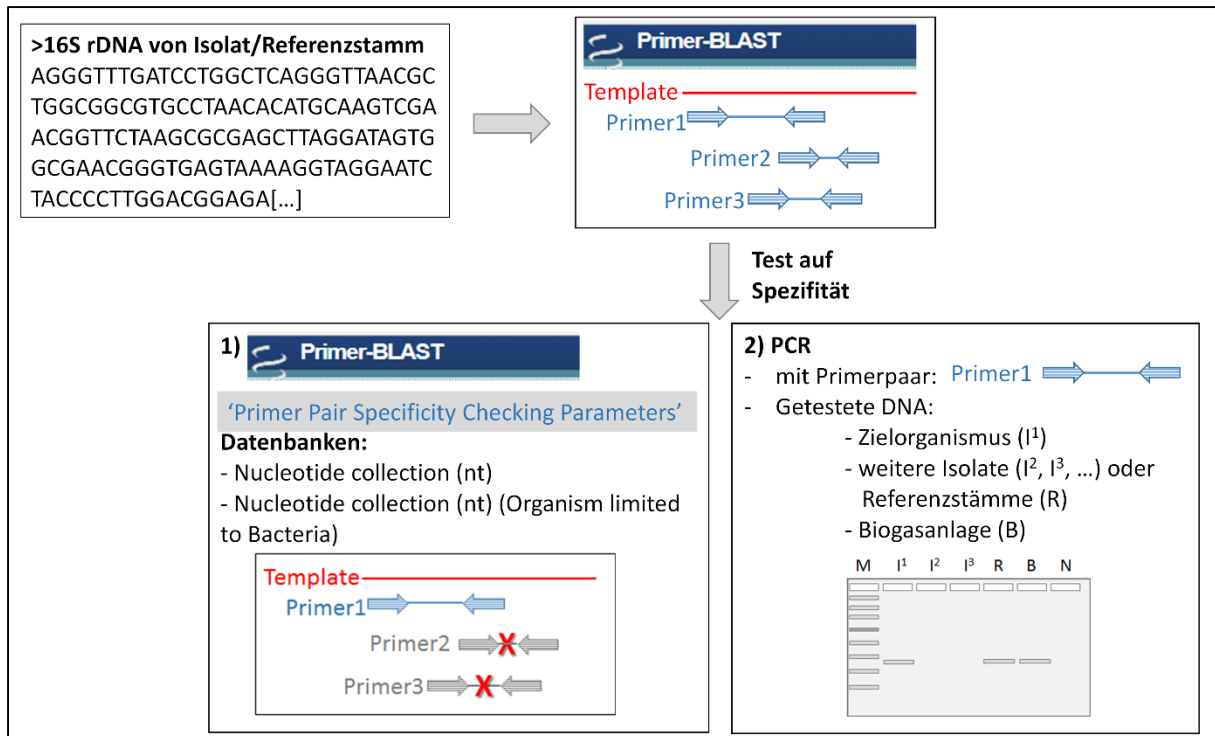


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Entwicklung Isolat-spezifischer Primer mit Hilfe des Programms Primer-Blast. Verwendet wurden Sequenzen der 16S rDNA von Isolaten oder Referenzstämmen. (1) Die Spezifität der Primerpaare wurde zunächst mit Datenbanken innerhalb des Programms Primer-Blast getestet. (2) Geeignete Primerpaare wurden anschließend in PCR-Reaktionen mit DNA von Isolaten (I¹, I², I³), Referenzstämmen (R) und Biogasanlagen (B) auf ihre Spezifität getestet. M = Marker, N = Negativkontrolle.

Neben den entwickelten Primern wurden zwei Primerpaare aus der Literatur hinzugezogen: das Primerpaar Bac338F/Bac805R (zur Detektion von Bakterien, Yu *et al.*, 2005) und das Primerpaar Tpf/Tpr (spezifisch für *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, Westerholm *et al.*, 2011a).

Tabelle 2.12 zeigt das PCR-Programm und den PCR-Ansatz zur Amplifizierung spezifischer Bereiche des 16S rRNA-Gens zum Test der entwickelten Isolat-spezifischen Primer. Als Template-DNA wurde DNA von Isolaten, Referenzstämmen oder Biogasanlagen eingesetzt.

Tabelle 2.12: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifizierung spezifischer Bereiche des 16S rRNA-Gens.

PCR-Programm				PCR-Ansatz (1x, 50 µl)	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	5 min	Forward-Primer (10 µM) ¹	1,0 µl
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Reverse-Primer (10 µM) ¹	1,0 µl
3	Annealing	59 °C	0,5 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,0 µl
4	Elongation	72 °C	0,5 min	MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2			PCR-Puffer Y (10x)	5,0 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	Enhancer Solution P (5x)	5,0 µl
				PCR-Wasser	32,6 µl
				Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
				Template-DNA	2,0 µl
				Gesamtvolumen	50,0 µl

¹ Verwendet wurden Isolat-spezifische Primer (Tabelle 2.13).

Die Auswertung der PCR erfolgte auf einem 1,5 %igen Agarosegel bei 120 Volt für 30 Minuten. Die Dokumentation wurde wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben durchgeführt.

Die in der PCR eingesetzten Primer und deren Parameter sind in Tabelle 2.13 aufgeführt. Weiterhin ist in der Tabelle angegeben, mit welchen DSMZ-Typstämmen ein PCR-Produkt mit den entsprechenden Primern in den durchgeführten PCR-Amplifikationen generiert wurde und mit welchen Bakterien laut Primer-Blast ein PCR-Produkt nach Datenbankabgleich vorhergesagt wird. Im Falle des Primerpaares Thesacfw/Thesacrev wurde laut Primer-Blast eine sehr große Gruppe getroffen, in der neben der Gattung *Thermoanaerobacterium* auch viele Arten der Gattungen *Bacillus*, *Paenibacillus* und viele weitere unterschiedliche Arten vorkommen. Ob tatsächlich ein PCR-Produkt mit diesem Primerpaar entsteht, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. In Tabelle 7.9 im Anhang 7.2 sind die Mikroorganismen aufgeführt, an deren DNA das Primerpaar Thesacfw/Thesacrev potentiell binden könnte.

Tabelle 2.13: Charakteristika der verwendeten Primer zur Amplifizierung spezifischer Bereiche der 16S rDNA.

Zielorganismus [16S rDNA GenBank Accession-Nr.] ¹	Primer	Primersequenz (5'→3')	Länge [bp]	Tm [°C]	GC-Gehalt [%]	PCR-Produkt [bp]	PCR-Produkt mit DSMZ-Typstamm ²	Vorhergesagte PCR-Produkt ³	Literatur
Bacteria	Bac338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	63,4	64,7	468	ND	ND	Yu <i>et al.</i> , 2005
	Bac805R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	20	60,7	47,6				
<i>Desulfotomaculum australicum</i> [M96665.1]	Desausfw	TCCCTGGTTCGCATGGACTG	20	61,4	60	419	ND	<i>Desulfotomaculum australicum</i>	diese Arbeit
	Desausrev	TGAGCTGCGGTATTTACCA	20	57,3	50				
GlyW3.4 (97 % <i>Selenomonas bovis</i>) [KT274741]	GlyW34fw	AATGTTGTGTACATTCGCATGAA	24	57,6	37,5	297	+ (DSM-23594)	<i>Selenomonas bovis</i>	diese Arbeit
	GlyW34rev	AACATTTCGTCCTCCGACAACA	20	57,3	50				
<i>Proteiniborus ethanolicus</i> [NR_044093.1]	Pr.eth.fw	CTTGACATCCCTCTGCCGTA	20	59,4	55	284	+ (DSM-21650)	<i>Proteiniborus ethanolicus</i>	diese Arbeit
	Pr.eth.rev	TTCGCAGCCTCGCTACC	17	57,6	64,7				
ASG2.3 (99 % <i>Clostridium sporosphaeroides</i>) [KT274731]	ASG2.3fw	ATGCATTAGGTGCCCTTCGG	20	59,4	55	282	+ (DSM-1294)	16S rDNA nicht in Datenbank hinterlegt	diese Arbeit
	ASG2.3rev	CTGAGATCGCTTTTGGGGGT	20	59,4	55				
<i>Tepidanaerobacter acetatoydans</i>	Tpf	AGGTAGTAGAGAGCGGAAAC	20	57,3	50	237	+ (DSM-21804)	<i>Tepidanaerobacter acetatoydans</i>	Westerholm <i>et al.</i> , 2011a
	Tpr	TGTCGCCCAGACCATAAA	18	53,7	50				
ASG1.4 (96 % <i>Proteiniborus ethanolicus</i>) [KT274729]	ASG1.4fw	GAGTGCTAGGTGTGGTGGG	20	61,4	60	220	- (DSM-21650)	nur Isolat	diese Arbeit
	ASG1.4rev	TCTGTCTCCGAAGAGAAAGGACTA	24	61	45,8				
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> [EU563362.1]	Thesacfw	TGCATGAAGACGGAGTTGCT	20	57,3	50	198	ND	⁴	diese Arbeit
	Thesacrev	CACCTTCCGATACGGCTACC	20	61,4	60				
SG1.4 (99 % <i>Clostridium kluyveri</i>) [KT274739]	SG14fw	AGGTAAAAATCGCATGATAAATGCC	28	58,1	36	146	+ (DSM-555)	<i>Clostridium kluyveri</i>	diese Arbeit
	SG14rev	TCAGTTCCAATGTGGCCGTT	20	57,3	50				
LG2.4 (100 % <i>Dendrosporobacter quercicolus</i>) [KT274720]	LakG2.4fw	AGATACATGCCTTCCCCTTTG	21	57,9	47,6	138	- (DSM-1736)	nur Isolat	diese Arbeit
	LakG2.4rev	GTTCCCGACCTTACTCGCTG	20	61,4	60				
AS34 (96 % <i>Tepidanaerobacter</i> sp.) [KT274714]	AS34fw	GCGACCCGAGGTTATCCGAG	20	63,5	65	137	- (DSM-21804)	nur Isolat	diese Arbeit
	AS34rev	TAGAGTGCCACCCAAAGTG	20	59,4	55				
L3 (100 % <i>Defluviitoga tunisiensis</i>) [KT274706]	L3fw	CCGCAGATACGGGTAGGAAC	20	61,4	60	130	+ (DSM-23805)	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	diese Arbeit
	L3rev	AGTGAGCATCGTTTACGGCT	20	57,3	50				
<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> [NR_040966.1]	Tepsynfw	GACACGGGGATAGCTTCGG	19	61	63,2	75	ND	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	diese Arbeit
	Tepsynrev	CGCTTTCTTTACACACCATTGGA	23	58,9	43,5				

ND nicht durchgeführt, + PCR-Produkt, - kein PCR-Produkt

¹ Die nächsten Verwandten durch Abgleich der 16S rDNA der Isolate sind in Klammern aufgeführt

² Referenzstämme: *Clostridium kluyveri* (DSM-555), *Clostridium sporosphaeroides* (DSM-1294), *Defluviitoga tunisiensis* (DSM-23805), *Dendrosporobacter quercicolus* (DSM-1736), *Proteiniborus ethanolicus* (DSM-21650), *Selenomonas bovis* (DSM-23594) und *Tepidanaerobacter acetatoydans* (DSM-21804)

³ Abgleich mit den Datenbanken "nucleotide collection (nt)" und "nucleotide collection (nt) (organism limited to bacteria)" mit dem Programm Primer-Blast

⁴ 100 %ige Primerbindung an DNA von *Clostridium difficile*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium thermoamylolyticum*, *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Thermoanaerobium lactoethylicum*, *Thermohydrogenium kirish-iense*

2.7.9 Titerbestimmung der Isolate in Biogasanlagen mittels qPCR

Die Quantifizierung der Isolate in Biogasanlagen erfolgte mit Hilfe der qPCR nach der Methode von May *et al.* (2015). Bei dieser Methode werden die Primer, welche bei der qPCR verwendet werden sollen, in einer synthetischen DNA-Sequenz zusammengefasst. Diese Sequenz wird anschließend als Standard für die Quantifizierung verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Abschnitt 2.7.8 entwickelten Isolat-spezifischen Primer sowie die beiden Primer aus der Literatur für die Konstruktion einer solchen synthetischen DNA-Sequenz verwendet. Die DNA-Sequenz wurde in 5' - 3'-Richtung konstruiert. Für die Erstellung dieser synthetischen Sequenz im Programm Word (Microsoft Office, 2013) wurden die Forward-Primer und die revers-komplementär umgeschriebenen Reverse-Primer verwendet. Bei der Konstruktion der Sequenz wurde darauf geachtet, dass die Länge der mit Primer-Blast ermittelten und durch die PCR bestätigten PCR-Produktlänge entspricht. Um Lücken zwischen den Primern zu schließen, wurden mit Hilfe des Programms „Random DNA Sequence Generator“ (<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>; Stand: 16.08.2015) willkürliche DNA-Sequenzen generiert und in die Sequenz eingefügt. Abbildung 2.3 zeigt die konstruierte, 796 bp lange synthetische DNA-Sequenz für die 13 Primerpaare (Tabelle 2.13).



Abbildung 2.3: Synthetische DNA-Sequenz (796 bp) für die Herstellung eines Standards zur Quantifizierung mittels qPCR. Die Sequenzen der Primer sind in den entsprechenden Farben markiert. Basenpaare, welche als Spacer zwischen den Primersequenzen dienen, sind grau gefärbt. Informationen zu den Primern sind in der Tabelle 2.13 aufgeführt.

Die in Abbildung 2.3 dargestellte synthetische DNA-Sequenz wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert und in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pEX-A2 kloniert. In dem Plasmid ist die konstruierte DNA-Sequenz von den Schnittstellen des *NotI*-Restriktionsenzym (Schnittstelle 5'-GC[^]GGCCGC-3') flankiert. Bei der Konstruktion der DNA-Sequenz wurde überprüft, dass die *NotI*-Schnittstelle in dieser nicht vorkommt.

Abbildung 2.4 zeigt die Vorgehensweise zur Quantifizierung der Isolate mit Hilfe der synthetisch hergestellten DNA-Sequenz.

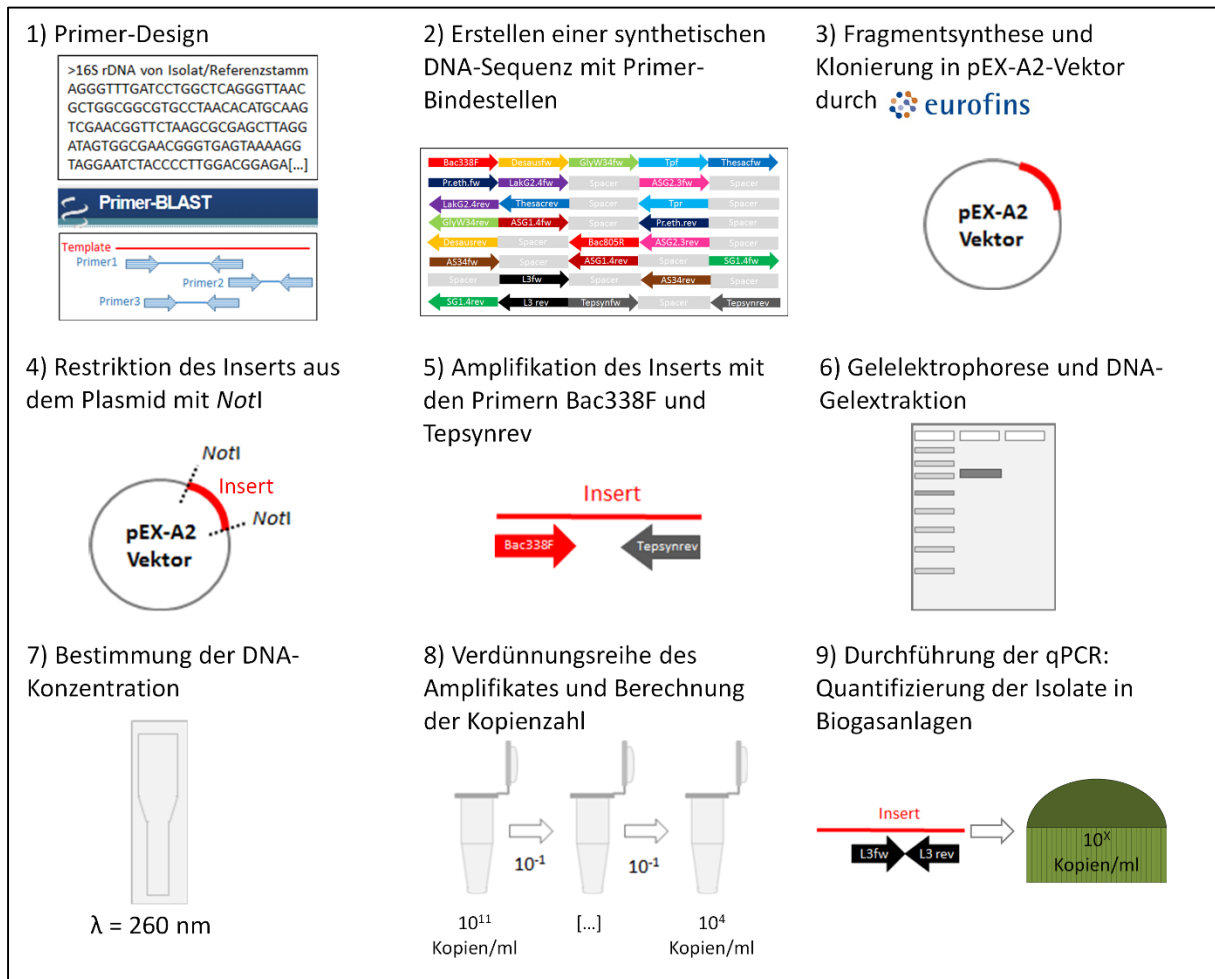


Abbildung 2.4: Vorgehensweise zur Quantifizierung der Isolate in Biogasanlagen. Mit den Isolat-spezifischen Primern wurde eine synthetische DNA-Sequenz konstruiert, welche von der Firma Eurofins synthetisiert und in einem Plasmid kloniert wurde. Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *NotI* wurde diese Sequenz aus dem Plasmid geschnitten. Nach Amplifizierung wurde die Sequenz im Gel aufgereinigt und die DNA aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration gemessen und die Kopienzahl/ml berechnet. Mit einer Verdünnungsreihe dieses Standards und der DNA aus Biogasanlagen wurden die Isolate mittels qPCR quantifiziert.

Das von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogene Plasmid wurde in 30 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die synthetische DNA-Sequenz in einem Restriktions-

tionsverdau mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem Plasmid geschnitten: 16 µl PCR-Wasser, 2 µl Buffer O 10x, 0,5 µl Plasmid-DNA und 1,5 µl *NotI*-Restriktionsenzym wurden zu einem 20 µl Restriktionsansatz vereinigt, 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und 20 Minuten bei 80 °C zur Inaktivierung des Restriktionsenzym erhitzt. Das Restriktionsenzym und der dazugehörige Puffer wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Nach dem Restriktionsverdau wurde das Insert des Plasmids mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) amplifiziert. Um das komplette synthetische DNA-Fragment (796 bp) zu amplifizieren, wurde der erste und letzte Primer der synthetischen DNA-Sequenz (Bac338F und Tepsynrev) eingesetzt (Abbildung 2.3). Das verwendete PCR-Programm und der Reaktionsansatz sind in Tabelle 2.14 wiedergegeben.

Tabelle 2.14: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung der synthetischen DNA-Sequenz.

PCR-Programm				PCR-Ansatz (1x 50 µl)	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	3 min	Forward-Primer ¹	2,5 µl
2	Denaturierung	95 °C	0,5 min	Reverse-Primer ¹ :	2,5 µl
3	Annealing	58 °C	0,5 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,25 µl
4	Elongation	72 °C	1,5 min	PCR-Puffer <i>Pfu</i> (10x)	5,0 µl
5	30 Zyklen beginnend bei Nr. 2			PCR-Wasser	37,75 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	2,5 µl
				Template-DNA ²	3,0 µl
				Gesamtvolumen	50,0 µl

¹ Forward-Primer: Bacfw (10 µM), Reverse-Primer: Tepsynrev (10 µM).

² Template-DNA: Produkt aus Restriktionsverdau.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel bei 100 Volt 60 Minuten aufgetrennt. Nach Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) wurde die Bande in der erwarteten Größe von ca. 800 bp mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „GenElute™ GelExtraktion“-Kit von Sigma (St. Louis, USA) extrahiert. Im Anschluss daran erfolgte die Quantifizierung des PCR-Amplifikats mit dem Gerät BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit der ermittelten DNA-Konzentration (45 ng/µl) und der Gleichung nach Godornes *et al.* (2007) konnte die Anzahl der Kopien/µl bestimmt werden:

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

Für die Quantifizierung wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des Standards von 10^{11} bis 10^4 Kopien/ml in Nuklease-freiem PCR-Wasser hergestellt. Die quantitative Realtime-PCR wurde in einem ‚realplex² ep gradient S Mastercycler‘ der Firma Eppendorf durchgeführt. Tabelle 2.15 zeigt das PCR-Programm sowie den Reaktionsansatz für die qPCR.

Tabelle 2.15: Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR.

PCR-Programm				PCR-Ansatz (1x, 20 µl)	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	5 min	Forward-Primer (10 µM)	0,75 µl
2	Denaturierung	95 °C	15 s	Reverse-Primer (10 µM)	0,75 µl
3	Annealing	59 °C	30 s	Puffer SYBR Green	10 µl
4	Elongation	72 °C	20 s	PCR-Wasser	7 µl
5	40 Zyklen beginnend bei Nr. 2			Template-DNA	1,5 µl
6	Schmelzkurve	95 °C	15 s	Gesamtvolumen	20 µl
7		60 °C	15 s		
8	Temperaturanstieg	60 °C (+ 1 °C)	1 min		
9	35 Zyklen beginnend bei Nr. 8				
10		95 °C	15 s		

Für die Quantifizierung der Isolate wurden pro Primerpaar der Standard und die Negativkontrolle in einer Vierfachbestimmung, die einzelnen Biogasanlagen in einer Dreifachbestimmung mitgeführt.

Nach der Amplifizierung wurden die erhaltenen Daten mit dem Programm Excel (Microsoft Office, 2013) ausgewertet. Hierzu wurden die durch die Realtime-PCR erhaltenen cycle-threshold (ct)-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl/ml aufgetragen. Mit der daraus resultierenden Geradengleichung konnte die Kopienzahl/ml in den einzelnen Biogasanlagen für jedes Primerpaar berechnet werden.

2.7.10 Manuelle Annotation des Genoms von dem Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3

Um Einblicke in das Genom des Isolates *Defluviitoga tunisiensis* L3 zu erhalten und somit Rückschlüsse auf die Rolle dieses Isolates in Biogasanlagen ziehen zu können, wurde zunächst genomische DNA mit Hilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kits nach dem Protokoll für grampositive Bakterien (Qiagen, Hilden) isoliert. Für die Sequenzierung des Gesamtgenoms durch das Centrum für Biotechnologie „CeBiTec“ der Universität Bielefeld wurden 4 µg aufgereinigter DNA des Isolates verwendet. Die Sequenzierung wurde mit einem Illumina MiSeq-System durchgeführt (Maus *et al.*, 2015). In Zusammenarbeit mit [REDACTED] [REDACTED]


 wurde jedes einzelne Gen des Genoms von Isolat L3 manuell annotiert. Die Genomannotation erfolgte mit dem Programm GenDB, einem automatischen Genomannotationssystem für prokaryotische Genome. Bei der Annotation wurde die Aminosäuresequenz eines Gens mit den in Tabelle 2.16 aufgeführten Datenbanken verglichen.

Tabelle 2.16: Datenbanken und Programm zur Genomannotation. Stand: 16.08.2015.

Datenbank	Funktion	Webadresse	Literatur
BLASTP	Datenbank, in welcher Proteinsequenzen hinterlegt sind	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome	-
GenDB	Genomannotationssystem für prokaryotische Genome	https://gendb.cebitec.uni-bielefeld.de/cgi-bin/login.cgi?cookie_test=1	Meyer <i>et al.</i> , 2003
MetaCyc	Datenbank für Stoffwechselwege	http://metacyc.org/	Caspi <i>et al.</i> , 2014
Pfam	Datenbank für Proteinfamilien	http://pfam.xfam.org/search	Finn <i>et al.</i> , 2014
Priam	Enzymspezifische Profile für Stoffwechselweg-Vorhersagen	http://prodomweb.univ-lyon1.fr/priam/BLAST_SERVER/rpsblast.html	Claudon-Renard <i>et al.</i> , 2003
ENZYME	Datenbank für Enzym-Nomenklaturen	http://enzyme.expasy.org/	Bairoch, 2000

3. Ergebnisse

3.1 Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildende Bakterienisolate

Für die Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Bakterien wurde ein Mineralsalzmedium (Medium 287a) verwendet, welchem jeweils eine spezifische Kohlenstoffquelle (Na-DL-Laktat, Succinat, Glycerin, Glucose, Ethanol oder eine Aminosäure-Mischung aus Alanin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin) hinzugefügt wurde. Bei diesen Substraten handelt es sich um potentielle Zwischenprodukte der Hydrolyse oder primäre Gärprodukte der Acidogenese, welche beim anaeroben Abbau organischer Masse durch Mikroorganismen gebildet werden können.

Mit Hilfe dieses Minimalmediums und den Methoden des anaeroben Ausplattierens und der Tiefagar-Verdünnungsmethode konnten aus den untersuchten Biogasanlagen und Laborfermentern 49 Isolate identifiziert werden. Ein Schema zum Vorgehen bei der Isolierung ist in Abbildung 2.1 (Abschnitt 2.5.4) gegeben. In den folgenden Abschnitten werden die Isolate der thermophilen Biogasanlage (Abschnitt 3.1.1), der mesophilen Biogasanlagen (Abschnitt 3.1.2) sowie der Hochdruck-Biogas-Laborfermenter (Abschnitt 3.1.3) vorgestellt.

3.1.1 Säure-bildende Isolate aus einer thermophilen Biogasanlage

Aus der thermophilen Biogasanlage Butschen konnten 15 Isolate gewonnen werden, welche in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind. Zwei Isolate (Gluc2 und Gluc4) wurden durch anaerobes Ausplattieren erhalten, die restlichen 13 Isolate durch die Tiefagar-Verdünnungsmethode. Die Isolate konnten den Familien Clostridiaceae, Peptococcaceae, Thermoanaerobacteraceae, Thermoanaerobacterales Family III. Incertae sedis und Petrotogaceae zugeordnet werden, welche zu den Phyla Firmicutes und Thermotogae gehören.

Die meisten thermophilen Isolate (L2, L3, L5, V5, AS22, AS30, ASV2, Succ20 und Succ22) konnten als *Defluviitoga tunisiensis* identifiziert werden. Ein Restriktionsverdau der 16S rDNA der genannten Isolate mit den Restriktionsenzymen *Bsu*RI oder *Hpa*II führte zu sehr ähnlichen Fingerprintmustern (Abbildung 3.1). Zur Identifizierung dieser Organismengruppe wurden die 16S rDNA-Sequenzen von acht der neun Isolate mit den Datenbanken BLAST und EzTaxon verglichen, wobei sich eine 99 - 100 %ige Ähnlichkeit zu *Defluviitoga tunisiensis* zeigte. Von den erhaltenen Isolaten wurden vier Stämme aus einer Anreicherungs-

kultur mit Na-DL-Laktat als Kohlenstoffquelle, drei Stämme aus einer aminosäurehaltigen Anreicherungskultur und drei weitere Stämme aus einer succinathaltigen Anreicherungskultur gewonnen. Alle Isolate waren in der Lage, Essigsäure zu bilden.

Durch anaerobes Ausplattieren wurden die Isolate Gluc2 und Gluc4 erhalten, welche nicht imstande waren, in Tiefagar-Kulturen zu wachsen. Beide Stämme bildeten aus Glucose Essigsäure, Buttersäure und Milchsäure und besaßen eine 99 - 100 %ige Ähnlichkeit der 16S rDNA mit *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Weitere Vertreter der Ordnung Thermoanaerobacterales waren die Isolate AS34 und AS46, welche eine 96 %ige Übereinstimmung auf Basis der 16S rDNA mit *Tepidanaerobacter acetatoxydans* und *Tepidanaerobacter syntrophicus* aufwiesen. In dem Minimalmedium 287a mit der Aminosäuremischung bildeten sie Essigsäure und Propionsäure.

Das Isolat L14 stammte aus einer laktathaltigen Anreicherungskultur und bildete Essigsäure aus Laktat. Ein Vergleich der 16S rDNA mit den Datenbanken ergab eine 98 - 99 %ige Übereinstimmung zu den sulfatreduzierenden Bakterien *Desulfotomaculum australicum* und *Desulfotomaculum thermocisternum*. Im Medium 1328a mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Schwefel als Elektronenakzeptor wurde das Isolat D1 gewonnen, welches Glucose zu Essigsäure abbaute. Der nächste Verwandte dieses Isolates war *Tepidimicrobium xylanilyticum*.

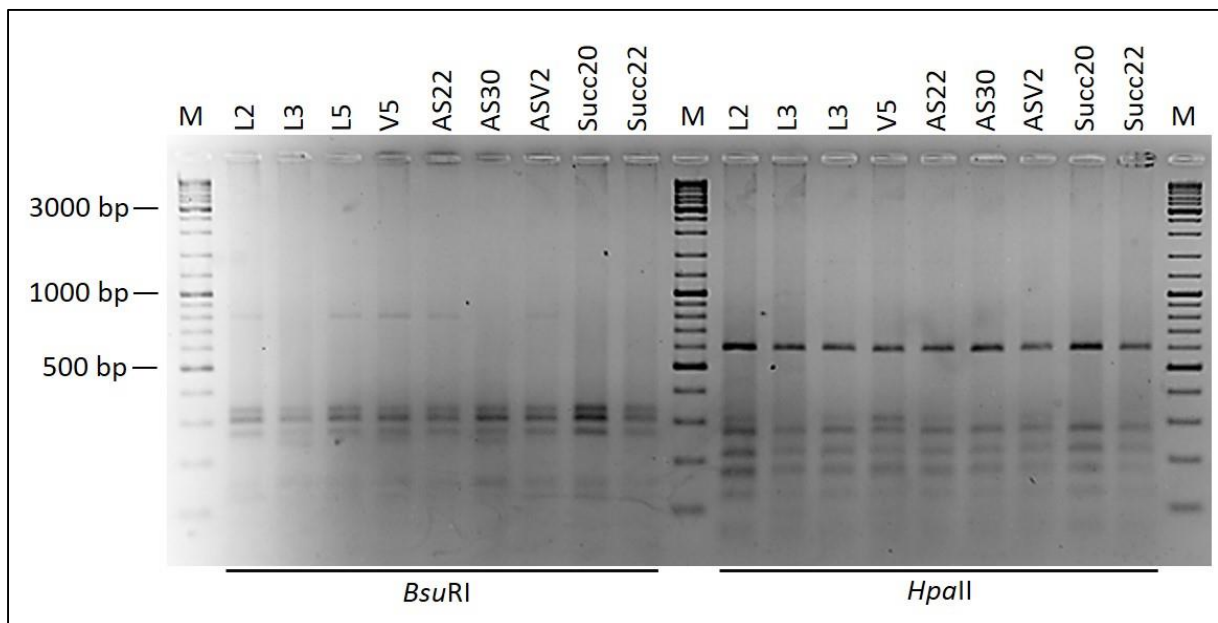


Abbildung 3.1: Restriktionsmuster der 16S rDNA thermophiler Isolate nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Beim Restriktionsverdau wurde die 16S rDNA der Isolate L2, L3, L5, V5, AS22, ASV2, Succ20 und Succ22 mit den Restriktionsenzymen *Bsu*RI und *Hpa*II verdaut. M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3).

Tabelle 3.1: Säure-bildende Isolate aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

Stamm	GenBank Accession-Nr.	Substrate	Gebildete Säuren	Fragment- länge [bp] ¹	Ähnlich- keit [%] ¹	Nächster Verwandter ¹	Familie	Ordnung	Phylum
D1	KT274718	Glucose ²	E	814 (814)	99	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> CS-3-1	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
L14	KT274713	Milchsäure	E	1375 (1375)	99	<i>Desulfotomaculum australicum</i> AB33	Peptococcaceae		
				1375 (1375)	98	<i>Desulfotomaculum thermoscisternum</i> DSM-10259			
AS34	KT274714	AS ³	E, P	1045 (1045)	96	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> Re2	Thermoanaero- bacteraceae	Thermoanaero- bacterales	
				1045 (1045)	96	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> JL			
AS46	KT274715	AS ³	E, P	1289 (1289)	96	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> JL			
				1289 (1289)	96	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> Re1			
Gluc2	KT274716	Glucose	B, E, M	1003 (1003)	100	<i>Thermoanaerobacterium thermosac- charolyticum</i> DSM-571	Thermoanaero- bacterales	Family III. Incertae Sedis	
Gluc4	KT274717	Glucose	B, E, M	1090 (1090)	100				
L2	KT274705	Milchsäure	E	459 (459)	100	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> SulfLac1	Petrotogaceae	Petrotogales	Thermotogae
L3	KT274706	Milchsäure	E	1499 (1499)	100				
L5	KT274707	Milchsäure	E	1253 (1253)	100				
V5	-	Milchsäure	E	-	⁴				
AS22	KT274708	AS ³	E	1241 (1241)	100				
AS30	KT274709	AS ³	E	556 (555)	99				
ASV2	KT274710	AS ³	E	1242 (1242)	100				
Succ20	KT274711	Succinat	E	791 (791)	100				
Succ22	KT274712	Succinat	E	600 (600)	100				

AS = Aminosäuren, B = Buttersäure, E = Essigsäure, M = Milchsäure, P = Propionsäure

¹ Anzahl der in die Datenbank EzTaxon oder BLAST eingegebenen Nukleotide der 16S rDNA (Anzahl abgeglicherer Nukleotide) sowie die Ähnlichkeit [%] des Isolates zum nächsten Verwandten.

² Bildung von Essigsäure in Medium DSMZ 1328a mit 0,5 % (w/v) Glucose.

³ Minimalmedium 287a mit je 1 g/l der Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin.

⁴ Identifizierung der Isolate mit Hilfe der Fingerprintmuster des Restriktionsverdaus (Abbildung 3.1).

3.1.2 Säure-bildende Isolate aus mesophilen Biogasanlagen

Mit Hilfe der Tiefagar-Verdünnungsmethode wurden 26 Isolate aus den drei untersuchten mesophilen Biogasanlagen erhalten, welche in Tabelle 3.2 aufgeführt sind. Phylogenetisch gehörten diese Isolate zu den Phyla Firmicutes und Thermotogae, welchen die Familien Clostridiaceae, Clostridiales Family XI. Incertae sedis, Lachnospiraceae, Peptococcaceae, Peptoniphilaceae, Ruminococcaceae, ‚unclassified Clostridiales‘, Veilonellaceae bzw. Petrotogaee angehören. Insgesamt handelte es sich bei den Isolaten um zwölf verschiedene Arten.

Acht Isolate setzten Milchsäure zu Essigsäure und Propionsäure um. Zwei Stämme (LG2.2 und LG2.3) wurden aus der Biogasanlage Gebel isoliert und wiesen ein ähnliches SAPD-Fingerprintmuster auf (Abbildung 3.2a). Durch einen Abgleich der 16S rDNA-Sequenz mit der Datenbank BLAST wurde Isolat LG2.3 als *Clostridium aminovalericum* identifiziert (99 % Sequenzähnlichkeit). Die anderen sechs Propionsäure-bildenden Bakterienstämme (LG2.4, LW3.1B, LW3.2, LW3.4, LW3.5 und LW3.6) stammten aus den Biogasanlagen Gebel und Wagner. Aufgrund ähnlicher Fingerprintmuster der SAPD-PCR konnten diese Isolate zu einer Gruppe zusammengefasst werden (Abbildung 3.2a). Vier dieser sechs Isolate hatten eine 95 - 100 %ige Ähnlichkeit auf Basis der 16S rDNA mit *Dendrosporobacter quercicolus* DSM-1736.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der SAPD-PCR mit genomischer DNA der Isolate ASG2.1A, ASG2.1B, ASG2.2, ASG2.3, ASW3.1, ASW3.2, ASW3.3, ASW3.5 und ASW3.6 führte zu fast identischen Fingerprintmustern aller Isolate (Abbildung 3.2b). Durch Abgleich der 16S rDNA von fünf Isolaten mit der Datenbank EzTaxon konnte diese Organismengruppe der Art *Clostridium sporosphaeroides* zugeordnet werden. Die Sequenzähnlichkeiten lagen bei 98 - 99 %. Die Stämme wurden aus den Biogasanlagen Gebel und Wagner isoliert und bildeten alle im aminosäurehaltigen Medium Essigsäure, teilweise in Kombination mit Propionsäure und Buttersäure. Ein weiteres Propionsäure-bildendes Isolat war GlyW3.4 aus der Biogasanlage Wagner, welches Glycerin zu Propionsäure umsetzte. Die höchste Sequenzähnlichkeit wies es zu *Selenomonas bovis* (97 %) auf. Weitere Stämme, welche Propionsäure und Buttersäure bildeten, waren ASG1.4 (96 % *Proteiniborus ethanoligenes*) und ASG1.4B (99 % *Clostridium cochlearium*, 99 % *Clostridium tetani*). Isolat ASG1.4 konnte Glutaminsäure zu Essigsäure und Buttersäure vergären, jedoch nicht die Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Cystein und Methionin.

Fünf weitere Essigsäure-bildende Isolate wurden aus den Biogasanlagen Glahn und Wagner gewonnen und konnten als *Defluviitoga tunisiensis* (Stamm LW3.3), *Sporanaerobacter aceti-*

genes (Stamm LakW3.3B) und *Clostridium kluyveri* (Stamm SG1.4) identifiziert werden. Stamm SG1.1 zeigte eine 100 %ige Ähnlichkeit zu den drei Arten *Desulfotomaculum guttoideum*, *Clostridium celerecrescens* und *Clostridium sphenoides*.

Bei zwei Isolaten konnten nur geringe Ähnlichkeiten zu den nächsten Verwandten festgestellt werden: Während Stamm SG1.4B eine Ähnlichkeit von 89 % zu *Gallicola barnesae* aufwies, zeigte das Isolat EG2.4 aus einer ethanolhaltigen Anreicherungskultur eine 93 %ige Übereinstimmung zu *Desulfotomaculum halophilum*. Beide Isolate bildeten aus Glucose bzw. Ethanol Essigsäure.

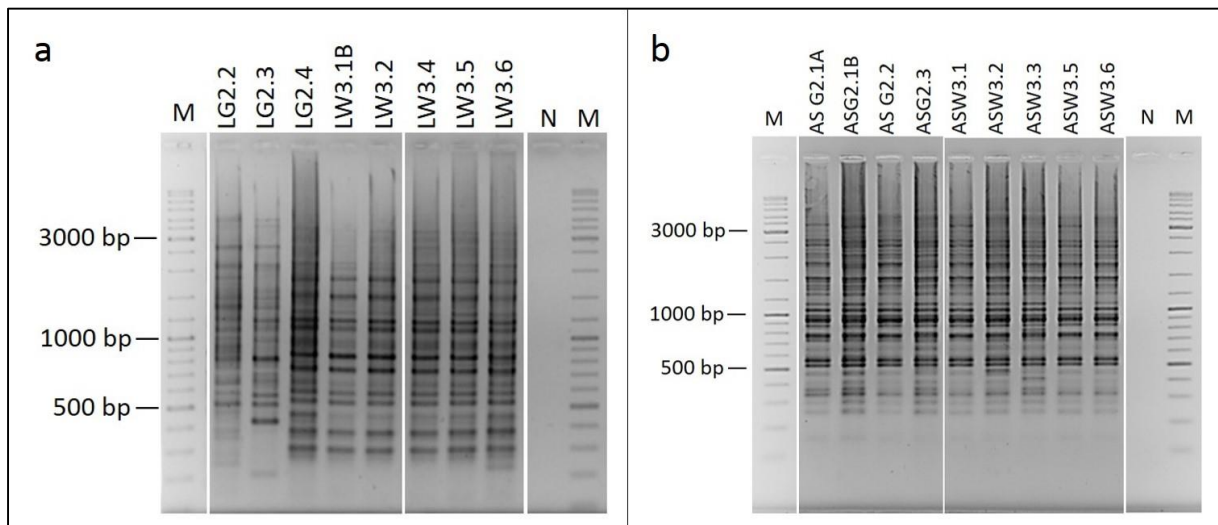


Abbildung 3.2: SAPD-PCR mit genomischer DNA verschiedener mesophiler Isolate nach gelelektrophoretischer Auftrennung. (a) Isolate aus Anreicherungskulturen mit Laktat als Kohlenstoffquelle; (b) Isolate aus Anreicherungskulturen mit der Aminosäure-Mischung als Kohlenstoffquelle. M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3), N = Negativkontrolle.

Tabelle 3.2: Säure-bildende Isolate aus den mesophilen Biogasanlagen Glahn, Gebel und Wagner.

Stamm ⁶	GenBank Accession-Nr.	Substrate	Gebildete Säuren	Fragmentlänge [bp] ¹	Ähnlichkeit [%] ¹	Nächster Verwandter ¹	Familie	Ordnung	Phylum
SG1.4	KT274739	Succinat	E	1181 (1181)	100	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM-555	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
ASG1.4B	KT274730	Glucose ³	B, E, P	990 (990)	99	<i>Clostridium cochlearium</i> JCM 1396			
				990 (990)	99	<i>Clostridium tetani</i> E88			
LW3.3B	KT274725	Glucose ²	E	783 (783)	99	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> DSM-13106	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis		
LG2.2	-	Milchsäure	E, P	-	⁵	<i>Clostridium aminovalericum</i> JCM 11016	Lachnospiraceae		
LG2.3	KT274719	Milchsäure	E, P	743 (742)	99				
SG1.1	KT274738	Succinat	E	1278 (1277)	100	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> DSM-4024			
				1278 (1276)	100	<i>Clostridium celerecrescens</i> DSM-5628			
				1278 (1272)	100	<i>Clostridium sphenoides</i> DSM-632			
EG2.4	KT274742	Ethanol	E	981 (981)	93	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> SEBR 3139	Peptococcaceae		
SG1.4B	KT274740	Glucose ³	E	1183 (1183)	89	<i>Gallicola barnesae</i> DSM-3244	Peptoniphilaceae		
ASG2.1A	-	AS ⁴	B, E	-	⁵	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> DSM-1294	Ruminococcaceae		
ASG2.1B	-	AS ⁴	B, E, P	-	⁵				
ASG2.2	-	AS ⁴	E,	-	⁵				
AG2.3	KT274731	AS ⁴	B, E, P	1255 (1235)	99				
AW3.1	-	AS ⁴	E	-	⁵				
ASW3.2	KT274732	AS ⁴	E	1312 (1288)	98				
ASW3.3	KT274733	AS ⁴	B, E	1239 (1238)	99				
ASW3.5	KT274734	AS ⁴	E	1287 (1266)	99				
ASW3.6	KT274735	AS ⁴	E	918 (902)	98				
ASG1.4	KT274729	AS ⁴	B, E, P	1288 (1288)	96,11	<i>Proteiniborus ethanolicus</i> GW	Unclassified Clostridiales		
LG2.4	KT274720	Milchsäure	E, P	981 (978)	100	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i> DSM-1736	Veilonellaceae		
LW3.1B	-	Milchsäure	E, P	-	⁵				
LW3.2	-	Milchsäure	E, P	-	⁵				
LW 3.4	KT274721	Milchsäure	E, P	906 (906)	96				
LW3.5	KT274722	Milchsäure	E, P	1011 (1011)	95				
LW3.6	KT274723	Milchsäure	E, P	663 (663)	97				
GlyW3.4	KT274741	Glycerin	M, P, S	1353 (1353)	97	<i>Selenomonas bovis</i> WG			
LW3.3	KT274724	Milchsäure	E	718 (715)	99	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> SulfLac1	Petrogaceae	Petrotogales	Thermotogae

AS = Aminosäuren, B = Buttersäure, E = Essigsäure, M = Milchsäure, P = Propionsäure

¹ Anzahl der in die Datenbank EzTaxon oder BLAST eingegebenen Nukleotide der 16S rDNA (Anzahl abgeglicherer Nukleotide) und die Ähnlichkeit [%] des Isolates zum nächsten Verwandten.

² Bildung von Essigsäure in Medium DSMZ 1328a mit 0,5 % (w/v) Glucose.

³ Bildung von Essigsäure in Medium DSMZ 104b.1.

⁴ Minimalmedium 287a mit je 1 g/l der Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin.

⁵ Identifizierung mit Hilfe der Fingerprintmuster der SAPD-PCR (Abbildung 3.2).

⁶ Nummern in der Stammbezeichnung zeigen den Herkunft der Isolate an: BGA Glahn (1,x), BGA Gebel (2,x), BGA Wagner (3,x).

3.1.3 Säure-bildende Isolate aus Hochdruck-Biogas-Laborfermentern

Aus den beiden Hochdruck-Biogas-Laborfermentern wurden acht Stämme mittels der Tiefagar-Verdünnungsmethode isoliert. Diese gehörten zu den Familien Bacillaceae, Clostridiales Family XI. Incertae Sedis, Enterococcaceae und Thermoanaerobacteraceae (alle Phylum Firmicutes) sowie zur Familie Acholeplasmataceae (Phylum Tenericutes). Tabelle 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der gewonnenen Isolate.

Isolat GlucSH52 war in der Lage, Glucose zu Essigsäure und Propionsäure zu vergären, und wurde als *Bacillus thermoamylovorans* identifiziert (100 % Ähnlichkeit der 16S rDNA). In den Kulturen der anderen Isolate konnte mit Hilfe der HPLC Essigsäure detektiert werden, welche beim Abbau von Milchsäure, Glucose oder Aminosäuren durch die entsprechenden Isolate entstanden ist.

Isolat GlucSH101 stammte aus dem Laborfermenter mit 100 bar Überdruck. Dessen nächste Verwandten waren die drei Arten *Bacillus firmus*, *Bacillus sibirialis* und *Bacillus circulans* (99 % Sequenzähnlichkeit). Weitere Isolate des 100 bar-Fermenters waren LakSH101 (100 % *Tepidanaerobacter acetatoxydans*) und ASSH103 (97 % *Tissierella creatinini* und 97 % *Tissierella praecuta*).

Neben dem bereits erwähnten Isolat GlucSH52 wurden aus dem Laborfermenter mit einem Überdruck von 50 bar Stamm LakSH53B (100 % *Tepidanaerobacter syntrophicus*), Stamm LakSH53A (99 % *Soehngenia saccharolytica*), Stamm GlucSH51 (99 % *Enterococcus casseliflavus*, 99 % *Enterococcus gallinarum*) sowie Stamm ASSH51 (92 % *Acholeplasma moorum*) isoliert.

Tabelle 3.3: Säure-bildende Isolate aus Hochdruck-Biogas-Laborfermentern.

Stamm	GenBank Accession-Nr.	Substrate	Gebildete Säuren	Fragment- länge [bp] ¹	Ähnlich- keit [%] ¹	Nächster Verwandter ¹	Familie	Ordnung	Phylum
GlucSH52	KT274744	Glucose	E, P	753 (752)	100	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> BHK67	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
GlucSH101	KT274745	Glucose	E	776 (776)	99	<i>Bacillus firmus</i> SS3			
				776 (776)	99	<i>Bacillus soralis</i> 171544			
				776 (776)	99	<i>Bacillus circulans</i> WRB-10			
LakSH53A	KT274726	Milchsäure	E	801 (801)	99	<i>Soehngenia saccharolytica</i> DSM-12858	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	Clostridiales	
ASSH103	KT274737	AS ³	E	586 (586)	97	<i>Tissierella creatinini</i> DSM-9508			
				586 (586)	97	<i>Tissierella praecuta</i> E064			
GlucSH51	KT274743	Glucose	E	738 (736)	99	<i>Enterococcus casseliflavus</i> RTCLI14	Enterococcaceae	Lactobacillales	
				738 (736)	99	<i>Enterococcus gallinarum</i> RTCL13			
LakSH53B	KT274727	Glucose ²	E	741 (741)	100	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> JL	Thermoanaerobactera- ceae	Thermoanaero- bacterales	
LakSH101	KT274728	Milchsäure	E	780 (780)	100	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> Re1			
ASSH51	KT274736	AS ³	E	596 (596)	92	<i>Acholeplasma morum</i> 72-043	Acholeplasmataceae	Acholeplasma- tales	Tenericutes

AS = Aminosäuren, B = Buttersäure, E = Essigsäure, M = Milchsäure, P = Propionsäure

¹ Anzahl der in die Datenbank EzTaxon oder BLAST eingegebenen Nukleotide der 16S rDNA (Anzahl abgeglicherer Nukleotide) sowie die Ähnlichkeit [%] des Isolates zum nächsten Verwandten.

² Bildung von Essigsäure in Medium DSMZ 1328a mit 0,5 % (w/v) Glucose.

³ Minimalmedium 287a mit je 1 g/l der Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin.

3.1.4 Phylogenetische Analyse der erhaltenen Isolate

Auf Basis der 16S rDNA-Sequenzen der thermophilen und mesophilen Isolate sowie der nächst verwandten Referenzstämme wurde mit Hilfe des Programms MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) ein phylogenetischer Stammbaum (Abbildung 3.3) nach der Neighbor Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Der Stammbaum wurde durch Bootstrap-Analysen nach der Maximum Likelihood-Methode statistisch abgesichert. Im finalen Datensatz zur Erstellung des Stammbaums waren 761 bp enthalten.

Mit Hilfe des Stammbaums wurden die Ergebnisse der Identifizierung überprüft, welche durch Abgleich der 16S rDNA-Sequenzen mit den Datenbanken BLAST und EzTaxon erhalten wurden (Tabellen 3.1 bis 3.3). Werte der Bootstrap-Analysen sind im Stammbaum an den Verzweigungen der Äste angegeben und waren an den terminalen „Hauptästen“, an denen die Isolate mit den Referenzstämmen ein Cluster bildeten, größer als 99 %.

Die Stammbaumanalyse auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenzen bestätigte die Verwandtschaft der einzelnen Isolate zu den jeweiligen Referenzstämmen (Abbildung 3.3). Sequenzähnlichkeiten über 97 % wurden durch nahe Positionierungen von Isolat zu Referenzstämmen im Stammbaum abgesichert. So gruppierte Isolat GlucSH101 mit den drei Arten *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans* und *Bacillus soralis*, Isolat GlucSH52 mit *Bacillus thermoamylovorans* und GlucSH51 mit den beiden Arten *Enterococcus casseliflavus* und *Enterococcus gallinarum*. Alle genannten Isolate wiesen eine 99 - 100 %ige Ähnlichkeit zu den jeweiligen Referenzstämmen auf. Eine Cluster-Bildung mit den nächsten Verwandten konnte auch bei folgenden Isolaten festgestellt werden: Isolat D1 mit *Tepidimicrobium xylanilyticum*, Isolat LW3.3B mit *Sporanaerobacter acetigenes*, Isolat LakSH53A mit *Soehngenia saccharolytica*, Isolat SG1.4 mit *Clostridium kluyveri*, Isolat LG2.3 mit *Clostridium aminovalericum*, die Isolate Gluc2 und Gluc4 mit *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* sowie Isolat GlyW3.4 mit *Selenomonas bovis*. Die genannten Isolate waren oberhalb des Artkriteriums von 97 % auf Basis der 16S rDNA (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die Stämme ASW3.2, ASW3.3, ASG2.3 und ASW3.5 gruppierten mit *Clostridium sporosphaeroides*, deren Sequenzidentitäten oberhalb von 98 % lagen. Die Isolate LW3.6, LW3.4, LG2.4 und LW3.5 aus den mesophilen Biogasanlagen Gebel und Wagner gruppierten zusammen in einem Ast des Stammbaums. Der nächste Verwandte zu dieser Gruppe war *Dendrosporobacter quercicolus* und wies eine größere Distanz zu der genannten Gruppe auf. Im untersten Ast des Stammbaums bildeten die Isolate des Phylums Thermotogae ein Cluster: Dazu gehörten die thermo-

philen Isolate L3, L5, AS22, ASV5 sowie das mesophile Isolat LW3.3. Die Sequenzähnlichkeit dieser Isolate zu *Defluviitoga tunisiensis* lag über 99 %.

Isolate, welche unterhalb die Artgrenze von 97 % fielen, zeigten auch innerhalb des Stammbaums größere evolutionäre Distanzen. Dies war der Fall bei Isolat EG2.4 (93 % *Desulfotomaculum halophilum*), Isolat ASG1.4 (96 % *Proteiniborus ethanoligenes*) und Isolat SG1.4B (89 % *Gallicola barnesae*).

Bei manchen Isolaten, welche auf Grundlage der 16S rDNA nicht eindeutig einer einzigen Art zugewiesen werden konnten, zeigten sich im Stammbaum folgende Positionierungen: Isolat ASG1.4B gruppierte näher mit *Clostridium cochlearium* als mit *Clostridium tetani* (beide 99 % Sequenzähnlichkeit zum Isolat). Isolat L14 war näher mit *Desulfotomaculum australicum* gruppiert als mit *Desulfotomaculum thermocisternum*. Nach einem Abgleich der 16S rDNA-Sequenz (1278 bp) des Isolates SG1.1 mit der Datenbank EzTaxon wurde eine 100 %ige Ähnlichkeit zu den Arten *Desulfotomaculum guttoideum*, *Clostridium celerecrescens* und *Clostridium sphenoides* festgestellt. Bei dem hier erstellten Stammbaum gruppierte das Isolat am nächsten mit *Desulfotomaculum guttoideum*.

Im Ast der Gattung *Tepidanaerobacter* wurde deutlich, dass die Isolate LakSH53B und LakSH101 mit *Tepidanaerobacter syntrophicus* bzw. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* ein Cluster bilden. Beide Isolate wiesen eine 100 %ige Ähnlichkeit der 16S rDNA mit den jeweiligen Referenzstämmen auf. Die beiden thermophilen Isolate AS34 und AS46 (96 %ige Identität mit der Gattung *Tepidanaerobacter*) bildeten innerhalb dieses Astes ein eigenes Cluster.

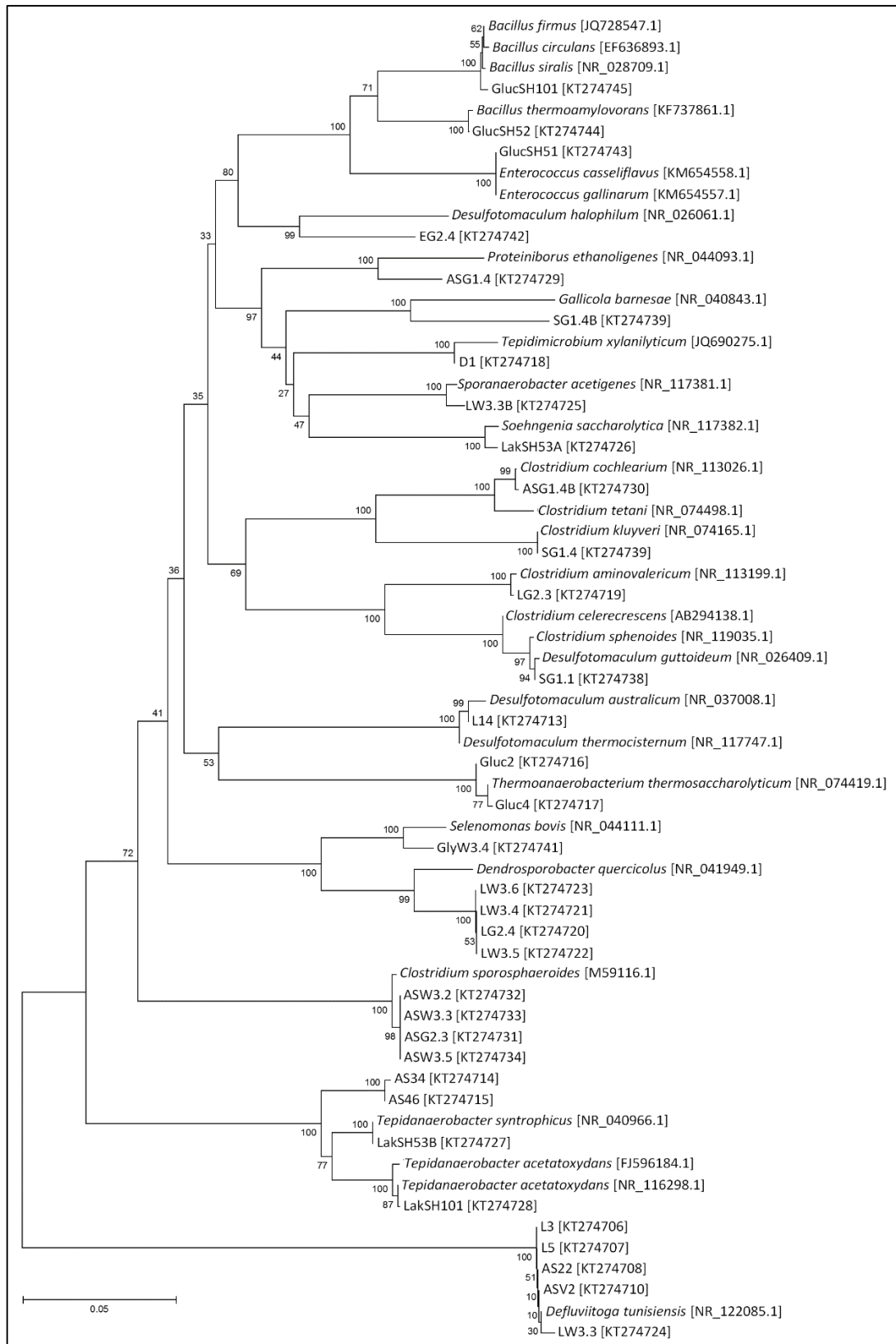


Abbildung 3.3: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 16S rDNA-Sequenzen von thermophilen und mesophilen Isolaten sowie verwandten Referenzstämmen. Der Stammbaum wurde nach der Neighbor Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Über den Ästen sind die prozentualen Ergebnisse der Bootstrap-Analyse aus 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1985) angegeben. Evolutionäre Distanzen wurden nach der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura *et al.*, 2004) berechnet. Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5 %. Alle phylogenetischen Analysen wurden innerhalb der Software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) durchgeführt. Accession-Nummern der verwendeten Gensequenzen von GenBank sind hinter den Art- bzw. Isolatnamen angegeben.

3.2 Physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate

Für die physiologische Charakterisierung wurden sechs Isolate aus der thermophilen und den mesophilen Biogasanlagen ausgewählt: Stamm L3 (*Defluviitoga tunisiensis*), Stamm L14 (*Desulfotomaculum australicum*), der Buttersäure-bildende Stamm Gluc4 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), Stamm SG1.4B (89 % *Gallicola barnesae*), der Propionsäure-bildende Stamm GlyW3.4 (*Selenomonas bovis*) sowie Stamm ASG2.3 (*Clostridium sporosphaeroides*). Abbildung 3.4 zeigt die Morphologien der sechs untersuchten Isolate.

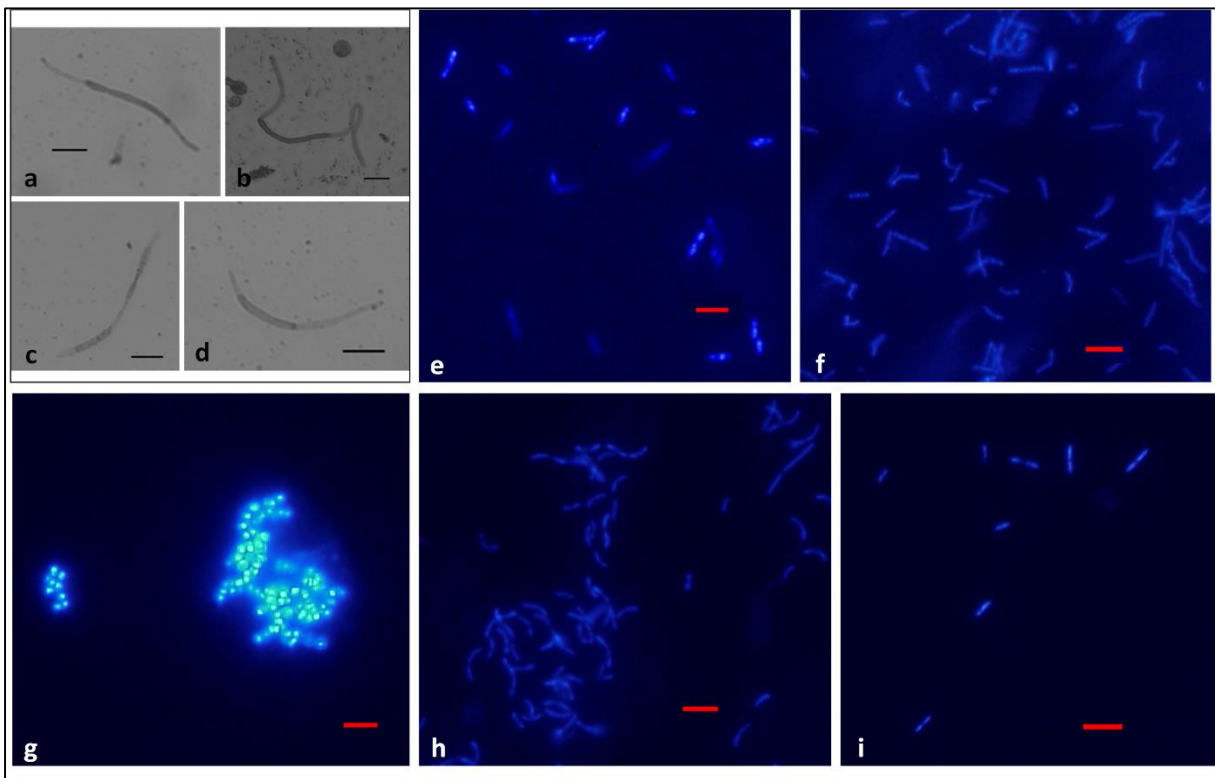


Abbildung 3.4: Mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Isolate. (a - d) Stamm *Defluviitoga tunisiensis*; (e) Stamm *Desulfotomaculum australicum* L14; (f) Stamm *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc4; (g) Stamm *Gallicola* sp. SG1.4B; (h) Stamm *Selenomonas bovis* GlyW3.4; (i) Stamm *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3. (a - d) Phasenkontrastaufnahmen; (e - i) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Zellen angefärbt mit DAPI. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Die mikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 um ein stäbchenförmiges Bakterium handelt, welches eine hüllenartige äußere Struktur (Toga) besaß (Abbildung 3.4a - d). Die Zellen traten einzeln, in Paaren oder in längeren Ketten in der hüllenartigen Struktur auf und besaßen eine Länge von 2 - 10 μ m. Einzeln auftretende stäbchenförmige Bakterien wurden in Kulturen von Stamm *Desulfotomaculum australicum* L14 (2 - 3 μ m) und Gluc4 (3 - 5 μ m) beobachtet (Abbildung 3.2e, f). Stamm *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3 bildete einzelne Stäbchen oder Stäbchen in Paaren (1 -

2 µm; Abbildung 3.2i). In Kulturen von Isolat *Selenomonas bovis* GlyW3.4 wurden leicht gekrümmte Stäbchen (ca. 4 µm) beobachtet, welche einzeln oder in Paaren auftraten (Abbildung 3.2h). Wie in Abbildung 3.2g zu erkennen ist, wiesen Zellen des Isolates *Gallicola* sp. SG1.4B eine kokkenförmige Morphologie auf. Die Kokken wurden einzeln oder in Zellpaketen beobachtet. Die Zellpakete waren bis zu 15 - 20 µm groß.

Die Ergebnisse der Gram-Färbung waren für das Isolat L3 negativ, für alle anderen fünf Isolate positiv.

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse zur Substratnutzung der ausgewählten Isolate im Minimalmedium 287a mit verschiedenen Kohlenstoffquellen zusammengefasst. Die mittels HPLC gemessenen Werte sind im Anhang 7.1 in den Tabellen 7.1 bis 7.6 aufgeführt. Für einen Vergleich dieser Ergebnisse mit den nächsten Verwandten wurden Referenzdaten aus der Literatur hinzugezogen, welche ebenfalls in Tabelle 3.4 aufgeführt sind. Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 war in der Lage, das Polymer Stärke, die Oligosaccharide Cellobiose, Lactose, Maltose und Trehalose sowie die Monosaccharide Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Rhamnose, Ribose und Xylose zu verwerten. Im Gegensatz zu Stamm *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1 konnte Stamm L3 im Minimalmedium keine Cellulose, Mannose und Xylan abbauen (Ben Hania *et al.*, 2012). Das Substrat-Spektrum von Stamm *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc4 stimmte weitgehend mit den Referenzstämmen *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM-571, FH1 und PSU-2 überein (O-Thong *et al.*, 2008). Im Vergleich zu diesen konnte Stamm Gluc4 Mannitol, aber nicht Cellulose und Rhamnose verwerten. Die Bildung von Buttersäure wurde in Kulturen von Gluc4 bei der Verwertung folgender Substrate mittels HPLC festgestellt: Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Ribose, Saccharose, Xylose und Xylan. In diesen Kulturen wurden als weitere Produkte Essigsäure, Milchsäure oder Ethanol detektiert.

Stamm *Selenomonas bovis* GlyW3.4 war in der Lage, Stärke, einige Oligo- und Monosaccharide sowie Glycerin zu verwerten, allerdings keine Säuren oder H₂/CO₂. Propionsäurebildung wurde in Nährmedien mit Arabinose, Glycerin, Mannose, Rhamnose, Saccharose und Stärke beobachtet. Im Unterschied zum Referenzstamm *Selenomonas bovis* WG verwertete Stamm GlyW3.4 Stärke und Glycerin, aber nicht Trehalose (Zhang und Dong, 2009).

Folgendes Substratspektrum konnte bei Stamm *Desulfotomaculum australicum* L14 beobachtet werden: H₂/CO₂, Propionsäure, Milchsäure, Cellobiose, Glucose und Glycerin. Diese Substrate wurden zu Essigsäure abgebaut. Zusätzlich wurde ein Abbau von Arabinose, Buttersäure, Galactose, Maltose und Ribose festgestellt. In der Nutzung der Säuren zeigte Stamm L14

ein ähnliches Verhalten zu den Referenzstämmen *Desulfotomaculum australicum* und *Desulfotomaculum thermocisternum* (Nilsen *et al.*, 1996).

Folgende Substrate wurden durch Isolat *Gallicola* sp. SG1.4B zu Essigsäure abgebaut: Arabinose, Cellobiose, Galactose, Glucose, Glycerin, Mannitol, Ribose und Trehalose. Der nächste Verwandte dieses Stammes (89 % *Gallicola barnesae*) kann nach Ezaki *et al.* (2001) keine Glucose und Ribose fermentieren.

In Kulturen von Stamm *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3 wurde ein leichter Abbau von Arabinose, Cellobiose, Galactose, Glycerin, Maltose, Rhamnose, Ribose und Trehalose festgestellt. Die Verwertung von Zuckern durch *Clostridium sporosphaeroides* ist in der Literatur nicht berichtet.

Tabelle 3.4: Physiologische Charakteristika der untersuchten Isolate im Vergleich mit Referenzstämmen.

Referenzstämmen: 1 = *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1 (Ben Hania *et al.*, 2012), 2 = *Desulfotomaculum australicum*, 3 = *Desulfotomaculum thermocisternum* (Nilsen *et al.*, 1996), 4 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM-571, 5 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* FH1, 6 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 (O-Thong *et al.*, 2008), 7 = *Gallicola barnesae* (Ezaki *et al.*, 2001), 8 = *Selenomonas bovis* WG (Zhang und Dong, 2009), 9 = *Clostridium sporosphaeroides* DSM-1496 (Vos *et al.*, 2009)

Kohlenstoffquelle		Stamm L3	1	Stamm L14	2	3	Stamm Gluc4	4	5	6	Stamm SG1.4B	7	Stamm GlyW3.4	8	Stamm ASG2.3	9
Polymere	Cellulose	-	+ ²	-	NB	NB	-	NB	NB	+	-	NB	-	NB	-	NB
	Polygalacturonsäure	-	NB	-	NB	NB	-	- ³	- ³	- ³	-	NB	-	NB	-	NB
	Stärke	+	NB	-	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	+	-	-	-
	Xylan	-	+	-	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	-	NB	-	NB
Oligosaccharide	Cellobiose	+	+	+	NB	NB	+	+	+	+	+	NB	+	+	+	-
	Lactose	+	+	-	NB	NB	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Maltose	+	+	+	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	+	NB	+	-
	Saccharose	-	+	-	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	+	+	-	-
	Trehalose	+	NB	-	NB	NB	+	+	NB	+	+	NB	-	+	+	-
Hexosen	Fructose	+	+	-	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	-	NB	-	-
	Galactose	+	+	+	NB	NB	+	+	NB	+	+	NB	+	NB	+	NB
	Glucose	+	+	+	NB	NB	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	Mannose	-	+	-	NB	NB	+	+	NB	+	-	-	+	+	-	NB
	Rhamnose	+	NB	-	NB	NB	-	-	NB	+	-	NB	+	NB	+	NB
Pentosen	Arabinose	+	+	+	NB	NB	+	+	+	+	+	NB	+	+	+	NB
	Ribose	+	+	+	NB	NB	+	NB	NB	NB	+	-	+	NB	+	-
	Xylose	+	+	-	NB	NB	+	+	+	+	-	NB	-	-	-	-
Alkohole	Glycerin	+	NB	+	NB	NB	-	-	-	-	+	NB	+	-	+	-
	Mannitol	-	-	-	NB	NB	+	-	-	-	+	NB	-	-	-	NB
Säuren	Buttersäure	(+)	NB	(+)	-	+	-	NB	NB	NB	-	NB	-	NB	-	NB
	Essigsäure	-	-	-	+	-	-	NB	NB	NB	-	NB	-	NB	-	NB
	Milchsäure	+	-	+	+	+	-	NB	NB	NB	-	NB	-	-	-	+
	Propionsäure	(+)	NB	+	-	+	-	NB	NB	NB	-	NB	-	NB	-	NB
Gase	H ₂ /CO ₂	-	-	+	NB	+	-	NB	NB	NB	(+)	NB	-	NB	-	NB
	Gram-Färbung	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Morphologie	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K	K	GS	GS	S	S

GS = gekrümmte Stäbchen, K = Kokken (in Clustern), NB = nicht berichtet, S = Stäbchen, + = Abbau, (+) = leichter Abbau, - = kein Abbau.

¹ Verwertung von Carboxymethyl-Cellulose.

² Pektin wurde getestet.

³ Gram-Färbung: + positiv, - negativ.

3.3 Überprüfung der Primerspezifität

Zur Detektion der Isolate in Biogasanlagen sowie zu deren Quantifizierung mittels qPCR wurden mit Hilfe des Programms Primer-Blast spezifische Primer zur Amplifizierung partieller Bereiche des 16S rRNA-Gens ausgewählter Isolate bzw. von Referenzstämmen generiert. Charakteristika dieser Primerpaare sind in Tabelle 2.13 (vgl. Abschnitt 2.7.8) aufgeführt.

Zunächst wurde unter Verwendung der Datenbanken „Nucleotide collection (nt)“ und „Nucleotide collection (nt) - (Organism limited to Bacteria)“ innerhalb des Programms Primer-Blast die Spezifität der Primer überprüft. Bei folgenden Primerpaaren konnte die Spezifität für das Isolat bzw. den Referenzstamm bestätigt werden: Desausfw/rev (*Desulfotomaculum australicum*), GlyW34fw/rev (Isolat GlyW3.4 und *Selenomonas bovis*), Pr.eth.fw/rev (*Proteinioborus ethanolicus*), ASG1.4fw/rev (nur Isolat ASG1.4), SG14fw/rev (Isolat SG1.4 und *Clostridium kluyveri*), LakG2.4fw/rev (nur Isolat LG2.4), AS34fw/rev (nur Isolat AS34), L3fw/rev (Isolat L3 und *Defluviitoga tunisiensis*), Tepsynfw/rev (Isolat LakSH53B und *Tepidanaerobacter syntrophicus*). Das Primerpaar Thesacfw/rev stellte sich als gruppenspezifisches Primerpaar heraus. Wie aus Tabelle 2.13 ersichtlich wird, generieren laut Primer-Blast neben *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* auch andere Stämme der Gattungen *Thermoanaerobacterium*, *Thermohydrogenium* und *Clostridium* PCR-Produkte mit diesem Primerpaar (100 % Übereinstimmung der Primersequenz zur Ziel-DNA). Es kann an diesem Punkt nicht ausgeschlossen werden, ob auch andere Gattungen oder Arten durch dieses Primerpaar detektiert werden. Im Anhang 7.2 Tabelle 7.9 ist eine Auflistung aller Arten geboten, an deren DNA die Primer laut Primer-Blast binden könnten. Eine tatsächliche Bildung eines PCR-Produkts müsste allerdings in PCR-Amplifikationen überprüft werden.

Nach der Überprüfung der Primerspezifität mit den Datenbanken wurde diese zusätzlich mittels PCR kontrolliert. Hierbei wurden die jeweiligen Primerpaare sowie DNA der Isolate und der nächst verwandten DSMZ-Typstämme eingesetzt. Innerhalb dieser Reaktionen wurde einerseits getestet, ob ein PCR-Produkt mit dem entsprechenden Isolat/Referenzstamm entsteht, und andererseits, ob das Amplifikat die von Primer-Blast berechnete Sequenzlänge aufwies. Durch Einsatz von DNA aus Biogasanlagen sollte weiterhin überprüft werden, ob unspezifische PCR-Produkte in einer Umweltprobe entstehen. Die Ergebnisse dieser PCR-Amplifikationen sind in Abbildung 3.5 gezeigt.

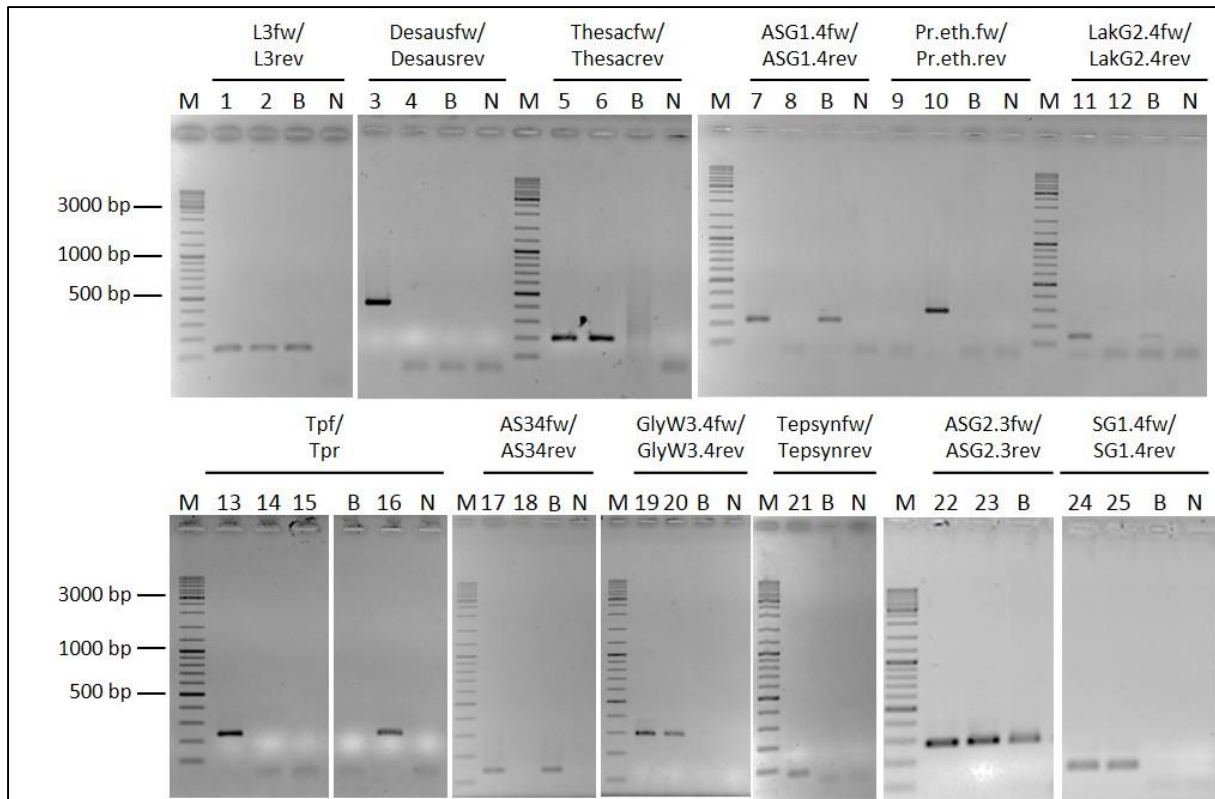


Abbildung 3.5: PCR-Amplifikate zur Detektion spezifischer Bereiche des 16S rRNA-Gens. Getestet wurden mit dieser PCR die für Isolate und Referenzstämme entwickelten spezifischen Primerpaare. Die PCR wurde mit DNA der Isolate, der Referenzstämme oder der Biogasanlagen durchgeführt. Verwendete Primerpaare (Tabelle 2.13) sind über den Gelbildern markiert. 1 = Stamm L3, 2 = *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805, 3 = Stamm L14, 4 = Stamm SG1.1 (als Negativkontrolle), 5 = Stamm Gluc4, 6 = Stamm Gluc2, 7 = Stamm ASG1.4, 8 = *Proteiniborus ethanolicus* DSM-21650, 9 = Stamm ASG1.4, 10 = *Proteiniborus ethanolicus* DSM-21650, 11 = Stamm LG2.4, 12 = *Dendrosporobacter quercicolus* DSM-1736, 13 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804, 14 = Stamm AS34, 15 = Stamm AS46, 16 = Stamm LakSH101, 17 = Stamm AS34, 18 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804, 19 = Stamm GlyW3.4, 20 = *Selenomonas bovis* DSM-23594, 21 = Stamm LakSH53B, 22 = Stamm ASG2.3, 23 = *Clostridium sporosphaeroides* DSM-1294, 24 = Stamm SG1.4, 25 = *Clostridium kluyveri* DSM-555, B = Biogasanlage, M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3), N = Negativkontrolle.

Mit den Primerpaaren L3fw/rev (Amplifikatlänge: 130 bp), GlyW34fw/rev (Amplifikatlänge: 297 bp), ASG2.3fw/rev (Amplifikatlänge: 282 bp) und SG14fw/rev (Amplifikatlänge: 146 bp) konnten entsprechende PCR-Produkte mit DNA der Isolate und ihren nächsten Verwandten amplifiziert werden. Die Isolate L14 (99 % *Desulfotomaculum australicum*) und LakSH53B (100 % *Tepidanaerobacter syntrophicus*) konnten in Amplifikationen mit den Primerpaaren Desausfw/Desausrev (Amplifikatlänge: 419 bp) bzw. Tepsynfw/Tepsynrev (Amplifikatlänge: 75 bp) jeweils ein PCR-Produkt in entsprechender Größe bilden. Weiterhin wurden bei einer PCR mit dem gruppenspezifischen Primerpaar Thesacfw/rev (Amplifikatlänge: 198 bp) mit DNA der Isolate Gluc2 und Gluc4 Amplifikate in erwarteter Größe festgestellt.

Das Primerpaar Pr.eth.fw/Pr.eth.rev (Amplifikatlänge: 284 bp) war spezifisch für die Art *Proteiniborus ethanolicus*. Es wurde kein PCR-Produkt mit dem Isolat ASG1.4 (96 % *Proteiniborus ethanolicus*) gebildet. Drei Primerpaare (ASG1.4fw/ASG1.4rev, Amplifikatlänge: 220 bp; LakG2.4fw/LakG2.4rev, Amplifikatlänge: 138; und AS34fw/AS34rev, Amplifikatlänge: 137 bp) waren spezifisch für die entsprechenden Isolate. PCR-Amplifikate mit den nächsten Verwandten wurden nicht generiert. Mit dem Primerpaar Tpf/Tpr (Amplifikatlänge: 237 bp; Westerholm *et al.*, 2011a) wurde ein Teilbereich der 16S rDNA mit *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804 und Stamm LakSH101 amplifiziert, allerdings nicht mit DNA der Isolate AS34 und AS46, welche eine Verwandtschaft zur Gattung *Tepidanaerobacter* aufwiesen (96 %). Nur in fünf der elf PCR-Amplifikationen mit den Primerpaaren, L3fw/rev, ASG1.4fw/rev, LakG2.4fw/rev, ASG2.3fw/rev und AS34fw/rev wurde ein PCR-Produkt mit DNA der Biogasanlagen nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar.

Weiterhin wurde mittels PCR überprüft, ob durch die entwickelten Primer auch andere Isolate der gleichen Art detektiert werden konnten. Mit dem Primerpaar ASG2.3fw/ASG2.3rev wurden neben dem Isolat ASG2.3 ebenfalls PCR-Produkte in entsprechender Höhe (ca. 282 bp) mit den Isolaten ASG2.1A, ASG2.1B, ASG2.2, ASW3.1, ASW3.3, ASW3.5 und ASW3.6 amplifiziert (Abbildung 3.6a). Die in der Abbildung grün hinterlegten Isolate wurden durch die 16S rDNA-Sequenzen und die gelb hinterlegten Isolate mit Hilfe der Fingerprintmusters der SAPD-PCR als *Clostridium sporosphaeroides* identifiziert (Tabelle 3.2).

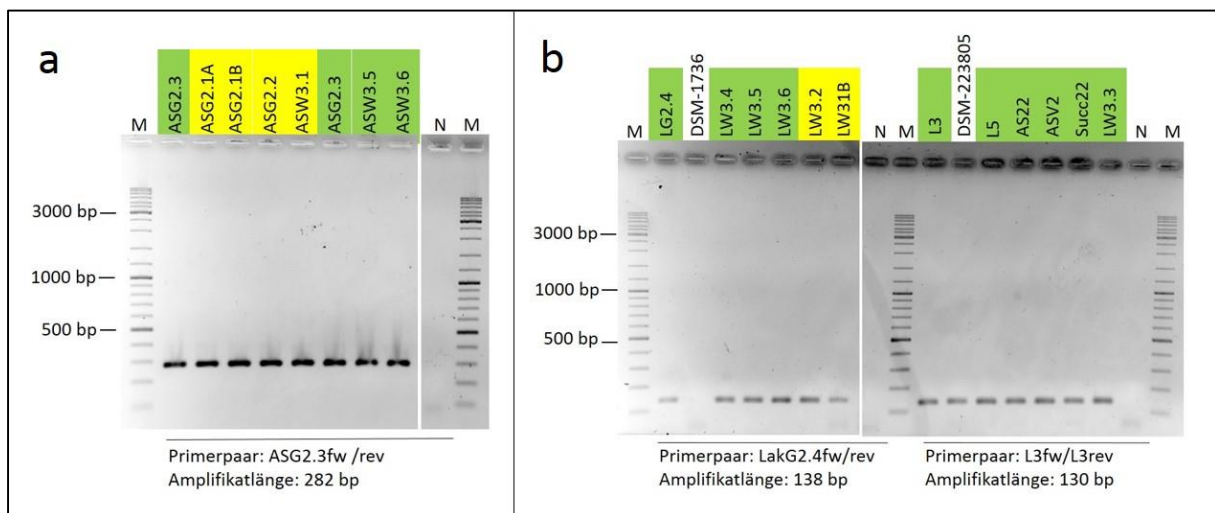


Abbildung 3.6: Spezifitätsüberprüfung von entwickelten Primerpaaren zur Detektion spezifischer Bereiche des 16S rRNA-Gens. Getestet wurden weitere Isolate der gleichen Art. (a) Primerpaar ASG2.3fw/ASG2.3rev; (b) Primerpaar LG2.4fw/LG2.4rev und L3fw/L3rev. Verwendete Typstämme: *Dendrosporobacter quercicolus* DSM-1736 und *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805. Grün hinterlegt: Isolate, welche durch Sequenzierung der 16S rDNA identifiziert wurden; gelb hinterlegt: Isolate, welche mit Hilfe von Fingerprintmestern der SAPD-PCR identifiziert wurden. M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3), N = Negativkontrolle.

In Amplifikationsreaktionen mit dem Primerpaar LG2.4fw/LG2.4rev (Abbildung 3.6b) entstand mit allen Isolaten (LG2.4, LW3.1B, LW3.2, LW3.4, LW3.5 und LW3.6) ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von ca. 138 bp. Die genannten Isolate wiesen eine 95 - 100 %ige Identität zu *Dendrosporobacter quercicolus* auf (Abbildung 3.6b, grün hinterlegt) oder wurden durch das Bandenmuster der SAPD-PCR dieser Gruppe zugeordnet (Abbildung 3.6b, gelb hinterlegt).

Die Isolate L3, L5, AS22, ASV2, Succ22 und LW3.3, welche als *Defluviitoga tunisiensis* (99 - 100 % Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA) identifiziert wurden, bildeten mit dem Primerpaar L3fw/L3rev PCR-Produkte in Höhe von etwa 130 bp. Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 3.6b dargestellt.

3.4 Titer der Isolate in den untersuchten Biogasanlagen

Um einen Einblick zu bekommen, wie hoch der Titer der erhaltenen Isolate in den untersuchten Biogasanlagen war, wurden die spezifischen Primerpaare aus Abschnitt 3.3 zur Quantifizierung mittels qPCR eingesetzt. Mit Hilfe dieser Primerpaare wurde ein synthetischer DNA-Standard nach der Methode von May *et al.* (2015) konstruiert, mit welchem eine Quantifizierung der Isolate in den vier beprobten Biogasanlagen möglich war. Die Quantifizierung bei der qPCR erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, welcher sich an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA anlagert. Durch die Zunahme der Amplifikate während der PCR steigt auch die Fluoreszenz an, wodurch eine Quantifizierung möglich wird.

Um die Isolate in einer Umweltprobe quantifizieren zu können, musste zunächst gewährleistet sein, dass alle verwendeten Primer an den synthetischen DNA-Standard (vgl. Abbildung 2.3, Abschnitt 2.7.8) binden und dass die Amplifikatlänge derjenigen des jeweiligen Isolates entsprach. Daher wurden zunächst alle verwendeten Isolat-spezifischen Primer über eine PCR mit DNA der jeweiligen Isolate, des Standards und einer Biogasanlage geprüft. Abbildung 3.7 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate mit den unterschiedlichen Primerpaaren. Eine Primerbindung an die DNA der Isolate und des Standards konnte in allen Fällen bestätigt werden. Ebenso besaßen die Amplifikate von Isolat und Standard die gleiche Fragmentlänge. Nur in PCR-Amplifikationen mit den Primerpaaren Bac338F/Bac805R, ASG2.3fw/rev, ASG1.4fw/rev, Thesacfw/rev und L3fw/rev und DNA aus Biogasanlagen-Proben wurden Amplifikate auf den Gelbildern nach Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar.

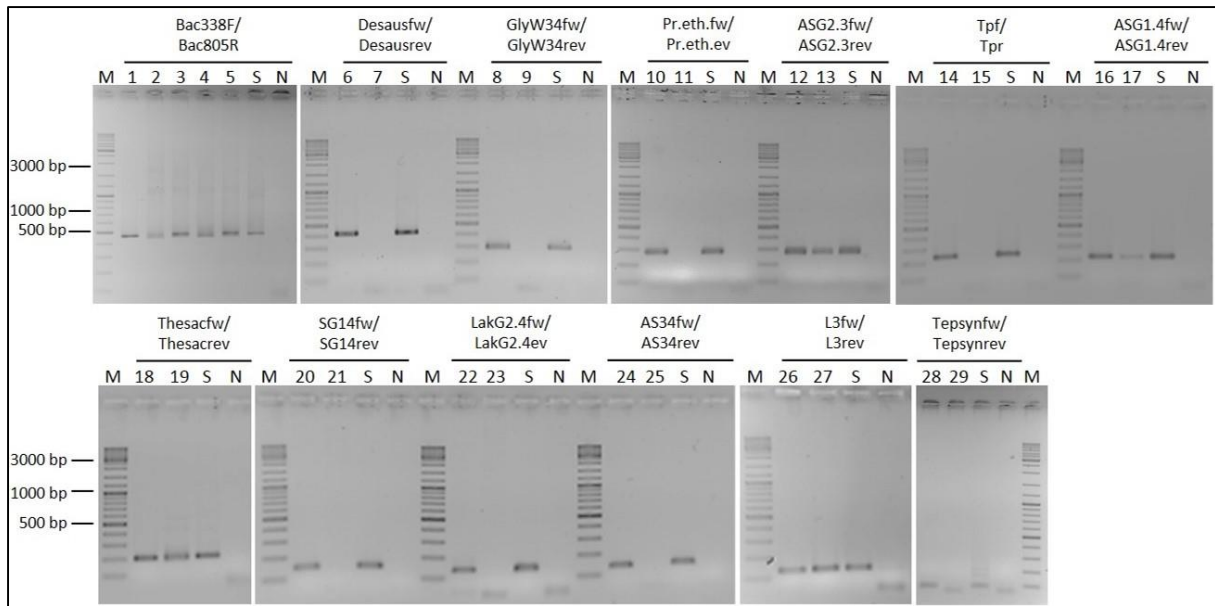


Abbildung 3.7: Überprüfung der Primerbindung an DNA der Isolate, des Standards und des Fermenterinhalt von Biogasanlagen. Getestet wurden mit dieser PCR, ob mit den in der qPCR verwendeten Primerpaaren mit DNA der Isolate, des Standards (synthetische DNA-Sequenz) und der Biogasanlagen die erwarteten PCR-Produkte amplifiziert werden. Verwendete Primerpaare (Tabelle 2.13) sind über den Gelbildern markiert. 1 = Stamm L3, 2 = BGA Butschen, 3 = BGA Glahn, 4 = BGA Gebel, 5 = BGA Wagner, 6 = Stamm L14, 7 = BGA Butschen, 8 = Stamm GlyW3.4, 9 = BGA Wagner, 10 = *Proteiniborus ethanoligenes* DSM-21650, 11 = BGA Glahn, 12 = Stamm ASG2.3, 13 = BGA Gebel, 14 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804, 15 = BGA Glahn, 16 = Stamm ASG1.4, 17 = BGA Glahn, 18 = Stamm Gluc4, 19 = BGA Butschen, 20 = Stamm SG1.4, 21 = BGA Glahn, 22 = Stamm LG2.4, 23 = BGA Gebel, 24 = Stamm AS34, 25 = BGA Butschen, 26 = Stamm L3, 27 = BGA Butschen, 28 = Stamm LakSH53B, 29 = BGA Glahn, B = Biogasanlage, M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3), N = Negativkontrolle, S = Standard.

In allen qPCR-Reaktionen wurde der dekadisch verdünnte Standard (10^{11} bis 10^4 Kopien/ml) mitgeführt. Aus den resultierenden Ct-Werten des Standards konnte für jedes Primerpaar eine Kalibrierungsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß $> 0,99$ erstellt werden. Bei der Effizienz handelt es sich um ein Maß für die Güte eines Amplifikationszyklus. Die Werte der Effizienz lagen bei den durchgeführten Reaktionen zwischen 0,86 und 1,06. Die Steigung der Eichgeraden hatte bei allen qPCR-Reaktionen Werte zwischen -3,71 und -3,36 und der y-Achsenabschnitt zeigte Werte zwischen 41,75 und 44,56. Diese angegebenen Werte bestätigen die Exaktheit der durchgeführten qPCR-Reaktionen. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 3.8 und in den Tabellen 7.7 und 7.8 in Anhang 7.2 dargestellt.

Bei allen angegebenen Werten handelt es sich um die berechneten Kopien der 16S rDNA, welche in 1 g Biogasanlagen-Probe enthalten waren. In den vier untersuchten Biogasanlagen Butschen, Glahn, Gebel und Wagner konnten mit dem Primerpaar Bac338F/Bac805R (Yu *et al.*, 2005) zwischen $3,45 \times 10^9$ und $8,15 \times 10^9$ Kopien der 16S rDNA an Gesamtbakterien ermittelt werden. *Desulfotomaculum australicum* (Isolat L14), *Proteiniborus ethanoligenes*, *Clostridium kluyveri* (Isolat SG1.4) und *Tepidanaerobacter syntrophicus* zeigten in allen vier Bio-

gasanlagen Werte im Bereich von ca. 10^3 Kopien der 16S rDNA. *Tepidanaerobacter acetoxydans* (Primer Tpf/Tpr; Westerholm *et al.*, 2011a) wurde in den Biogasanlagen Butschen und Glahn mit 10^3 Kopien der 16S rDNA und in den anderen beiden Biogasanlagen in geringeren Mengen detektiert (10^1 bis 10^2 Kopien). Im Gegensatz dazu zeigte Isolat AS34 (96 % *Tepidanaerobacter* sp.) höhere Werte in allen vier Biogasanlagen (ca. 10^7 Kopien der 16S rDNA). Isolat ASG1.4 wurden in den untersuchten Biogasanlagen häufiger detektiert (ca. 10^5 Kopien) im Vergleich zu dessen nächsten Verwandten *Proteiniborus ethanolicus* (ca. 10^3 Kopien). Mit dem gruppenspezifischen Primer Thesacfw/rev wurden Werte zwischen $6,55 \times 10^7$ und $1,07 \times 10^9$ Kopien der 16S rDNA detektiert.

Innerhalb der vier untersuchten Biogasanlagen konnten Unterschiede in der Anzahl der Kopien der 16S rDNA für die Stämme GlyW3.4 (*Selenomonas bovis*), ASG2.3 (*Clostridium sporosphaeroides*) und L3 (*Defluviitoga tunisiensis*) festgestellt werden. *Selenomonas bovis* dominierte in den mesophilen Biogasanlagen Glahn und Wagner ($5,35 \times 10^4$ und $1,42 \times 10^5$ Kopien). *Clostridium sporosphaeroides* zeigte die geringste Kopienzahl in der thermophilen Biogasanlage Butschen, die höchste Abundanz wurde in der Biogasanlage Wagner festgestellt ($8,08 \times 10^6$ Kopien). Die thermophile Art *Defluviitoga tunisiensis* konnte mit Hilfe des Primerpaares L3fw/rev in allen vier Biogasanlagen mit mehr als 10^4 Kopien der 16S rDNA detektiert werden. In der thermophilen Biogasanlage Butschen wurden $1,72 \times 10^8$ Kopien der 16S rDNA ermittelt.

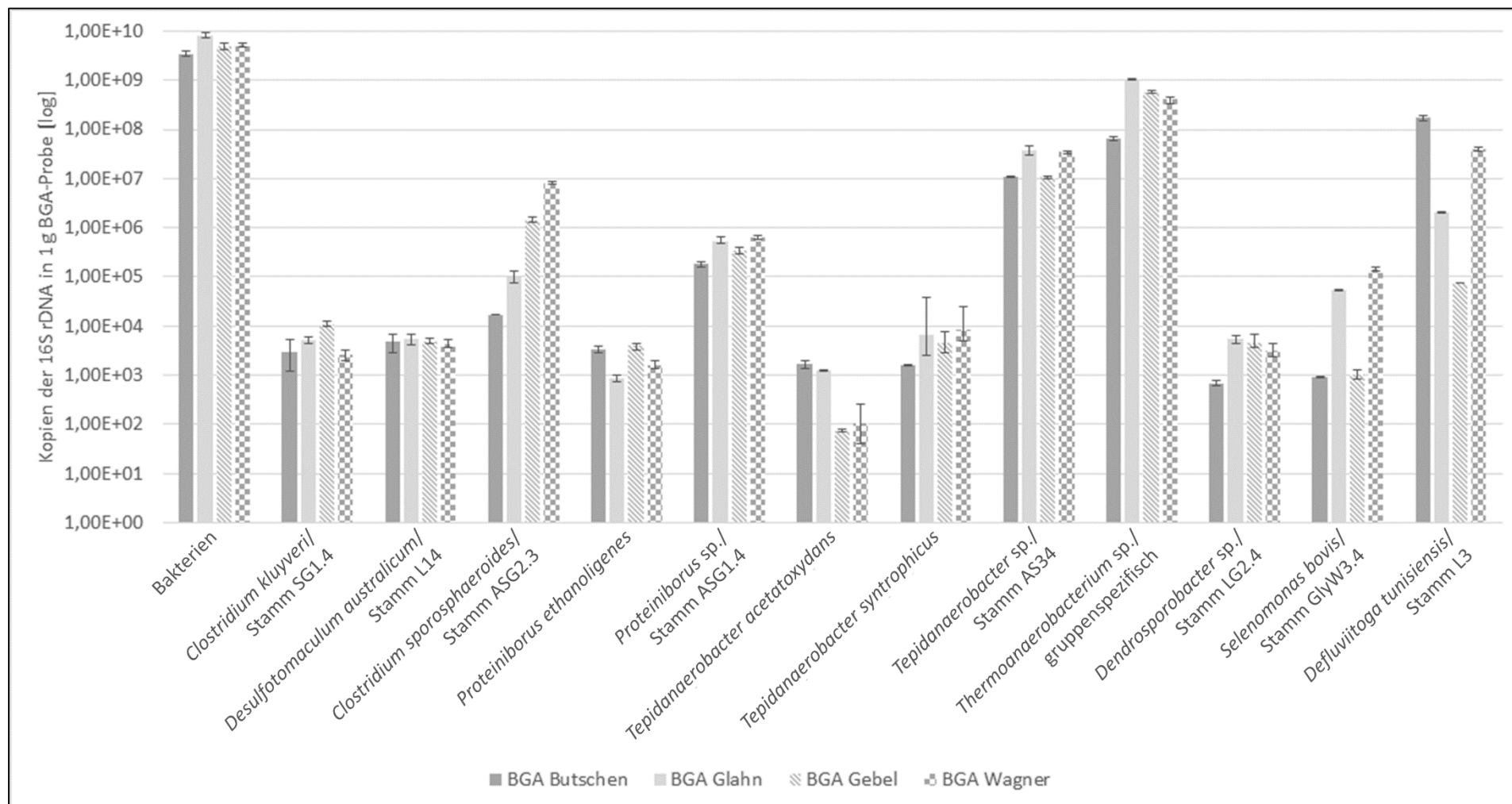


Abbildung 3.8: Quantifizierung verschiedener Isolate und Arten in Biogasanlagen. Verwendet wurden spezifische Primerpaare, welche Teilbereiche der 16S rDNA amplifizieren. Mit Hilfe der qPCR wurden DNA-Proben der BGA Butschen, Glahn, Gebel und Wagner untersucht. Verwendete Primerpaare sind in Tabelle 2.13 aufgeführt. Fehlerbalken zeigen die Minimal- und Maximalwerte von zwei oder drei PCR-Reaktionen an. Die Werte zu dieser Abbildung sind in Tabelle 7.2 in Anhang 7.2 aufgeführt.

3.5 Kohlenhydrat-Verwertung durch das Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3

Wegen der hohen Abundanz des Isolates *Defluviitoga tunisiensis* L3 in der thermophilen Biogasanlage Butschen sowie der erst kürzlichen Beschreibung dieser Art durch Ben Hania *et al.* (2012) wurde das Gesamtgenom dieses Isolates am CeBiTec in Bielefeld sequenziert (Maus *et al.*, 2015). Das 2.053.097 bp große Genom von Isolat L3 resultierte in 1825 Proteinkodierenden Sequenzen. Für die Annotation der Proteine wurden folgende Kriterien gewählt: der Schwellenwert für den E-Wert der verwendeten Datenbanken wurde als e^{-20} festgelegt und die Proteinsequenzen sollten mindestens eine Identität von 30 % aufweisen (Rost, 1999). Bei der manuellen Genomannotation konnten viele Gene identifiziert werden, welche am Abbau von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Oligosaccharide, Monosaccharide) beteiligt sein könnten bzw. mutmaßlich beteiligt sind. Diese und weitere Gene sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Ausgewählte Stoffwechselwege, welche durch die Genomanalyse rekonstruiert werden konnten, sind in Abbildung 3.9 schematisch zusammengefasst. Hierbei sind die Namen der Gene, Enzyme sowie die EC-Nummern angegeben. Im Genom von *Defluviitoga tunisiensis* L3 konnten Gene identifiziert werden, welche in den Abbau von Strukturpolysacchariden der pflanzlichen Zellwand (Cellulose, Pectin und Hemicellulosen wie Xylan, Galactan und Mannan), des Strukturpolysaccharids Chitin und von Speicherpolysacchariden (Stärke, Glycogen, Pullulan und Lichenin) involviert sein können.

Zwei Gene konnten im Genom von *Defluviitoga tunisiensis* L3 annotiert werden, welche an der Hydrolyse von Cellulose beteiligt sein können: Gen *cel5A* kodiert für eine Cellulase, welche die β -1,4-glykosidischen Verbindungen innerhalb der Cellulose hydrolysieren kann. Das Gen *cbh1* kodiert für eine Cellulose-1,4- β -Cellobiosidase, welche β -1,4-glykosidische Bindungen vom nicht-reduzierenden Kettenende her hydrolysiert. Die entstehenden Cellobiose-Einheiten können über einen Dpp/Opp-Transporter in die Zelle transportiert werden, wie er auch für *Thermotoga maritima* beschrieben ist (Connors *et al.*, 2006). In der Zelle kann Cellobiose durch eine β -Glucosidase (Gen *bglA*) zu Glucose abgebaut werden. Im Genom von Isolat L3 konnten weiterhin Gene für die Verwertung von Xylanen gefunden werden. Beteiligte Gene sind hierbei *xynA* (Endo-1,4- β -Xylanase), *bxlB* (β -Xylosidase), *xylA* (Xylose-Isomerase) und *xylB* (Xylulokinase). Xylan-Oligosaccharide und Xylose können über die Transporter XloELKGF und XtpELFGF bzw. XyleFK aufgenommen werden. Entsprechende Gene konnten im Genom von L3 identifiziert werden. Das Transportsystem XyleFK kann neben Xylose auch Glucose in die Zelle importieren (Frock *et al.*, 2012). Xylane enthalten als weitere Komponente oft Arabinose, für deren Abbau ebenfalls Gene detektiert werden konn-

ten. Diese Pentose kann durch die Enzyme L-Arabinose-Isomerase (AraA), Ribulokinase (AraB) und L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (AraD) umgesetzt werden. Der weitere Abbau von Xylose, Arabinose sowie Ribose (Ribokinase, Gen *rbsK*) ist im nicht-oxidativen Zweig des Pentosephosphat-Weges möglich. Die beteiligten Gene sind in Tabelle 3.5 und Abbildung 3.9 aufgeführt. Galactose kann beim Abbau von Galactan, Laktose, Stachyose, Raffinose und Melibiose durch die Aktivität der Enzyme α - und β -Galactosidasen (Gene *melA* und *lakA*) entstehen und weiter durch die Enzyme Galactokinase (GalK), Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GalT), UDP-Glucose-4-Epimerase (GalE) sowie Phosphoglucomutase (PgcA) zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt werden. In diesem Zusammenhang wurde ein Gen für das Enzym β -1,4-Galactanase annotiert, welches β -1,4-Galactan hydrolysieren kann. Entstehende β -Galactoside könnten durch ein putatives Galactosid-Aufnahmesystem (GanEFG) in die Zelle transportiert werden. Für den Transport von Stachyose und Melibiose konnten keine Transportsysteme identifiziert werden.

Mannose, welche beim Abbau von Mannan entstehen kann, könnte über die Enzyme Glucokinase (Glk) und Mannose-6-Phosphat-Isomerase (ManA) über die Bildung von Fructose-6-Phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden. In dem analysierten Genom von *Defluviito-ga tunisiensis* L3 konnten weiterhin Gene identifiziert werden, welche für Enzyme des Chitin-Abbaus kodieren: *chiA* (Chitinase), *nagZ* (β -N-Acetylhexosaminidase), *nagK* (N-Acetylglucosaminkinase), *nagA* (N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase) und *nagB* (Glutamin-Fructose-6-Phosphat Transaminase). Für den Transport von Chitobiose in das Cytoplasma wurden die Gene *chiEFG* im Genom detektiert.

Das Disaccharid Maltose, welches beim Abbau der Polysaccharide Stärke, Glykogen und Pullulan (α -Amylase, Gene *amyA* und *amyB*; Pullulanase, Gen *pulA*) sowie beim Abbau von Trehalose durch die Trehalose-Synthase (Gen *treS*) gebildet wird, kann enzymatisch durch eine α -Glucosidase (*malZ*) hydrolysiert werden. Die Aufnahme von Maltose und Maltose-Oligosacchariden könnte durch das Transportsystem MalEFG geschehen (Wasserberg *et al.*, 2000; Connors *et al.*, 2006). Durch das Enzym Glycogen-Phosphorylase (Gen *glgP*) könnte D-Glucose-1-Phosphat entstehen und durch eine Phosphoglucomutase (PgcA) in die Glykolyse eingeschleust werden. Für den Abbau von Rhamnose konnte kein vollständiger Stoffwechselweg rekonstruiert werden. Es wurde lediglich ein Gen für das Enzym Rhamnulokinase (*rhaB*) im Genom gefunden. Des Weiteren konnten im Genom Gene für einen Abbau von Oligogalacturoniden, welche beim Abbau von Pectin entstehen, und für einen Abbau von Lichenin identifiziert werden (Tabelle 3.5).

Die beim Abbau der genannten Kohlenhydrate entstehenden Zwischenprodukte können weiter in der Glykolyse abgebaut werden (Abbildung 3.9). Es konnten alle an der Glycolyse beteiligten Gene im Genom von Stamm L3 annotiert werden. Während der Glykolyse wird Energie bei der Substratkettenphosphorylierung gewonnen. Die gebildeten Reduktionsäquivalente können bei der Bildung von Acetat und Kohlenstoffdioxid oder durch die Bildung von Ethanol regeneriert werden. Vermutlich kann Pyruvat durch eine bifunktionale Pyruvatferredoxin-Oxidoreductase (PorABCD) zu Acetaldehyd oder Acetyl-CoA decarboxyliert werden (Eram *et al.*, 2015).

Der Citratzyklus konnte nicht vollständig rekonstruiert werden. Es wurden nur drei Gene des Citratzyklus identifiziert (Gen *idh*, Isocitrat-Dehydrogenase; Gen *korAB*, 2-Oxoglutarat-Oxidoreductase; Gen *fumA*, Fumarat-Hydratase). Weiterhin wurden im Genom von Isolat L3 Gene gefunden, welche einen unvollständigen Methylmalonyl-CoA-Weg kodieren. Hierbei wurden die Gene *mcm* (Methylmalonyl-CoA-Mutase), *mmcE* (Methylmalonyl-CoA-Epimerase), *mmc* (Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase), *pduL* (Phosphat-Propanoyltransferase) und *tdcD* (Propionat-/Acetatkinase) im Genom detektiert.

In der Abbildung 3.9 sind diejenigen Substrate grün hinterlegt, welche in den Substratverwertungsversuchen unter Laborbedingungen durch das Isolat L3 abgebaut werden konnten (Tabelle 3.4). Hierzu zählen die Substrate Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Glucose, Laktose, Maltose, Milchsäure, Ribose, Stärke, Trehalose und Xylose.

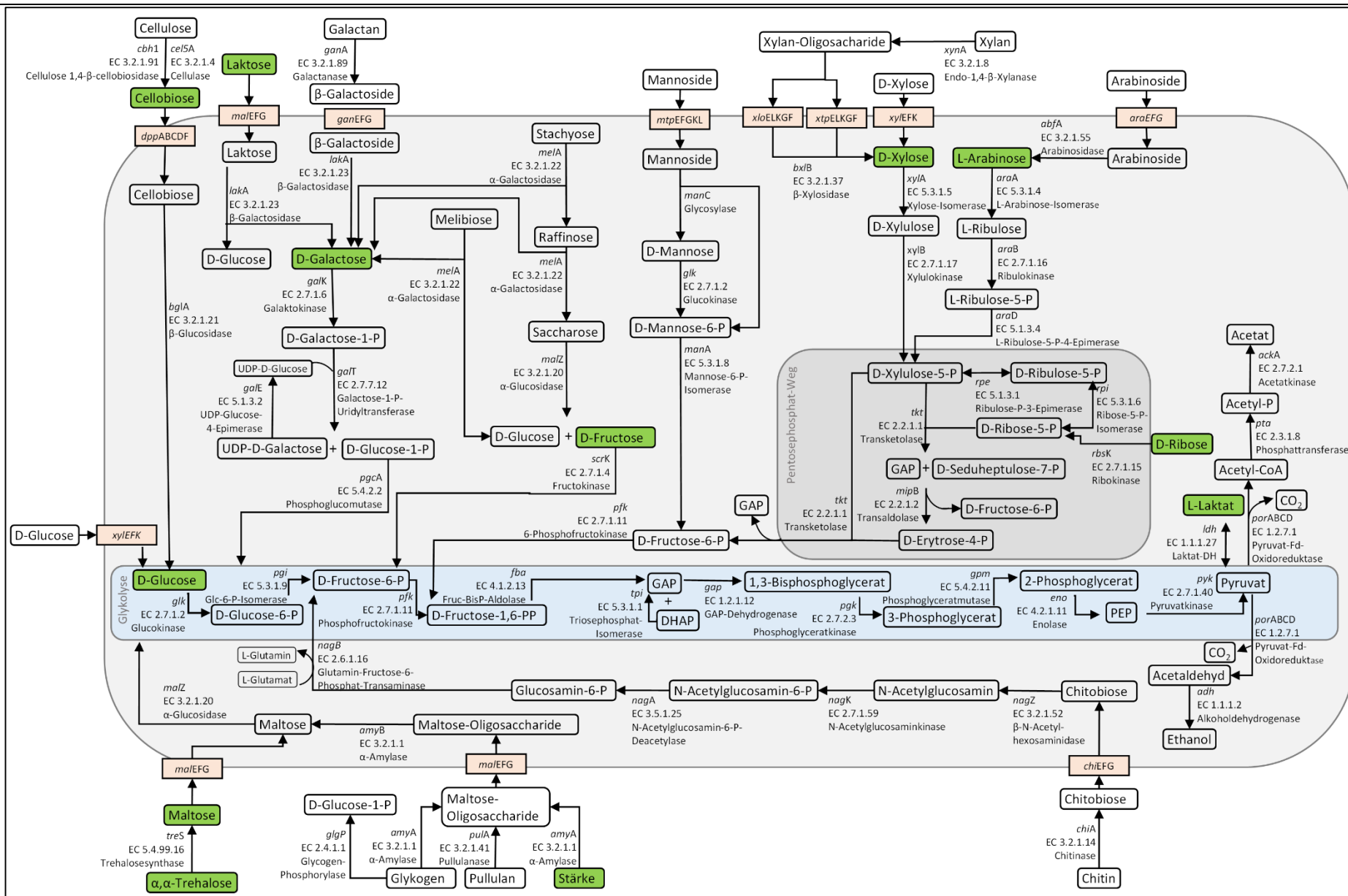


Abbildung 3.9: Rekonstruktion der Stoffwechselwege zur Verwertung von Kohlenhydraten durch das Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3. Neben den Pfeilen sind die Namen der Gene, die EC-Nummern sowie die Bezeichnungen der Enzyme angegeben, welche die jeweilige Reaktion katalysieren. Grün hinterlegt sind die Substrate, welche bei den Substratverwertungsversuchen durch Stamm L3 abgebaut wurden. Rosa hinterlegt sind die Transportsysteme. Weitere Angaben zu den Genen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Annotierte Gene im Genom von *Defluviitoga tunisiensis* L3. Aufgeführt sind Gene, welche beim Abbau von Kohlenhydraten eine Rolle spielen sowie Gene des Propionsäuremetabolismus und Citratzyklus.

Gen	Genprodukt	EC-Nummer	Locus tag
Abbau von Glucose/Glykolyse			
<i>xylEFK</i> ¹	Glucose/Xylose-Transporter		DTL3_1318, DTL3_1319, DTL3_1320
<i>Glk</i>	Glucokinase	2.7.1.2	DTL3_1850
<i>Pgi</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	5.3.1.9	DTL3_0517
<i>pfk</i>	Phosphofruktokinase	2.7.1.11	DTL3_1375, DTL3_1428, DTL3_1758
<i>fba</i>	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	4.1.2.13	DTL3_0485
<i>tpi</i>	Triosephosphat-Isomerase	5.3.1.1	DTL3_1281
<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	DTL3_1279
<i>pgk</i>	3-Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	DTL3_1280
<i>gpm</i>	Phosphoglycerat-Mutase	5.4.2.11	DTL3_0933, DTL3_1207
<i>eno</i>	Enolase	4.2.1.11	DTL3_1441
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	2.7.1.40	DTL3_1376
Abbau von Cellulose/Cellobiose			
<i>dpp/oppABCDF</i> ²	Cellobiose-Transporter		DTL3_1189, DTL3_1190, DTL3_1191, DTL3_1192, DTL3_1193
<i>cel5A</i>	Cellulase (Endo-1,4- β -D-Glucanase)	3.2.1.4	DTL3_1188
<i>cbh1</i>	Cellulose 1,4- β -Cellobiosidase	3.2.1.91	DTL3_1330
<i>bglA</i>	β -Glucosidase (cytosolisch)	3.2.1.21	DTL3_1194
Abbau von Galactan, Laktose, Galactose, Stachyose, Melibiose			
<i>ganA</i>	Arabinogalactan-endo-1,4- β -Galactanase	3.2.1.89	DTL3_1072
<i>ganEFG</i>	Galactosid-Transporter		DTL3_0430, DTL3_0431, DTL3_0432
<i>malEFG</i> ⁵	Maltose/Oligosaccharid-Transporter		DTL3_0899, DTL3_0900, DT3_0901, DTL3_1091, DTL3_1092, DT3_1093, DTL3_1287, DTL3_1288, DT3_1289
<i>lacA</i>	β -Galactosidase	3.2.1.23	DTL3_1070
<i>galK</i>	Galaktokinase	2.7.1.6	DTL3_1073
<i>galT</i>	Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase	2.7.7.12	DTL3_1074
<i>galE</i>	UDP-Glucose-4-Epimerase	5.1.3.2	DTL3_0236, DTL3_0519
<i>pgcA</i>	Phosphoglucomutase	5.4.2.2	DTL3_1435
<i>melA</i> ³	α -Galactosidase	3.2.1.22	DTL3_0119
<i>malZ</i>	α -Glucosidase	3.2.1.20	DTL3_0809, DTL3_1214
<i>scrK</i>	Fructokinase	2.7.1.4	DTL3_0557
Abbau von Mannose/Mannoside			
<i>mtpEFGKL</i>	Mannosid-Transporter		DTL3_1510, DTL3_1511, DTL3_1512, DTL3_1513, DTL3_1514
<i>manC</i>	Glycosylase (GH32)		DTL3_0702
<i>glk</i>	Glucokinase	2.7.1.2	DTL3_1850
<i>manA</i>	Mannose-6-phosphat-Isomerase	5.3.1.8	DTL3_1173
Abbau von Xylan, Xylose, Arabinose und Ribose			
<i>xynA</i>	Endo-1,4- β -Xylanase	3.2.1.8	DTL3_1324
<i>xtpELKGF</i>	Xylan-Oligosaccharid-Transporter		DTL3_1331, DTL3_1332, DTL3_1333, DTL3_1334, DTL3_1335
<i>xloELKGF</i>	Xylan-Oligosaccharid-Transporter		DTL3_1337, DTL3_1338, DTL3_1339, DTL3_1340, DTL3_1341
<i>bxlB</i>	β -Xylosidase	3.2.1.37	DTL3_1036, DTL3_1342
<i>xylEFK</i> ¹	Glucose/Xylose-Transporter		DTL3_1318, DTL3_1319, DTL3_1320
<i>xylA</i>	Xylose-Isomerase	5.3.1.5	DTL3_1317, DTL3_1321
<i>xylB</i>	Xylulokinase	2.7.1.17	DTL3_1049, DTL3_1162, DTL3_1315
<i>araEFG</i>	Arabinosid-Transporter		DTL3_0419, DTL3_0420, DTL3_0421, DTL3_0422, DTL3_0423
<i>abfA</i>	α -L-Arabinofuranosidase	3.2.1.55	DTL3_0418
<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase	5.3.1.4	DTL3_0424
<i>araB</i>	Ribulokinase	2.7.1.16	DTL3_0425
<i>araD</i>	L-Ribulose-5-phosphat-4-Epimerase	5.1.3.4	DTL3_0426
<i>araM</i>	Aldose-1-Epimerase	5.1.3.3	DTL3_0509
<i>rbsK</i>	Ribokinase	2.7.1.15	DTL3_0427, DTL3_0929

[Fortsetzung der Tabelle 3.5 auf Seite 83]

[Fortsetzung Tabelle 3.5]

Pentosephosphat-Weg

<i>rpe</i>	Ribulose-phosphat-3-Epimerase	5.1.3.1	DTL3_1367
<i>rpi</i>	Ribose-5-phosphat-Isomerase	5.3.1.6	DTL3_1868
<i>tkt</i>	Transketolase	2.2.1.1	DTL3_1405
<i>mipB</i>	Transaldolase	2.2.1.2	DTL3_0553

Abbau Rhamnose

<i>rhaB</i>	Rhamnulokinase	2.7.1.5	DTL3_1047
-------------	----------------	---------	-----------

Pyruvat-Metabolismus

<i>porABCD</i> ⁴	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	1.2.7.1	DTL3_0627, DTL3_0628, DTL3_0629, DTL3_0630
<i>pta</i>	Phosphotransferase	2.3.1.8	DTL3_1573
<i>ack</i>	Acetat-/Propionatkinase	2.7.2.15	DTL3_0486
<i>adh</i>	Alkoholdehydrogenase	1.1.1.2	DTL3_0951
<i>ldh</i>	Laktat-Dehydrogenase	1.1.1.27/1.1.1.28	DTL3_0053, DTL3_1163

Abbau von Stärke, Glycogen, Pullulan, Trehalose und Maltose

<i>glgP</i>	Glycogen- Phosphorylase	2.4.1.1	DTL3_1223
<i>amyA</i>	α -Amylase (extrazellulär)	3.2.1.1	DTL3_0037, DTL3_1688
<i>amyB</i>	α -Amylase (cytoplasmatisch)	3.2.1.1	DTL3_1450
<i>pulA</i>	Pullulanase	3.2.1.41	DTL3_0950
<i>malEFG</i> ⁵	Maltose/Oligosaccharid-Transporter		DTL3_0899, DTL3_0900, DT3_0901, DTL3_1091, DTL3_1092, DT3_1093 DTL3_1287, DTL3_1288, DT3_1289
<i>treS</i>	Trehalosesynthase	5.4.99.16	DTL3_0967

Abbau Chitin/Chitobiose

<i>chiEFG</i>	Chitobiose-Transporter		DTL3_1738, DTL3_1739, DTL3_1740
<i>chiA</i>	Chitinase	3.2.1.14	DTL3_1090
<i>nagZ</i>	β -N-Acetyl-Hexosaminidase	3.2.1.52	DTL3_1094, DTL3_1494
<i>nagK</i>	N-Acetylglucosaminkinase	2.7.1.59	DTL3_0811
<i>nagA</i>	N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase	3.5.1.25	DTL3_1521
<i>nagB</i>	Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase	2.6.1.16	DTL3_1520, DTL3_0868

Lichenin-Fermentation

<i>dpp/oppAB</i>	Lichenin-Transporter		DTL3_0239, DTL3_0240, DTL3_0241, DTL3_0242, DTL3_0243
<i>licB</i>	Licheninase	3.2.1.73	DTL3_1187
<i>bgIB</i>	Thermostabile β -Glucosidase	3.2.1.21	DTL3_1195, DTL3_1036

Unvollständiger Citratzyklus

<i>idh</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.41	DTL3_1456
<i>korAB</i>	2-Oxoglutarat-Oxidoreduktase	1.2.7.3	DTL3_0268, DTL3_1175, DTL3_1243
<i>fumA</i>	Fumarat-Hydratase	4.2.1.2	DTL3_0326

Produktion von Wasserstoff

<i>hydABG</i>	[Fe-Fe]-Hydrogenase	1.12.1.4	DTL3_0797, DTL3_0798, DTL3_0799, DTL3_0213, DTL3_0215, DTL3_0216
---------------	---------------------	----------	---

Propionsäure-Metabolismus

<i>mcm</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase	5.4.99.2	DTL3_0596, DTL3_0597
<i>mmcE</i>	Methylmalonyl-CoA-Epimerase	5.1.99.1	DTL3_0599
<i>mmc</i>	Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase	2.1.3.1	DTL3_0600, DTL3_0601, DTL3_0602
<i>pduL</i>	Phosphat-Propanoyltransferase	2.3.1.222	DTL3_0787
<i>tdcD</i>	Propionat-/Acetatkinase	2.7.2.15	DTL3_0486

Galacturonsäure-Fermentation

<i>aguEFG</i>	Oligogalacturonsäure-Transporter		DTL3_0331, DTL3_0332, DTL3_0333
<i>agu4A</i>	α -Glucosidase	3.2.1.20	DTL3_0809, DTL3_1214
<i>uxaC</i>	Glucuronat-Isomerase	5.3.1.12	DTL3_0810
<i>uxuB</i>	D-Mannonat-Oxidoreduktase	1.1.1.57	DTL3_1165, DTL3_1328
<i>uxuA</i>	Mannonat-Dehydratase	4.2.1.8	DTL3_1329
<i>kdgK</i>	2-keto-3-deoxy-Deoxygluconat-Kinase	2.7.1.178	DTL3_0817

¹ Das Transportsystem XylEFG importiert Xylose und Glucose (Frock *et al.*, 2012).² Diese Gene kodieren für ein nicht weiter charakterisiertes Dpp/Opp-Transportsystem, welches für den Transport von Cellobiose vorgeschlagen wird (Conners *et al.*, 2006).³ Das Gen *melA* wird als multifunktionale α -Galactosidase (EC 3.2.1.22) beschrieben.⁴ Das Enzyme PorABCD wird als bifunktionales Enzym beschrieben (Eram *et al.*, 2015).⁵ Das Substratbindeprotein MalE des MalEFG-Transportsystems ist als Substratbindeprotein für mehrere Kohlenhydrate beschrieben (Wassenberg *et al.*, 2000 und Collins *et al.*, 2006).

4. Diskussion

4.1 Säure-bildende Isolate in Biogasanlagen

In der Vergangenheit haben viele molekularbiologische Untersuchungen (Metagenom, qPCR, DGGE, Klonbibliotheken) einen Einblick in die mikrobielle Biozönose in Biogasanlagen und Laborfermentern gegeben (z. B. Klocke *et al.*, 2007; Schlüter *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2012). Allerdings wurde in diesen Studien auch deutlich, dass aufgrund mangelnder Referenzdaten viele DNA-Sequenzen nicht zugeordnet werden konnten (Krause *et al.*, 2008). Für einen möglichst hohen Ertrag von Biogas durch mikrobiellen Abbau von organischem Material in Biogasanlagen spielen neben der Substratwahl auch verschiedene Parameter wie Verweilzeit, Raumbelastung, Temperatur und pH-Wert eine Rolle (Refai *et al.*, 2014). Diese Parameter haben einen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft in den Fermentern. Für eine gezieltere und präzisere Optimierung der Biogasproduktion ist es essentiell, die biologischen Prozesse während der Biogasbildung zu verstehen (Refai *et al.*, 2014). Bisher haben sich viele Studien mit der Hydrolyse von Polymeren und der Methanogenese befasst (z. B. Cirne *et al.*, 2007; Nettmann *et al.*, 2008; Maus *et al.*, 2013; Stantscheff *et al.*, 2014). Da viele Bakterien sowohl hydrolytische als auch fermentative Eigenschaften aufweisen, gehen die Stufen Hydrolyse und Acidogenese oft nahtlos ineinander über. Allerdings sollte die Acidogenese als eigene Stufe hervorgehoben werden, da in dieser Stufe aus Hydrolyseprodukten und primären Gärprodukten leicht flüchtige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure) sowie Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff, Schwefelwasserstoff und Ammonium gebildet werden, welche einen großen Einfluss auf den Gesamtprozess des anaeroben Abbaus haben können. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff sowie Essigsäure um wichtige Substrate für die Methanogenese (hydrogenotrophe bzw. acetoklastische Archaeen). Dagegen können Propionsäure und Buttersäure angereichert in Biogasanlagen zu einer Versäuerung des Fermenters und damit zu einer Störung der Balance zwischen den einzelnen Organismengruppen führen (Ahring *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 2007).

Für ein besseres Verständnis des anaeroben Abbaus und der Interaktionen zwischen Mikroorganismen in Biogasanlagen ist es wichtig zu wissen, welche Bakterien an der Acidogenese beteiligt sind. Von besonderem Interesse sind hierbei Bakterien, welche für die eben genannten potentiellen Störfaktoren verantwortlich sein können bzw. wichtige Substrate für die Methanogenese bilden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch die Isolierungsarbeiten und die

Charakterisierung von Essigsäure-, Propionsäure und Buttersäure-bildenden Bakterien neue Einblicke in den Prozess des anaeroben Abbaus gegeben werden (Abschnitte 4.2 und 4.3). Für eine gezielte Isolierung von acidogenen Bakterien aus Biogasanlagen wurde ein Mineralsalzmedium verwendet, bei welchem auf komplexe Bestandteile wie Hefeextrakt oder Reaktorfiltrat verzichtet wurde. Durch die Wahl eines Minimalmediums sollte somit schon eine gewisse Selektion erreicht werden. Neben geringen Konzentrationen an Natriumhydrogencarbonat, N_2/CO_2 und Cystein-Hydrochlorid, welche als Puffer oder als reduzierende Agenzien in den Nährmedien unerlässlich waren, enthielten die Nährmedien eine Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 6 g/l (Laktat, Succinat, Glycerin, Glucose, Ethanol, Aminosäuren). Für die Isolierung wurden Substrate ausgewählt, bei welchen es sich um Hydrolyseprodukte oder primäre Gärprodukte des anaeroben Abbaus von Kohlenhydraten, Fetten oder Proteinen handelt und welche durch Mikroorganismen zu Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure vergoren werden können (vgl. Abschnitt 1.5).

Die wichtige Bedeutung der ausgewählten Substrate in der anaeroben Abbaukette wird im Folgenden näher betrachtet: Glucose ist Bestandteil vieler Polysaccharide (z. B. Stärke, Cellulose oder Saccharose), welche als Reservestoffe oder Zellwandbestandteile in Pflanzenzellen vorkommen. In der Hydrolysestufe entsteht Glucose vor allem beim Abbau von Polymeren durch hydrolytische Enzyme, welche von Vertretern des Phylums Firmicutes ausgeschieden werden (Bauer *et al.*, 2009). Milchsäure entsteht dagegen als primäres Gärprodukt durch homofermentative oder heterofermentative Milchsäurebakterien (Vertreter der Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus* bzw. *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*; Kandler, 1983) während des anaeroben Abbaus in der Biogasanlage oder bereits während der Silierung von Pflanzenmaterial (z. B. Maissilage). Ethanol wird bei der alkoholischen Gärung sowie als Nebenprodukt bei weiteren Gärungen (z. B. heterofermentative Milchsäuregärung oder gemischte Säuregärung) gebildet. Beispielsweise wird Ethanol von *Clostridium saccharolyticum*, *Ruminococcus albus* oder *Enterococcus faecium* gebildet (Wirth *et al.*, 2012). Succinat ist ein Intermediat des Citratzyklus. Darüber hinaus besitzen *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniciproducens* (Isolate aus Rinderpansen) die Fähigkeit, Glucose oder anderen Substrate in Succinat umzuwandeln (Song und Lee, 2006). Bei der gemischten Säuregärung durch *Escherichia coli* kann Succinat zusätzlich zur Bildung von Laktat, Ethanol, Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid entstehen (Wirth *et al.*, 2012). Glycerin ist Bestandteil von Neutralfetten und kann auch anaerob durch *Lactobacillus lycopersici* aus Zuckern gebildet werden (Rossi *et al.*, 2012). Proteolytische Bakterien, wie z. B. Vertreter der Gattung *Clostridium*, hydrolysieren anaerob Proteine zu Aminosäuren.

Im Gegensatz zu den bereits vorhandenen Studien gibt es nur wenige Studien über die mikrobielle Diversität effektiv laufender Biogasanlagen ohne Störungen (Theuerl *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Fokus auf vier verschiedene landwirtschaftliche Biogasanlagen gelegt, welche keine Probleme oder Prozessstörungen aufwiesen. Die Anlagen unterschieden sich lediglich in der Temperatur (eine thermophile und drei mesophile Biogasanlagen) und in den Inputstoffen (Tabelle 2.2). Als wichtige Gemeinsamkeit wurden alle Anlagen hauptsächlich mit dem nachwachsenden Rohstoff Maissilage gefüttert, welcher jeweils die Hauptkomponente der Inputstoffe ausmachte. Um nicht nur eine spezielle Bakteriengruppe, sondern ein breites Spektrum an Bakterien zu isolieren, welche die Fähigkeit besitzen, unter minimalen Bedingungen Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Substraten der anaeroben Abbaukette zu bilden, wurden sechs verschiedene Kohlenstoffquellen in den Nährmedien eingesetzt. Als Gegensatz zu den gut funktionierenden Biogasanlagen wurden zwei Laborfermenter der Universität Hohenheim beprobt, welche nur mit Maissilage gefüttert waren und in welchen ein Überdruck von 50 bzw. 100 bar eingestellt wurde. Mit diesen Laborfermentern wird untersucht, welche Mikroorganismen unter solch hohen Drücken in der Lage sind, organische Masse zu Methan abzubauen, welches ohne eine vorherige kostenintensive Gasverdichtung in das Erdgasnetz eingespeist werden könnte.

4.2 Identifizierung und Phylogenie der Säure-bildenden Isolate

Aus den untersuchten Biogasanlagen und Hochdruck-Biogas-Laborfermentern konnten insgesamt 49 Isolate gewonnen werden. Die Artidentifizierung erfolgte hauptsächlich durch Vergleich der 16S rDNA-Sequenzen der Isolate mit den Datenbanken BLAST und EzTaxon (Altschul *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2012). Zusätzlich erfolgte die Identifizierung vieler Isolate durch Vergleich von Fingerprintmustern des Restriktionsverdaus oder der SAPD-PCR. Die für diese Arbeit entwickelten spezifischen Primerpaare konnten ebenfalls zur Artidentifizierung hinzugezogen werden. Laut Stackebrandt und Goebel (1994) liegt die Artgrenze in der Bakteriologie bei 97 % Sequenzidentität der 16S rDNA-Sequenz. Sieben Isolate konnten aufgrund dieses Artkriteriums als die Arten *Sporanero bacter acetigenes*, *Clostridium aminovale ricum*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Soehngenia saccharolytica*, *Tepidimicrobium xylanilyti cum* und *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (2 Isolate) identifiziert werden. Mit Hilfe der Primerpaare Tpf/Tpf (Westerholm *et al.*, 2011a), SG14fw/rev, GlyW34fw/rev, Tepsynfw/rev, Desausfw/rev konnte zusätzlich zum Artkriterium von 97 % die Identität fünf weiterer Isolate als *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, *Clostridium kluyveri*, *Selenomonas*

bovis, *Tepidanaerobacter syntrophicus* und *Desulfotomaculum australicum* bestätigt werden. Im Falle der Isolate L2, L3, L5, V5, AS22, AS30, ASV2, Succ20, Succ22 und LW3.3 wurde die Identifizierung als *Defluviitoga tunisiensis* (99 - 100 %) mittels der Restriktionsmuster oder des spezifischen Primerpaares L3fw/rev abgesichert. Weiterhin konnte für neun mesophile Isolate (Tabelle 3.2) sowohl durch das Fingerprintmuster der SAPD-PCR als auch durch das spezifische Primerpaar ASG2.3fw/rev die 97 - 98 %ige Sequenzidentität zu *Clostridium sporosphaeroides* bestätigt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Artkriterium von 97 % nicht für alle Organismen einer Gattung zutrifft und diese somit auch oberhalb von 97 % unterschiedliche Arten darstellen. Beispielsweise kann die Gattung *Bacillus* nur schwer anhand der 16S rDNA-Sequenz identifiziert werden (Fox *et al.*, 1992). Auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wies Isolat GlucSH101 eine 99 %ige Ähnlichkeit zu *Bacillus firmus*, *Bacillus soralis* und *Bacillus circulans* auf. Da es sich bei *Bacillus soralis* um ein aerobes Bakterium handelt (Vos *et al.*, 2009) und das Isolat GlucSH101 allerdings anaerob isoliert und kultiviert wurde, kann anhand dieses physiologischen Merkmals die Identifizierung auf die Arten *Bacillus firmus* und *Bacillus circulans* eingeschränkt werden. Zwei weitere Isolate aus den Hochdruck-Biogas-Fermentern konnten den Gattungen *Tissierella* und *Enterococcus* zugeordnet werden. Isolat SG1.1 zeigte bei einem Abgleich von 1278 bp mit den Datenbanken eine 100 %ige Übereinstimmung der 16S rDNA zu *Desulfotomaculum guttoideum*, *Clostridium celerecrescens* und *Clostridium sphenoides*. Stackebrandt *et al.* (1997) weisen in ihrer Studie darauf hin, dass diese drei Arten eine 99 %ige Ähnlichkeit der 16S rDNA besitzen. Anhand der 16S rDNA kann in diesem Fall keine genaue Artzugehörigkeit für Isolat SG1.1 festgelegt werden. Isolat AG1.4B hatte eine 99 %ige Sequenzähnlichkeit zu *Clostridium cochlearium* und *Clostridium tetani*. Diese beiden Arten sind ebenfalls auf Basis der 16S rDNA schwer zu unterscheiden, sie besitzen eine 98,1 %ige Ähnlichkeit (Vos *et al.*, 2009). Bei der phylogenetischen Stammbaumanalyse gruppierte das Isolat näher mit *Clostridium cochlearium*. Drei Isolate wiesen Sequenzähnlichkeiten unterhalb von 93 % auf: Isolat EG2.4 (*Desulfotomaculum* sp.), Isolat SG1.4B (*Gallicola* sp.) und Isolat ASSH51 (*Acholeplasma* sp.). Hierbei könnte es sich um neue Arten handeln. Aufgrund des schlechten Wachstums von Isolat EG2.4, des späten Isolierungszeitpunktes von Isolat SG1.4B und der Einstufung des nächsten Verwandten (*Acholeplasma morum*) von Isolat ASSH51 in die Risikogruppe 2 konnte bei diesen Isolaten keine weitere phylogenetische Einordnung und physiologische Charakterisierung erfolgen. Drei Isolatgruppen erwiesen sich als „Grenzfälle“ und konnten ebenfalls nicht eindeutig anhand der 16S rDNA-Sequenz identifiziert werden. Isolate AS34 und AS46 hatten eine 96 %ige Ähnlichkeit zu *Tepidanaerobacter acetatoxydans* und

Tepidanaerobacter syntrophicus. Sequenzähnlichkeiten zwischen 95 und 100 % zu *Dendrosporobacter quercicolus* wiesen die Isolate LG2,4, LW3.1B, LW3.2, LW3.4, LW3.5 und LW3.6 aus den mesophilen Biogasanlagen Gebel und Wagner auf. Isolat ASG1.4 zeigte auf Basis der 16S rDNA eine 96 %ige Übereinstimmung zu *Proteiniborus ethanoligenes*. Für alle drei Gruppen wurden Isolat-spezifische Primer (AS34fw/rev, LakG2.4fw/rev, ASG1.4fw/rev; Tabelle 2.13) entwickelt, welche an spezifische Bereiche der 16S rDNA binden. Mit diesen Primerpaaren konnten nur entsprechende PCR-Amplifikate mit den Isolaten, nicht allerdings mit den nächst verwandten Referenzstämmen (Abbildung 3.5) entstehen. Diese Ergebnisse könnten Hinweise darauf sein, dass es sich bei diesen Säure-bildenden Isolaten um neue Arten der Gattungen *Tepidanaerobacter*, *Proteiniborus* und *Dendrosporobacter* handelt.

Die durchgeführten Untersuchungen (Vergleich der 16S rDNA mit Datenbanken, Fingerprintmuster der SAPD-PCR und des Restriktionsverdaus sowie Isolat-spezifische Primer) zeigen somit, dass es sich bei den 49 Isolaten wahrscheinlich um 24 verschiedene Arten handelt.

4.3 Bedeutung der Säure-bildenden Isolate in Biogasanlagen

Durch den Einsatz von Minimalmedien mit jeweils einer der Kohlenstoffquellen Laktat, Succinat, Glycerin, Glucose, Ethanol oder der Aminosäure-Mischung und der anschließenden Untersuchung mittels HPLC konnte für jedes Isolat die Fähigkeit zur Essigsäurebildung festgestellt werden. Die Isolate waren somit in der Lage, aus Hydrolyseprodukten bzw. primären Gärprodukten Essigsäure als wichtiges Substrat für die Methanogenese zu bilden. Zusätzlich konnte bei den Isolaten *Bacillus thermoamylovorans* GlucSH52, *Tepidanaerobacter* sp. AS34 bzw. AS46, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc2 und Gluc4, *Clostridium* sp. ASG1.4B, *Clostridium aminovalericum* LG2.2 und LG2.3, *Clostridium sporosphaeroides* (Stämme ASG2.1A, ASG2.1B, ASG2.3, ASW3.3), *Proteiniborus* sp. ASG1.4, *Dendrosporobacter* sp. (Stämme LG2.4, LW3.1B, LW3.3, LW3.4, LW3.5, LW3.6) und *Selenomonas bovis* GlyW3.4 die Bildung von Propionsäure oder Buttersäure beobachtet werden. In der Literatur gibt es nur unzureichend Daten zur mikrobiellen Gemeinschaft und beteiligten Bakterien in Biogasanlagen mit Störungen in Bezug auf Propionsäure oder Buttersäure. Daher ist es schwierig, die Bedeutung der erhaltenen Isolate in Biogasanlagen mit solchen Störungen zu beurteilen.

Da in den untersuchten Biogasanlagen und Hochdruck-Biogas-Laborfermentern hauptsächlich Maissilage als Substrat zum Einsatz kam, wurde die Rolle der erhaltenen Isolate speziell mit Hinblick auf die Verwertung von Kohlenhydraten hin untersucht. Zusätzlich wurde getestet, ob die Isolate Säuren abbauen können oder in der Lage sind, mit H_2/CO_2 zu wachsen. Die Ergebnisse der Substratverwertungsversuche der sechs ausgewählten Isolate zeigten, dass Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure sowohl aus Polymeren (Stärke und Xylan), Oligosacchariden und Monosacchariden als auch aus Säuren, Alkoholen, Aminosäuren und H_2/CO_2 gebildet werden können. Die erzielten Ergebnisse und ein Vergleich der Isolate mit der Literatur zeigen, dass die erhaltenen Isolate aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratnutzungen in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können:

- 1) *Verwertung von Kohlenhydraten (Polymere, Oligosaccharide und Monosaccharide) und zusätzlich primären Gärprodukten*
- 2) *Verwertung von Kohlenhydraten (Polymere, Oligomere und Monosaccharide)*
- 3) *Verwertung von Oligosacchariden bzw. Monosacchariden sowie primären Gärprodukten*
- 4) *Verwertung von Aminosäuren*
- 5) *Verwertung von Säuren und H_2/CO_2 .*

Die Einteilung der Gruppen soll verdeutlichen, an welchen Stellen im anaeroben Abbau die Isolate hauptsächlich beteiligt sein könnten. Da verschiedene Stämme von Arten auch leichte Variationen in der Substratverwertung zeigen, kann es auch innerhalb einer Gruppe vorkommen, dass vereinzelt Substrate verwertet bzw. nicht verwertet werden können, welche nicht „Hauptsubstrate“ der Gruppe sind. In den folgenden Abbildungen 4.1 bis 4.5 sind zu einer besseren Übersicht die Arten, welche in die genannten Gruppen eingeteilt werden konnten, mit ihrem Substratspektrum in die anaerobe Abbaukette eingeteilt. Die Daten der Substratspektren entstammen den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit oder der jeweils angegebenen Literatur.

1) Verwertung von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide) und zusätzlich primären Gärprodukten

Die physiologischen Versuche haben gezeigt, dass die Isolate *Defluviitoga tunisiensis* L3 und *Selenomonas bovis* GlyW3.4 Polysaccharide, Oligosaccharide, Monosaccharide und zusätzlich primäre Gärprodukte verwerten und daher in diese Gruppe eingeteilt werden können. Das Essigsäure-bildende Bakterium *Defluviitoga tunisiensis* scheint eine wichtige Rolle in Biogasanlagen während des anaeroben Abbaus einzunehmen. Dieses Bakterium konnte aus einer

mesophilen Biogasanlage (ein Isolat, BGA Wagner) und aus der thermophilen Biogasanlage Butschen (neun Isolate) aus Anreicherungskulturen mit Laktat, Succinat und Aminosäuren isoliert werden. Die Bedeutung dieses Isolates für den anaeroben Abbau wird in Abschnitt 4.4 im Zusammenhang mit der Genomannotation diskutiert.

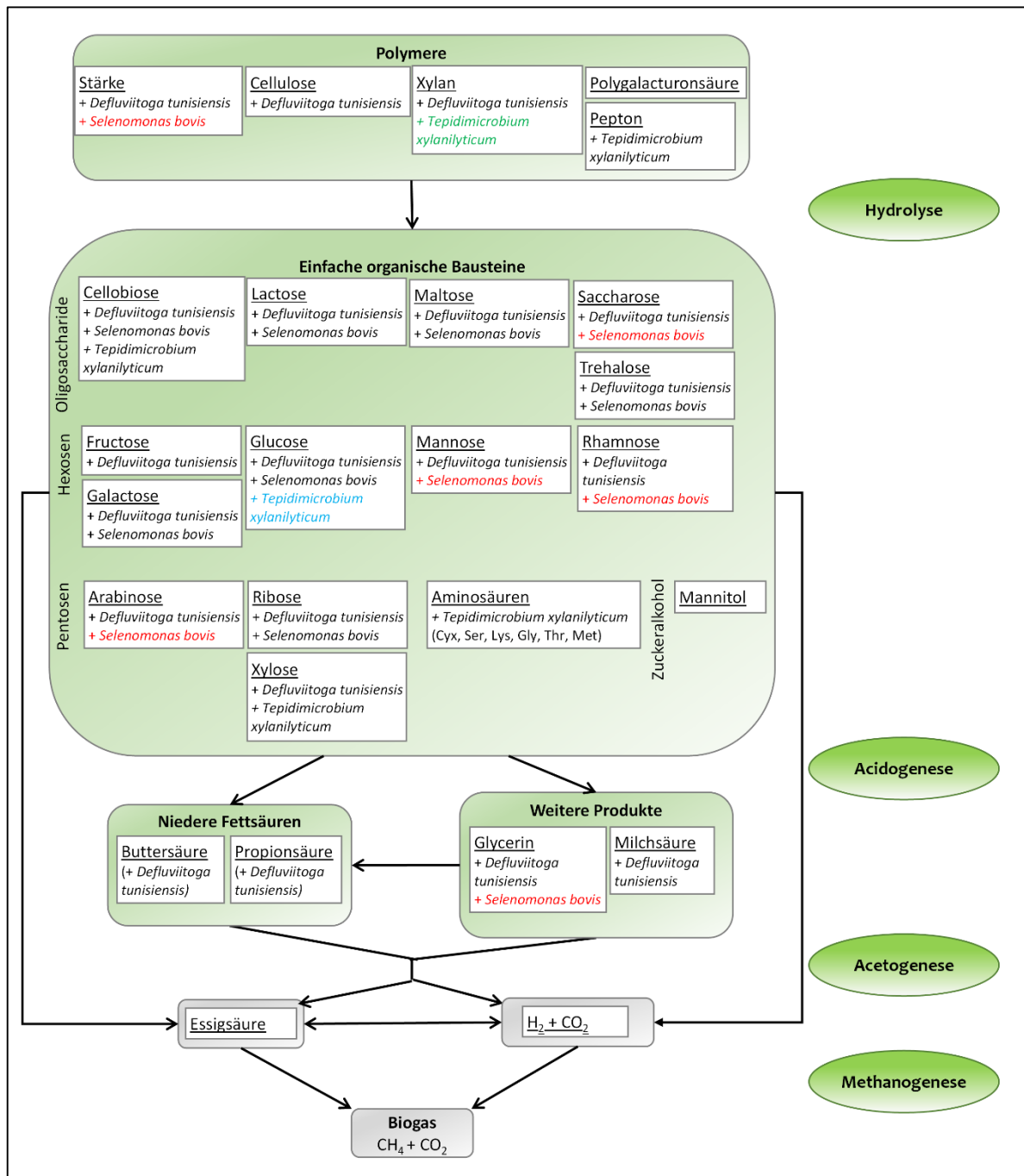


Abbildung 4.1: Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 1: Verwertung von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide) und zusätzlich primären Gärprodukten. Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure; blau markiert: Bildung von Buttersäure und geringen Mengen Propionsäure.

Isolat *Selenomonas bovis* GlyW3.4 kann ebenfalls aufgrund des Substratspektrums zu dieser Gruppe gezählt werden. Es konnte eine Vielzahl an Zuckern verwerten und aus Stärke, Sac-

charose, Mannose, Rhamnose, Arabinose und dem Alkohol Glycerin Propionsäure bilden (Abbildung 4.1, rot markiert). Als weitere Produkte wurden in den Substratverwertungsversuchen mittels HPLC auch Essigsäure, Succinat und Milchsäure detektiert. *Selenomonas bovis* wurde ursprünglich aus einem Yak-Pansen isoliert und bisher nur mittels DGGE in einem Laborfermenter mit Laubstreu nachgewiesen (Zhang und Dong, 2009; Ohnishi *et al.*, 2010). Isolat GlyW3.4 ist somit das erste Isolat aus einer Biogasanlage. In den normal funktionierenden Biogasanlagen wurde *Selenomonas bovis* mit bis zu 10^4 Kopien der 16S rDNA detektiert. Da es sich um ein mesophiles Bakterium handelt (Temperaturoptimum zwischen 27 - 46 °C) wurde es vermutlich in der thermophilen Biogasanlage am geringsten detektiert (10^2 Kopien der 16S rDNA). Aufgrund des großen Substratspektrums in der Verwertung von Zuckern (Stärke, Cellobiose, Laktose, Maltose, Saccharose, viele Hexosen und Pentosen) wäre es denkbar, dass dieser Organismus bei einer Überladung der Biogasanlage mit Substrat (z. B. Maissilage) wegen seiner Fähigkeit zur Säurebildung auch zu einer Ansäuerung des Fermenters beitragen könnte. Denn *Selenomonas bovis* ist in der Lage, im pH-Bereich 4,2 - 8,3 zu wachsen (Zhang und Dong, 2009).

Das thermophile Isolat *Tepidimicrobium xylanilyticum* D1 könnte ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt werden. Ursprünglich isoliert wurde *Tepidimicrobium xylanilyticum* aus einem thermophilen anaeroben Fermenter, in welchem Abwasser und Kommunal Müll behandelt wurden (Niu *et al.*, 2009). Es verwertet ebenfalls eine Reihe von Kohlenhydraten (Xylan, Xylose, Glucose und Cellobiose) und kann zudem proteinhaltige Komponenten wie Pepton, Trypton, Hefeextrakt und einige Aminosäuren nutzen. Beim Abbau von Glucose wurden Buttersäure, Essigsäure, Ethanol, Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und geringe Mengen an Propionsäure detektiert, beim Abbau von Xylan Propionsäure. Außerdem wird die Bildung von Schwefelwasserstoff und Ammoniak beschrieben (Niu *et al.*, 2009). Belostotskiy *et al.* (2015) stellten mit Hilfe einer 16S rRNA-Gen-basierten Pyrosequenzierung-Analyse eine Zunahme von *Tepidimicrobium xylanilyticum* in einem Laborfermenter mit Hühnchenabfall fest, bei welchem die Raumbelastung gesteigert und die Verweilzeit der Substrate verkürzt wurde. Diese Eigenschaften von *Tepidimicrobium xylanilyticum* (breites Substratspektrum, Bildung von Propionsäure, Buttersäure, Schwefelwasserstoff und Ammoniak) sowie das verstärkte Vorkommen in Fermentern mit erhöhtem Substratangebot könnten Hinweise liefern, dass *Tepidimicrobium xylanilyticum* auch in überladenen Biogasanlagen vermehrt vorkommen und somit zu einer Versäuerung des Fermenters führen könnte.

2) Verwertung von Kohlenhydraten (Polymere, Oligomere und Monosaccharide)

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum (Isolate Gluc2 und Gluc4) ist ein Beispiel für Organismen der zweiten Gruppe, welche hauptsächlich in der Lage sind, Kohlenhydrate zu fermentieren. Die Versuche zur Substratverwertung zeigten, dass Isolat Gluc4 Polysaccharide wie Stärke und Xylan, viele Oligosaccharide und Monosaccharide zu Buttersäure, Milchsäure und Essigsäure vergären konnte, allerdings keine primären Gärprodukte oder Säuren (Abbildung 4.2). *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* kommt ubiquitär vor und wurde bereits aus faulem Weizenstroh, einem Fermenter (gefüttert mit Effluent einer Palmölfabrik), Elefantenkot oder einer Dextran-Anreicherung isoliert (Hoster *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; O-Thong *et al.*, 2008; Saripan und Reungsang, 2013). O-Thong *et al.* (2008) beschreiben in ihrer Studie, dass dieser Organismus hohe Erträge an Wasserstoff produziert. Bei den Substratverwertungsversuchen des Isolates Gluc4 konnte in den Reaktionsgefäßen ebenfalls ein großer Gasüberdruck festgestellt werden. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* könnte somit als Verwerter von Polysacchariden und Produzent von Wasserstoff und Buttersäure eine große Bedeutung in thermophilen Biogasanlagen haben, da er beispielsweise auch in hohen Abundanzen molekularbiologisch in Laborfermentern (Substrate Stroh und Heu) von Leuhn *et al.* (2014) detektiert werden konnte. In Experimenten von Luo *et al.* (2011) war *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* in zweistufigen Laborfermentern (Wasserstoff und Methan-Bildung) an der gesteigerten Bioenergie-Produktion als dominante Spezies im „Wasserstoff-Fermenter“ beteiligt. Dies wurde mittels DGGE nachgewiesen und verdeutlicht somit die Rolle von *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* als wichtigen Wasserstoffproduzenten für die Methanogenese.

Die Hochdruck-Biogas-Laborfermenter der Universität Hohenheim beinhalteten als Substrat nur Maissilage. Aus diesen Fermentern konnten drei Arten isoliert werden, welche laut Literatur Kohlenhydrate verwerten können: *Soehngenia saccharolytica*, *Bacillus thermoamylovorans* und *Tepidanaerobacter syntrophicus*. *Bacillus thermoamylovorans*, ursprünglich isoliert aus senegalesischem Palmwein, kann Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide verwerten und führt die heterolaktische Milchsäuregärung mit den Produkten Laktat, Acetat, Ethanol und Formiat durch, ohne Bildung von Wasserstoff (Combet-Blanc *et al.*, 1995). Koeck *et al.* (2014a) beschreiben einen Stamm, welcher aus einer mesophilen Biogasanlage isoliert wurde und welcher Stärke, Xylan und Pectin verwerten kann. Isolat GlucSH52 stammte aus dem Hochdruck-Biogas-Laborfermenter mit 50 bar Überdruck und konnte aus Glucose Propionsäure bilden. Da *Bacillus thermoamylovorans* keine Sporen bildet (Vos *et al.*,

2009), scheint dieser Organismus auch unter extremen Bedingungen (Inkubation von 30 Tagen in einem 50 bar-Fermenter) leben zu können.

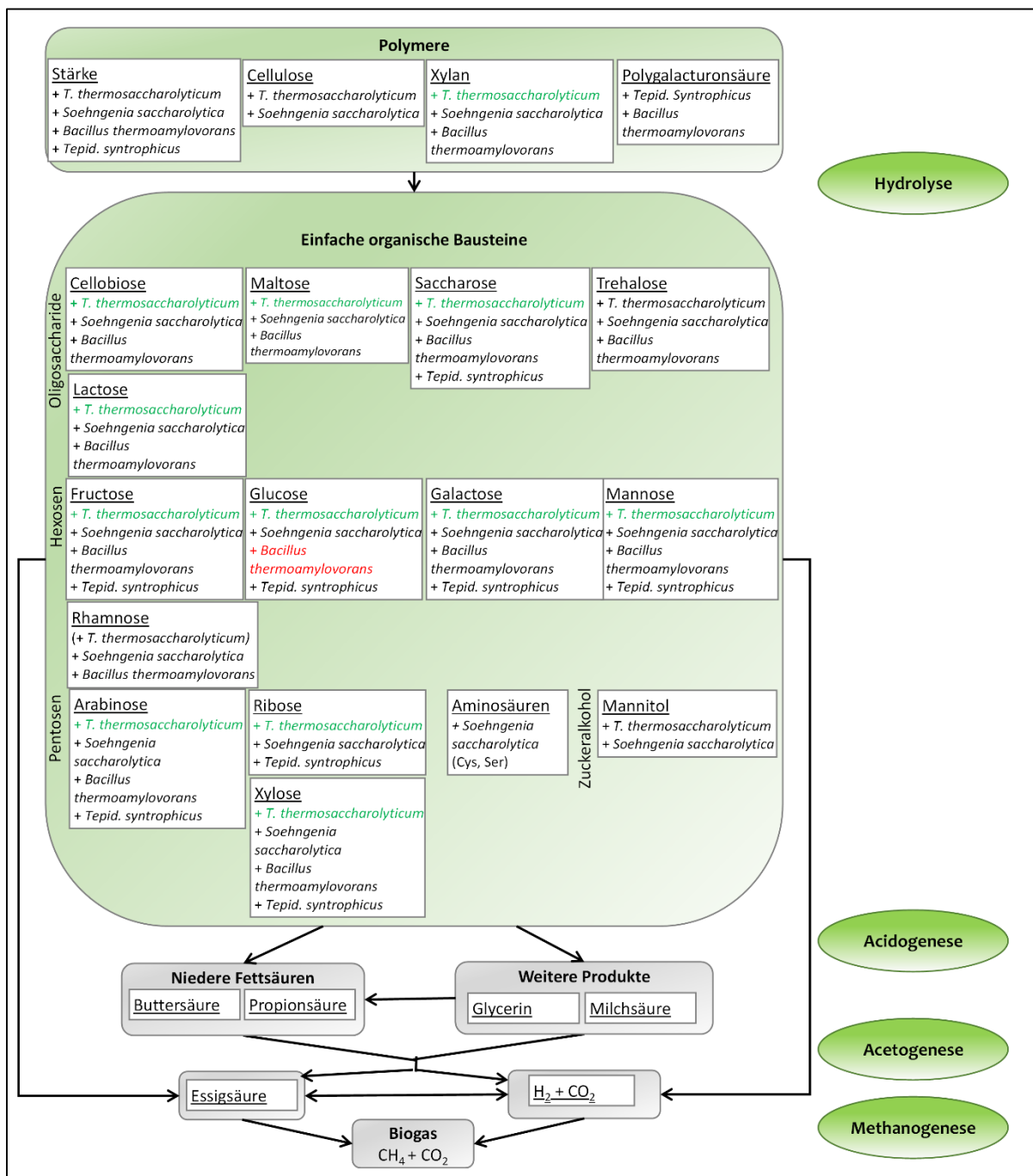


Abbildung 4.2: Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 2: Verwertung von Kohlenhydraten (Polymere, Oligomere und Monosaccharide). Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure. *T.* = *Thermoanaerobacterium*; *Tepid.* = *Tepidanaerobacter*.

Ein weiteres Isolat des 50 bar-Hochdruck-Fermenters war *Soehngenia saccharolytica* LakSH53A. Ebenso wie *Bacillus thermoamylovorans* kann dieser Organismus Polysaccharide wie Xylan, Stärke und Cellulose, aber auch viele Oligo- und Monosaccharide verwerten (z. B.

Cellulose, Xylose, Arabinose, Glucose, Lactose; Parshina *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu *Bacillus thermoamylovorans* wurde bei *Soehngenia saccharolytica* Sporenbildung festgestellt, weshalb es durchaus möglich wäre, dass Isolat LakSH53A auch durch Sporenbildung den Druck von 50 bar überstanden hat. Die Isolierung des Isolates erfolgte unter 0,5 bar. *Soehngenia saccharolytica* wurde ursprünglich aus einem anaeroben Fermenter mit Kartoffelstärkeabfall isoliert. Die Tatsache, dass Isolat LakSH53A aus einem Maissilage-Fermenter stammt, lässt vermuten, dass *Soehngenia saccharolytica* hauptsächlich bei der Hydrolyse von Polysacchariden beteiligt ist. Weiterhin wurde aus dem 50 bar-Fermenter das Isolat *Tepidanaerobacter syntrophicus* LakSH53B gewonnen. In der Literatur wird *Tepidanaerobacter syntrophicus* als Verwerter von verschiedenen Kohlenhydraten beschrieben (z. B. Glucose, Xylose, Fructose, Mannose, Stärke und Pectin; Abbildung 4.2). Säuren und potentielle primäre Gärprodukte wie Laktat, Glycerin, Succinat oder Pyruvat konnte das Bakterium nicht verwerten (Sekiguchi *et al.*, 2006). *Tepidanaerobacter syntrophicus* wurde ursprünglich aus einer thermophilen Biogasanlage isoliert und kann zwischen 25 und 60 °C wachsen. Dies passt auch zur Beobachtung, dass Isolat LakSH53B bei 39 °C wachsen konnte. *Tepidanaerobacter syntrophicus* bildet laut Sekiguchi *et al.* (2006) keine Sporen. Somit kann mit Isolat LakSH53B die Befähigung zum Wachstum unter hohem Druck als weitere Eigenschaft dieser Art festgehalten werden. Die in der Literatur beschriebene Fähigkeit zum Kohlenhydratabbau durch *Bacillus thermoamylovorans*, *Soehngenia saccharolytica* und *Tepidanaerobacter syntrophicus* zeigen, dass alle drei Organismen sowohl an der Hydrolyse der Maissilage im 50 bar-Fermenter beteiligt sein können, als auch an den beim Abbau von Polysacchariden entstehenden Zuckern wie beispielsweise Maltose, Glucose, Xylose oder Arabinose. Die Fermentation der Zucker resultiert dabei hauptsächlich in der Bildung von Essigsäure, welches von methanogenen Archaeen verwertet werden kann.

Die nächsten Verwandten des Isolates *Bacillus* sp. GlucSH101 aus dem 100 bar-Hochdruck-Fermenter der Universität Hohenheim (99 % *Bacillus firmus* und *Bacillus circulans*) können Stärke hydrolysieren und mit einigen Zuckern wachsen (z. B. Maltose, Trehalose, Glucose; Vos *et al.*, 2009). Da beide Organismen in der Lage sind, Sporen zu bilden, kann an diesem Punkt nicht eindeutig bestätigt werden, ob *Bacillus* sp. GlucSH101 auch unter einem Druck von 100 bar in der Lage ist, Kohlenhydrate zu verwerten.

3) Verwertung von Oligosacchariden bzw. Monosacchariden sowie primären Gärprodukten

In den durchgeführten Substratverwertungsversuchen und einem Vergleich mit der Literatur wurde deutlich, dass manche Mikroorganismen keine Polymere verwerten können, sondern vereinzelt Zucker (meist Monosaccharide) und primäre Gärprodukte. In diese Gruppe kann beispielsweise das Isolat *Gallicola* sp. SG1.4B eingeordnet werden, welches aus der mesophilen Biogasanlage Glahn isoliert wurde. Die physiologischen Versuche zeigten, dass dieses Isolat Cellobiose, Trehalose, Galactose, Glucose, Arabinose, Ribose und Glycerin verwerten kann. Aufgrund der 89 %igen Sequenzähnlichkeit zu *Gallicola barnesae* handelt es sich vermutlich bei diesem Isolat um eine neue Art, welche noch nicht in Biogasanlagen beschrieben wurde. Durch die Bildung von Essigsäure bildet es ein wichtiges Substrat für die Methanogenese. Die beiden Isolate LG2.2 und LG2.3 wurden aus der mesophilen Biogasanlage Gebel isoliert und waren in der Lage, aus Laktat Propionsäure und Essigsäure zu bilden. Bisher sind keine weiteren Isolate bzw. molekularbiologischen Nachweise von *Clostridium aminovalericum* in Biogasanlagen beschrieben. Laut Vos *et al.* (2009) verwertet *Clostridium aminovalericum* beispielsweise nicht Stärke, Glycogen, Laktose, Saccharose oder Lactose. Bei der Verwertung von Glucose in einem komplexen Medium (PYG-Medium) entsteht Essigsäure und eine große Menge Wasserstoff. Weiterhin kann *Clostridium aminovalericum* Aminovalerat zu Propionat, Acetat, Ammonium und Valerat umsetzen. Zusätzlich können die sechs Isolate LG2.4, LW3.1B, LW3.2, LW3.4, LW3.5 und LW3.6, welche aus den Biogasanlagen Gebel und Wagner isoliert wurden und Laktat zu Propionsäure und Essigsäure fermentieren konnten (Abbildung 4.3), der dritten Gruppe zugeordnet werden. Deren nächster Verwandter (*Dendrosporobacter quercicolus*) ist ebenso zur Propionsäurebildung befähigt und die bisher einzig beschriebene Art dieser Gattung. Hauptprodukte bei der Fermentation von Fructose sind Acetat, Propionat, Propanol und Wasserstoff. Stärke, Glycogen und Zucker wie Saccharose, Glucose, Trehalose werden nicht verwertet (Strömpl *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 2009). Molekularbiologisch wurde *Dendrosporobacter quercicolus* bisher nur mittels DGGE in einem Laborfermenter (gefüttert mit Glucose und Pepton) nachgewiesen (Li *et al.*, 2010). Mit ca. 10^2 bis 10^3 Kopien der 16S rDNA/g Biogasprobe war das Isolat *Dendrosporobacter* sp. LG2.4 in einer eher geringeren Abundanz in gut funktionierenden Biogasanlagen vorhanden. Dies könnte möglicherweise auf das geringe Substratspektrum zurückzuführen sein, wie es für die Gattung *Dendrosporobacter* bisher beschrieben ist. Weiterhin könnte auch *Tepidanaerobacter acetatoxydans* zu dieser Gruppe gezählt werden. Laut Westerholm *et al.* (2011b) kann dieser Organismus Oligosaccharide wie Cellobiose, Lactose oder Maltose sowie Hexosen und Pen-

tosen verwerten (Abbildung 4.3). Des Weiteren kann *Tepidanaerobacter acetatoxydans* in Syntrophie mit *Methanoculleus* sp. Acetat oxidieren (Westerholm *et al.*, 2011b).

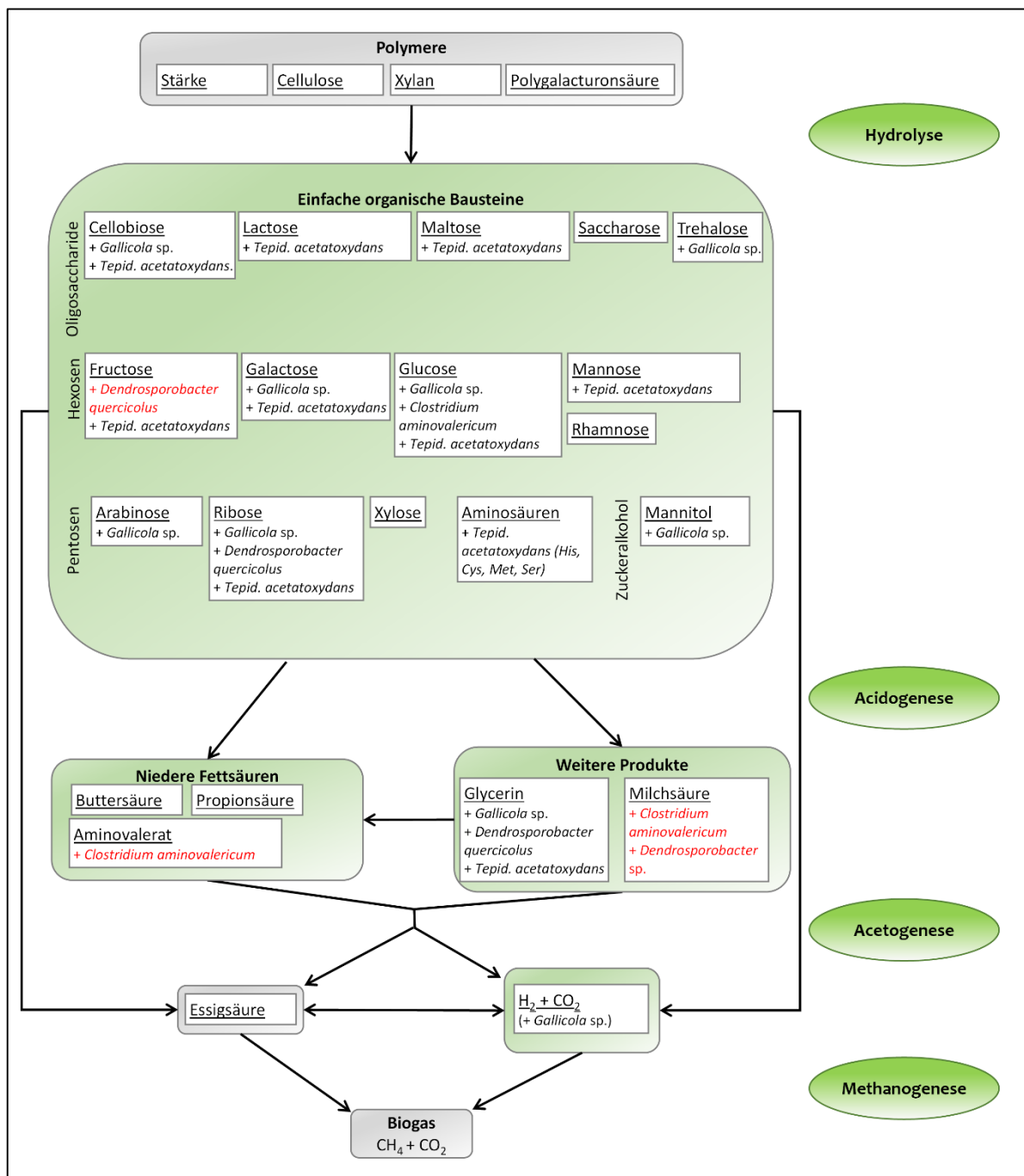


Abbildung 4.3: Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 3: Verwertung von Oligosacchariden bzw. Monosacchariden sowie primären Gärprodukten. Rot markiert: Bildung von Propionsäure. *Tepid.* = *Tepidanaerobacter*.

4) Verwertung von Aminosäuren

In die vierte Gruppe können Mikroorganismen eingeteilt werden, welche hauptsächlich Proteine oder Aminosäuren abbauen. Isolat *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3 könnte in diese Gruppe eingeordnet werden. Die Versuche zur Substratverwertung zeigten, dass Isolat ASG2.3 keine Polymere verwerten konnte und nur ein sehr schwaches Wachstum mit Zuckern (Tabelle 3.4; Abbildung 4.4) zeigte. Allerdings konnte dieses Isolat aus den angebotenen Aminosäuren (Alanin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin) Essigsäure und Buttersäure bilden. Acht weitere Isolate aus den mesophilen Biogasanlagen Gebel und Wagner konnten ebenfalls als *Clostridium sporosphaeroides* identifiziert werden und waren ebenfalls in der Lage, aus den angebotenen Aminosäuren Essigsäure, Propionsäure bzw. Buttersäure zu bilden. Das gute Wachstum mit Aminosäuren und das schwache Wachstum mit den oben aufgeführten Kohlenhydraten lassen den Schluss zu, dass *Clostridium sporosphaeroides* eine größere Bedeutung im Abbau von Aminosäuren und möglicherweise im Abbau von Proteinen zukommt als bei der Verwertung von Kohlenhydraten. In der Literatur wird weiterhin beschrieben, dass *Clostridium sporosphaeroides* Laktat zu Propionsäure verwerten kann und Glutamat zu Ammonium, Kohlenstoffdioxid, Essigsäure und Buttersäure metabolisieren kann (Vos *et al.*, 2009). Mit dem spezifischen Primerset ASG2.3fw/rev konnte *Clostridium sporosphaeroides* in den mesophilen Biogasanlagen mit 10^5 bis 10^6 Kopien der 16S rDNA/g Biogasprobe in einer größeren Zellzahl detektiert werden als in der thermophilen Biogasanlage Butschen (10^4 Kopien der 16S rDNA). Vermutlich ist dies auf das Wachstumsoptimum zurückzuführen (37 - 45 °C; Vos *et al.*, 2009). Molekularbiologisch wurde *Clostridium sporosphaeroides* in Laborfermentern (Substrat Bioabfall und Schweinegülle; Merlino *et al.*, 2013) mittels DGGE und in einer mesophilen Biogasanlage mittels 454-Pyrosequenzierung (Kröber *et al.*, 2009) nachgewiesen.

Weiterhin deutet die Fähigkeit von Isolat *Proteiniborus* sp. ASG1.4, Aminosäuren zu Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure umzusetzen, darauf hin, dass dieses Isolat in die dritte Gruppe eingeteilt werden kann. *Proteiniborus ethanolicus* ist der nächste Verwandte dieses Isolates und der bisher einzig beschriebene Vertreter dieser Gattung. Niu *et al.* (2008) beschreiben dieses Bakterium als proteinverwertend; es kann weder Kohlenhydrate noch die Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Methionin und Cystein metabolisieren. Zur Verwertung der Aminosäure Glutaminsäure gibt es keine Angaben. Isolat *Proteiniborus* sp. ASG1.4 konnte Glutaminsäure zu Essigsäure und Buttersäure fermentieren. Die Gattung *Proteiniborus* wurde molekularbiologisch in einem Laborfermenter, in welchem Schlamm einer Kläranlage

bei pH 8 und 9 vergoren wurde, mittels Pyrosequenzierung detektiert (Maspolim *et al.*, 2015). Möglicherweise spielt der aus der Biogasanlage Glahn isolierte Stamm *Proteiniborus* sp. ASG1.4 in gut funktionierenden, landwirtschaftlichen Biogasanlagen aufgrund seiner größeren Abundanz eine bedeutendere Rolle (ca. 10^5 Kopien der 16S rDNA/g Probe aller vier beprobten Biogasanlagen) als der nächste Verwandte *Proteiniborus ethanolicus* ($10^2 - 10^3$ Kopien).

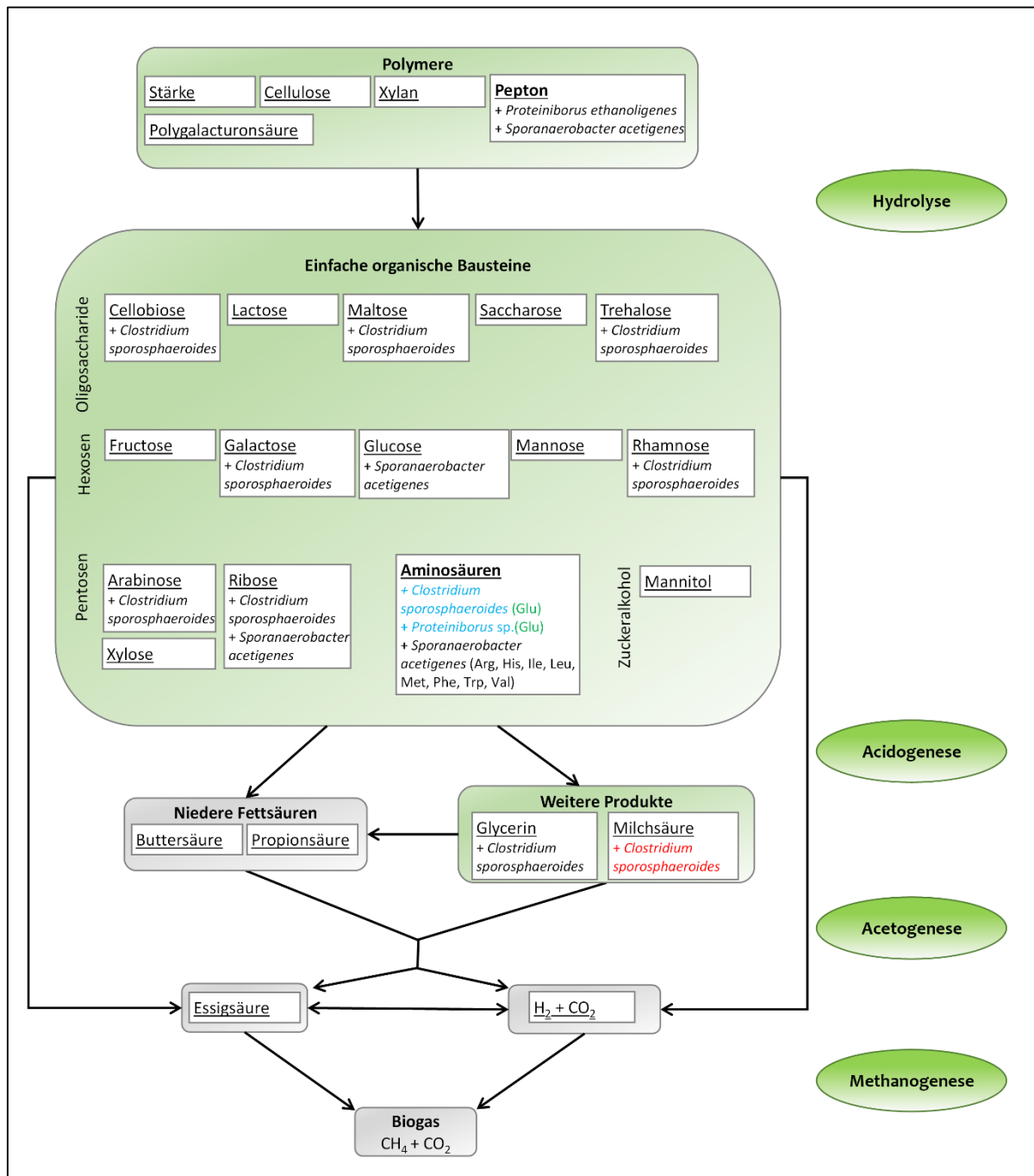


Abbildung 4.4: Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 4: Verwertung von Aminosäuren. Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure; blau markiert: Bildung von Buttersäure und Propionsäure.

Isolat LakW3.3B konnte als *Sporanaerobacter acetigenes* identifiziert werden. Diese Art wurde ursprünglich aus einem anaeroben Fermenter isoliert und kann nur die Zucker Glucose und Fructose verwerten sowie Pepton und einige Aminosäuren (z. B. Arginin, Histidin, Methionin; Hernandez-Eugenio *et al.*, 2002). Aus diesem Grund könnte diese Art auch in diese Gruppe eingeordnet werden. Bei der Verwertung von Valin und Pepton wurde die Bildung von Isobutyrat festgestellt. *Sporanaerobacter acetigenes* scheint eine wichtige Rolle im anaeroben Abbau zu spielen, da dieses Bakterium schon mehrfach molekularbiologisch in Biogasanlagen und Laborfermentern nachgewiesen wurde (Weiss *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Rismani-Yazdi *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2013). Bisher sind keine weiteren Isolate aus Biogasanlagen beschrieben.

Als weiterer Vertreter dieser vierten Gruppe könnte Isolat *Clostridium* sp. ASG1.4B gelten. Dieses Isolat wurde aus einer aminosäurehaltigen Anreicherungskultur der Biogasanlage Glahn isoliert. Wie seine nächsten Verwandten (99 %ige Übereinstimmung zu *Clostridium cochlearium* und *Clostridium tetani* auf Basis der 16S rDNA) kann dieser Organismus aus Glucose Essigsäure, Buttersäure und Propionsäure bilden. Weitere Zucker werden von diesen Organismen nicht verwertet. Beide Stämme verwerten Aminosäuren wie Threonin und Glutamat unter der Bildung von Propionsäure und Buttersäure. Weiterhin bilden sie Schwefelwasserstoff, Ammonium sowie große Mengen Wasserstoff (Vos *et al.*, 2009). Ebenfalls könnten zu dieser Gruppe auch die Isolate *Tepidanaerobacter* sp. AS34 und AS46 gezählt werden. Beide Isolate bildeten aus Aminosäuren Essigsäure und Propionsäure. Aufgrund des geringen Wachstums dieser Isolate war eine weitere physiologische Charakterisierung nicht möglich.

5) Verwertung von Säuren und H₂/CO₂

In diese Gruppe kann das thermophile Isolat *Desulfotomaculum australicum* L14 eingeordnet werden. Die physiologischen Versuche zeigten, dass dieses Isolat Milchsäure, Propionsäure und Buttersäure sowie lediglich ein paar Zucker verwerten konnte (Abbildung 4.5; Tabelle 3.4). Die Fähigkeit zum Abbau von kurzen Fettsäuren wie Propionat, Butyrat, Lactat oder Acetat durch die sulfatreduzierende Gattung *Desulfotomaculum* wird bei Nielsen *et al.* (1996) berichtet. Sulfatreduzierer können im anaeroben Abbau die Methanogenese beeinflussen. Auf der einen Seite können sie beispielsweise Fettsäuren wie Propionsäure und Buttersäure zu Essigsäure abbauen und somit ein wichtiges Substrat für die acetoklastische Methanogenese bilden. Für *Desulfotomaculum thermocisternum* ist beispielsweise beschrieben, dass er in

Abwesenheit eines Elektronenakzeptors (z. B. Sulfat) mit einem hydrogenotrophen Archaeon Propionsäure abbauen konnte. Auf der anderen Seite können sie allerdings auch bei ausreichendem Sulfatgehalt mit hydrogenotrophen Methanogenen um Wasserstoff konkurrieren, welcher für die Sulfatreduktion benötigt wird (Dar *et al.*, 2008; Plugge *et al.*, 2011).

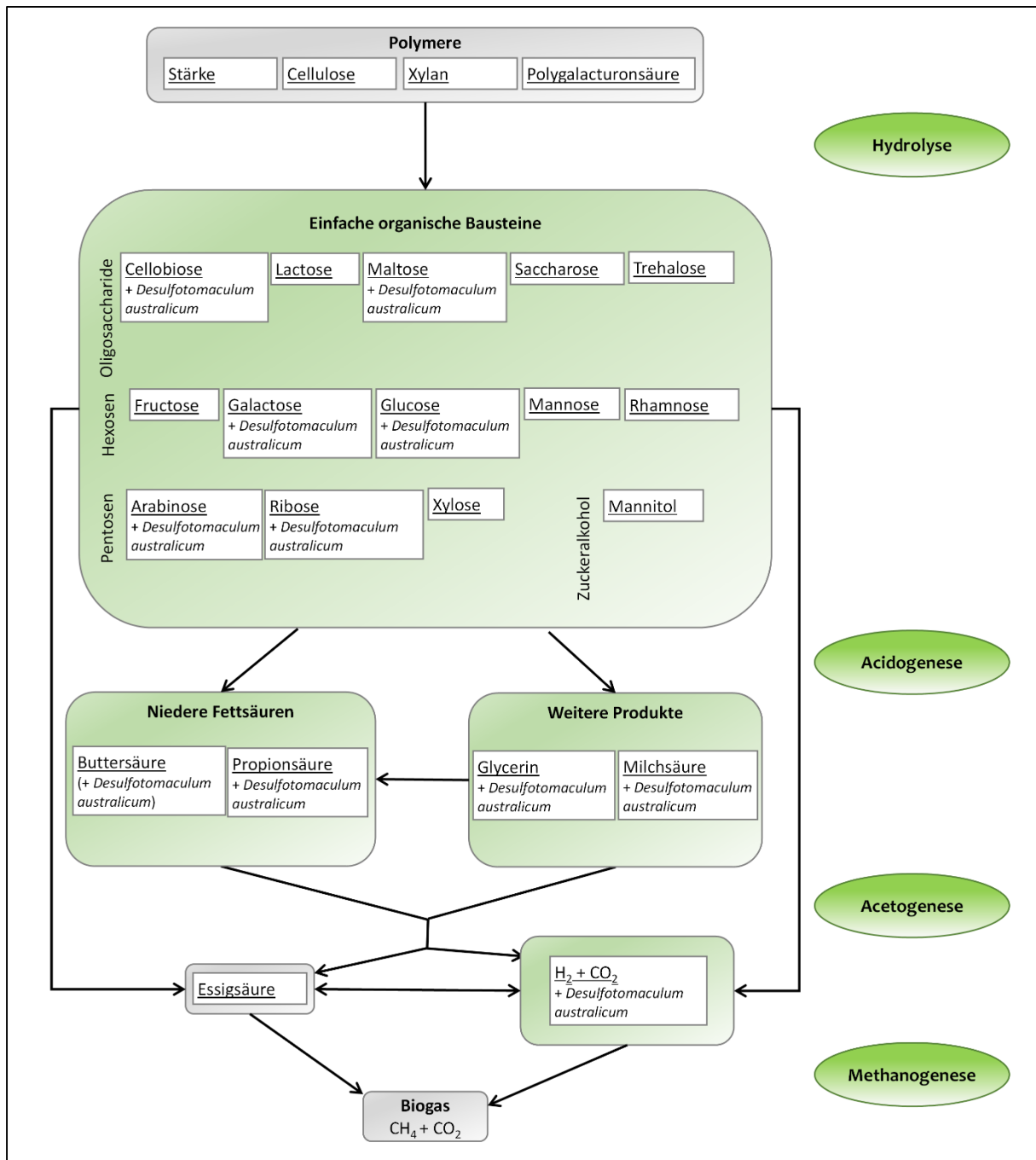


Abbildung 4.5: Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 5: Verwertung von Säuren und H_2/CO_2 .

4.4 *Defluviitoga tunisiensis*: ein Schlüsselbakterium im anaeroben Abbau?

Defluviitoga tunisiensis gehört der Familie der Petrotogaceae im Phylum der Thermotogae an und ist die bisher einzig beschriebene Art dieser Gattung. Die Familie der Petrotogaceae beinhaltet neben der Gattung *Defluviitoga* des Weiteren die Gattungen *Petrotoga*, *Geotoga*, *Oceanotoga* und *Marinitoga*. Die Mitglieder dieser Familien entstammen hauptsächlich aus Ölreservoirs oder hydrothermalen Quellen in der Tiefsee (Bhandari und Gupta, 2014). Dagegen wurde *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1 von Ben Hania *et al.* (2012) aus einem Molkefermenter in Tunesien isoliert. In dieser Arbeit wurden erstmals Isolate von *Defluviitoga tunisiensis* aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen gewonnen. Berichte über weitere Isolate existieren bisher nicht. *Defluviitoga tunisiensis* scheint in Biogasanlagen eine wichtige Rolle während des anaeroben Abbaus einzunehmen. Bei den durchgeführten Isolierungen aus Biogasanlagen konnten insgesamt zehn Isolate aus der mesophilen Biogasanlage Wagner (ein Isolat) und der thermophilen Biogasanlage (neun Isolate) Butschen isoliert werden. Die Isolierung aus drei verschiedenen Anreicherungskulturen (mit den Kohlenstoffquellen Laktat, Succinat oder der Aminosäuremischung) waren erste Hinweise für die hohe Abundanz und das breite Substratspektrum von *Defluviitoga tunisiensis*. Mit Hilfe des entwickelten spezifischen Primerpaares L3fw/rev konnte *Defluviitoga tunisiensis* in diesen beiden Anlagen mit 10^7 bis 10^8 Kopien der 16S rDNA detektiert werden. Auch in den beiden anderen mesophilen Biogasanlagen Gebel und Glahn wurde das Bakterium mit 10^4 bzw. 10^6 Kopien nachgewiesen. Hohe Abundanzen konnten ebenso in thermophilen Laborfermentern festgestellt werden, welche als Inputstoffe Hundefutter, lignocellulosereiches Substrat bzw. industriellen Bioethanolabfall beinhalteten (Sasaki *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Lebuhn *et al.*, 2014; Röske *et al.*, 2014). Aufgrund der hohen Abundanzen in anaeroben Fermentern wurde das Genom von Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit sequenziert und annotiert, um die Rolle dieses Isolates im anaeroben Abbau besser verstehen zu können.

Die große Bedeutung von *Defluviitoga tunisiensis* könnte mit dem breiten Substratspektrum zusammenhängen. Bereits die Versuche zur Substratverwertung zeigten, dass Isolat L3 in der Lage ist, Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide in Minimalmedien zu verwerten. Durch die Genomsequenzierung und manuelle Genomannotation konnten Gene vorausgesagt werden, welche am Kohlenhydrat-Metabolismus beteiligt sein könnten (Abbildung 3.9; Tabelle 3.5). Durch die Genomannotation kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob bzw. unter welchen Bedingungen diese Gene expremiert werden. Für eine Vielzahl von Kohlenhydraten konnte die Verwertung experimentell mit Isolat *Defluviitoga tunisi-*

ensis L3 bestätigt werden: Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerin, Laktose, Maltose, Milchsäure, Rhamnose, Ribose, Stärke, Trehalose und Xylose. Ben Hania *et al.* (2012) konnten in Versuchen mit Isolat *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1^T ferner die Verwertung von Xylan, Carboxymethylcellulose, Mannose, Raffinose und Saccharose feststellen. Somit konnten durch experimentelle Versuche bis auf Chitin, Glycogen, Pullulan, Lichenin, Galactan, Mannosiden, Arabinosiden, Stachyose und Melibiose alle vorhergesagten Kohlenhydrate bestätigt werden, deren Abbauwege im Genom von Isolat L3 rekonstruiert werden konnten. In weiteren Versuchen müsste die Verwertung der fehlenden Kohlenhydrate noch überprüft werden. Bei den experimentellen Versuchen konnte ein leichter Abbau an Rhamnose festgestellt werden. Im Genom konnte allerdings nur ein Gen, kodierend für die Rhamulokinase, identifiziert werden.

In landwirtschaftlichen Biogasanlagen ist durch Pflanzenbestandteile und das Substrat Maissilage mit hohen Anteilen an Polymeren wie Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Stärke zu rechnen. Das breite Substratspektrum im Zuckerabbau von Isolat L3 könnte somit ein Grund sein, weshalb es in großen Zellzahlen in Biogasanlagen detektiert werden konnte. Mit Hilfe der Genomannotation konnten als mögliche Endprodukte des Abbaus von Kohlenhydraten Ethanol, Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid gefunden werden. Experimentell konnte die Bildung von Essigsäure in Nährmedien der *Defluviitoga tunisiensis*-Isolate als Endprodukt mittels HPLC gemessen werden. Mit der Bildung von Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid kann somit *Defluviitoga tunisiensis* aus vielen Kohlenhydraten wichtige Substrate für die hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese bilden. Als beteiligte Enzyme konnten eine Acetatkinase, eine Hydrogenase sowie eine Pyruvatferredoxin-Oxidoreduktase für die Bildung dieser drei Produkte im Genom annotiert werden (Tabelle 3.5).

Weiterhin konnte im Genom von *Defluviitoga tunisiensis* L3 ein unvollständiger Methylmalonyl-CoA-Weg rekonstruiert werden. Bis auf das Enzym CoA-Transferase, welches den letzten Schritt der Bildung von Propionsäure aus Propionyl-CoA katalysiert, und die Enzyme Malat-Dehydrogenase, Fumarase und Fumarat-Reduktase (vgl. Abbildung 1.4a, Abschnitt 1.5) konnten alle Enzyme des Methylmalonyl-CoA-Weges annotiert werden. Propionyl-CoA könnte durch eine Phosphat-Propionyltransferase PduL und eine Acetat/Propionat-Kinase TdcD zur Bildung von Propionsäure führen. Experimentell konnte keine Bildung von Propionsäure mittels HPLC in Kulturen von *Defluviitoga tunisiensis* gemessen werden. In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, welche Rolle *Defluviitoga tunisiensis* im Propionsäure-Metabolismus einnimmt. Die Ergebnisse der Genomannotation deuten auf eine potentielle

Bildung von Propionsäure hin. Allerdings konnte in den Substratverwertungsversuchen ein minimaler Abbau von Propionsäure festgestellt werden. In zwei mesophilen, Propionsäureverwertenden Konsortien konnte Ahlert (2015) *Defluviitoga tunisiensis* molekularbiologisch detektieren. *Defluviitoga tunisiensis* wurde zwar nicht als Propionat-verwertende Schlüsselpezies in dieser Studie identifiziert, war aber in zwei propionatverwertenden Konsortien, welche über mehrere Jahre stabil Propionsäure abbauen konnten, Bestandteil des Hauptclusters (Ahlert, 2015). Ob *Defluviitoga tunisiensis* möglicherweise am Abbau von Propionsäure beteiligt ist oder ob es nur als „Begleitorganismus“ mitgewachsen ist, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass *Defluviitoga tunisiensis* eine hüllenartige Togastruktur aufwies, wie sie auch für *Thermotoga maritima* beschrieben wurde. Eine solche Struktur vergrößert die Oberfläche und erleichtert die Nährstoffaufnahme (Huber *et al.*, 1986; Jiang *et al.*, 2006). Möglicherweise könnte die beobachtete Togastruktur für *Defluviitoga tunisiensis* vorteilhaft in Biogasanlagen sein.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten 49 Säure-bildende Bakterien aus vier landschaftlichen Biogasanlagen und zwei Hochdruck-Biogas-Laborfermentern isoliert werden, in welchen keine Prozessstörungen vorlagen. Diese Isolate zeigten die Fähigkeit, aus Hydrolyseprodukten oder primären Gärprodukten Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure zu bilden. In weiterführenden Untersuchungen müsste nun geklärt werden, welche Rolle die gewonnenen Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Isolate in Fermentern mit Prozessstörungen (z. B. eine Übersäuerung) spielen. Hierzu könnte genomische DNA solcher Fermenter isoliert werden und in PCR- oder qPCR-Reaktionen mit den in dieser Arbeit entwickelten Isolat-spezifischen Primerpaaren auf das Vorkommen der erhaltenen Isolate hin untersucht werden. Eine andere Möglichkeit wäre ein Abgleich der erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen mit Metagenomdatensätzen (z. B. erhalten durch Genomsequenzierung).

Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, mit Hilfe welcher Stoffwechselwege die Isolate Propionsäure oder Buttersäure bilden. Hierfür müssten die Genome der Isolate wie im Fall von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3 sequenziert und analysiert werden. Eine andere Alternative wäre die Entwicklung von degenerierten Primerpaaren für spezielle Enzyme der Propionsäure- und Buttersäure-Stoffwechselwege. Hierfür könnte beispielsweise das Programm

CODEHOPE (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) zum Design der Primer verwendet werden (Rose *et al.*, 2003). Als geeignete Gene würden sich die Enzyme Butyrat-Kinase, Methylmalonyl-CoA-Mutase oder Acrylyl-CoA-Reduktase anbieten.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch Substratverwertungsversuche und die Annotation des Genoms von Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 Einblicke in den Kohlenhydratmetabolismus gegeben werden. In weiteren Versuchen müsste nun untersucht werden, weshalb diese Art eine so hohe Abundanz in mesophilen und thermophilen Biogasanlagen aufweist und welche Rolle sie im Propionsäure-Metabolismus spielt. Weiterhin konnte durch die Genomannotation gezeigt werden, dass *Defluviitoga tunisiensis* potentiell aus Polysacchariden, Oligosacchariden und Monosacchariden Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff bilden könnte, bei denen es sich um Substrate der Methanogenese handelt. In Wachstumsversuchen könnte weiterführend untersucht werden, ob *Defluviitoga tunisiensis* mit methanogenen Archaeen aus Polymeren, wie z. B. Stärke, Methan bilden kann. Da *Defluviitoga tunisiensis* sein Temperaturoptimum im thermophilen Bereich hat (ca. 54 °C), könnten hierbei Versuche mit thermophilen Methanogenen durchgeführt werden. Hierfür würden sich die Organismen *Methanosarcina thermophila* oder *Methanothermobacter marburgensis* anbieten. Darüber hinaus könnten für eine Prozessoptimierung der Biogasbildung Starterkulturen entwickelt werden. Hierbei wären Starterkulturen bestehend aus *Defluviitoga tunisiensis* und einem methanogenen Archaeon denkbar. Möglicherweise könnte auch eine Starterkulturmischung, in welcher Isolate aus den vier verschiedenen Abbaustufen enthalten sind, entwickelt und eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Essigsäure-, Propionsäure und Buttersäure-bildende Bakterien aus einer thermophilen und drei mesophilen Biogasanlagen sowie aus zwei Hochdruck-Biogas-Laborfermentern isoliert. Die Fermenter waren mit dem nachwachsenden Rohstoff Maissilage, teilweise mit Rinder- oder Schweinegülle und weiteren festen Inputstoffen gefüttert. Für die Isolierung von Säure-bildenden Bakterien wurde ein Mineralsalzmedium verwendet, welchem als Kohlenstoffquelle Na^+ -DL-Laktat, Succinat, Ethanol, Glycerin, Glucose oder eine Aminosäuremischung (Alanin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Methionin und Cystein) hinzugefügt wurde. Hierbei handelt es sich um Substrate, welche beim anaeroben Abbau während der Hydrolyse oder der primären Gärung entstehen können. Die erhaltenen Isolate waren in der Lage, aus diesen Substraten Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure zu bilden. Insgesamt wurden aus den beprobten Anlagen 49 Isolate gewonnen, welche zu den Phyla Firmicutes, Tenericutes oder Thermotogae gehörten. Mit Hilfe von 16S rDNA-Sequenzen konnten die meisten Isolate als *Clostridium sporosphaeroides*, *Defluviitoga tunisiensis* und *Dendrosporobacter* sp. identifiziert werden. Die Bildung von Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure wurde in Kulturen von Isolaten festgestellt, welche als folgende Arten identifiziert wurden: *Bacillus thermoamylovorans*, *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium cochlearium/Clostridium tetani*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Dendrosporobacter* sp., *Proteiniborus* sp., *Selenomonas bovis* und *Tepidanaerobacter* sp. Zwei Isolate, verwandt mit *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, konnten Buttersäure und Milchsäure bilden. In Kulturen von *Defluviitoga tunisiensis* wurde Essigsäurebildung festgestellt. Ein Vergleich der 16S rDNA-Sequenzen mit Datenbanken und die Ergebnisse der PCR-Amplifikationen mit Isolat-spezifischen Primerpaaren ergaben zusätzlich Hinweise, dass es sich bei einigen Isolaten um neue Arten handeln könnte (z. B. Stamm *Tepidanaerobacter* sp. AS34, Stamm *Proteiniborus* sp. ASG1.4, Stamm *Dendrosporobacter* sp. LG2.4, Stamm *Desulfotomaculum* sp. EG2.4, Stamm *Gallicola* sp. SG1.4B und Stamm *Acholeplasma* sp. ASSH51).

Durch die Entwicklung Isolat-spezifischer Primerpaare, abgeleitet von 16S rDNA-Sequenzen der Isolate oder Referenzstämmen, konnten die Isolate in Biogasanlagen detektiert und mittels qPCR quantifiziert werden (hauptsächlich im Bereich zwischen 10^3 bis 10^8 Kopien der 16S rDNA/g BGA-Probe). Weiterhin konnten die Isolate mit Hilfe physiologischer Versuche charakterisiert und deren Rolle in der anaeroben Abbaukette diskutiert werden.

Die Art *Defluviitoga tunisiensis* scheint eine große Bedeutung in Biogasanlagen zu spielen. *Defluviitoga tunisiensis* wurde am häufigsten in Untersuchungen im Rahmen der vorliegen-

den Arbeit isoliert und konnte auch mit Hilfe des entwickelten Primerpaares in hohen Abundanzen in den beprobten Biogasanlagen detektiert werden (10^4 - 10^8 Kopien der 16S rDNA/g BGA-Probe). Die manuelle Annotation des Gesamtgenoms sowie die Substratverwertungsversuche haben gezeigt, dass *Defluviitoga tunisiensis* ein sehr breites Substratspektrum in der Verwertung von Kohlenhydraten besitzt und dadurch möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Verwertung von Biomasse in Biogasanlagen einnimmt.

Mit Hilfe der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten somit neue Einblicke in die zweite Stufe des anaeroben Abbaus, die Acidogenese, in Biogasanlagen gegeben werden.

Abstract

In the present work, acetic, propionic and butyric acid forming bacteria were isolated from a thermophilic and three mesophilic biogas plants as well as two pressurized laboratory biogas fermenters. The fermenters were fed with maize silage and partially with cattle or swine manure and additional solid ingredients. A minimal medium supplemented with one of the following carbon source was used for isolation of acid-forming bacteria: Na⁺-DL-lactate, succinate, ethanol, glycerol, glucose or a mixture of amino acids (alanine, serine, threonine, glutamic acid, methionine and cysteine). These substrates are formed during hydrolysis or primary fermentation during anaerobic digestion. The obtained isolates were capable to form acetic, propionic or butyric acid by conversion of these substrates. In total, 49 strains were isolated, which belonged to the phyla Firmicutes, Tenericutes or Thermotogae. According to 16S rRNA gene sequences analyses, most isolates were affiliated to *Clostridium sporosphaeroides*, *Defluviitoga tunisiensis* and *Dendrosporobacter* sp. Production of acetic, propionic or butyric acid were observed in cultures of isolates related to *Bacillus thermoamylovorans*, *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium cochlearium*/*Clostridium tetani*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Dendrosporobacter* sp., *Proteiniborus* sp., *Selenomonas bovis* und *Tepidanaerobacter* sp. Two isolates related to *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* formed butyric and lactic acid. In cultures of *Defluviitoga tunisiensis*, production of acetic acid was measured. Furthermore, comparison of 16S rDNA sequences with databases and the results of PCR amplificates with isolate-specific primer sets suggested, that several isolates could be new species (e.g. strain *Tepidanaerobacter* sp. AS34, strain *Proteiniborus* sp. ASG1.4, strain *Dendrosporobacter* sp. LG2.4, strain *Desulfotomaculum* sp. EG2.4, strain *Gallicola* sp. SG1.4B and strain *Acholeplasma* sp. ASSH51).

By application of designed isolate-specific primer sets, derived from 16S rDNA sequences of isolates or reference strains, isolates could be detected in biogas plants and quantified by using qPCR (mainly in the range between 10^3 and 10^8 copies of 16S rDNA per g BGP sample). Furthermore, isolates were physiologically characterized and their role during anaerobic digestion discussed.

Defluviitoga tunisiensis seemed to be important in biogas plants. In present work, it was isolated most often and was detected in high abundances in biogas plants sampled using specific primer sets (10^4 to 10^8 copies of 16S rDNA per g BGP sample). The substrate utilisation and the annotation of the whole genome of strain *Defluviitoga tunisiensis* L3 exhibited the capability of using a broad substrate spectrum of carbohydrates. Possibly, this is a reason for its proposed significant role of *Defluviitoga tunisiensis* during conversion of biomass in biogas plants.

The obtained data of the present study provide novel insights into acidogenesis and microbial degradation of biomass in biogas plants.

6. Literatur

- Ahlert S (2015) Propionsäureabbau in NawaRo-Biogasanlagen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Ahring BK, Sandberg M, Angelidaki I (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:559-565
- ALB. Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e.V. (2010) Prozessmodell Biogas. [https://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/ Prozessmodell_Biogas.pdf](https://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf) (Stand: 09.10.2015)
- Allen SHG, Linehan BA (1977). Presence of transcarboxylase in *Arachnia propionica*. *Int. J. Systb. Bacteriol* 27:291-292
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Anand AA, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DI, Vasam PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vendan SE (2009) Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci* 10:1-20
- Arrigo Y, Stoll P (2012) Schätzung des Nährwerts von Maissilage. *Agrarforschung Schweiz* 3:442-449
- Bairoch A (2000) The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28:304-305
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541-55
- Balk M, Altinbaş M, Rijkstra WI, Sinnighe Damsté JS, Stams AJ (2008) *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:110-115
- Barbirato F, Chedaille D, Bories A (1997) Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:441-446
- Bauer C, Lebuhn M, Gronauer A (2009) Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe. LfL (ed.) Freising-Weihenstephan. Direkt Marketing & Digitaldruck, Hallbergmoos
- Bayer. Landesamt für Umwelt (2007) Biogashandbuch Bayern - Materialienband, Kapitel 1. Grundlagen und Technik, Stand 2007. Augsburg. <http://www.lfu.bayern.de/energie/biogas-handbuch/doc/kap1bis15.pdf> (Stand: 06.10.2015)
- Belostotskiy DE, Ziganshina EE, Siniagina M, Boulygina EA, Miluykov VA, Ziganshin AM (2015) Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes. *Bioresour Technol* 193:42-52

- Ben Hania W, Godbane R, Postec A, Hamdi M, Ollivier B, Fardeau ML (2012) *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1377-1382
- Bhandari V, Gupta RS (2014) Molecular signatures for the phylum (class) Thermotogae and a proposal for its division into three orders (Thermotogales, Kosmotogales ord. nov. and Petrotogales ord. nov.) containing four families (Thermotogaceae, Fervidobacteriaceae fam. nov., Kosmotogaceae fam. nov. and Petrotogaceae fam. nov.) and a new genus *Pseudothermotoga* gen. nov. with five new combinations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:143-168
- BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (2015a) Erneuerbare Energien. <http://www.bmwi.de/DE/Themen/Energie/erneuerbare-energien.html> (Stand: 05.09.2015)
- BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (2015b) Bruttostromerzeugung in Deutschland 2014 in TWh. <http://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/B/bruttostromerzeugung-in-deutschland,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf> (Stand: 17.10.2015)
- BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (2015c) Entwicklung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien in Deutschland. <http://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/I/infografik-entwicklung-strombereitstellung-erneuerbare-energien-deutschland,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf> (Stand: 17.10.2015)
- Borrel G, O'Toole PW, Harris HM, Peyret P, Brugère JF, Gribaldo S (2013) Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol.* 5:1769-1780
- Braun R (2007) Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In: *Improvement of Crop Plants for Industrial end Uses*. 1. Auflage, Springer Netherlands, Dordrecht, Niederlande
- Braun M, Mayer F, Gottschalk G (1981) *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch Microbiol.* 128:288-293
- Buckel W (2001) Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:263-273
- Buckel W, Barker HA (1974) Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol* 117:1248-1260
- Caspi R, Altman T, Billington R, Dreher K, Foerster H, Fulcher CA, Holland TA, Keseler IM, Kothari A, Kubo A, Krummenacker M, Latendresse M, Mueller LA, Ong Q, Paley S, Subhraveti P, Weaver DS, Weerasinghe D, Zhang P, Karp PD (2014) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res* 42:D459-D471
- Cirne DG, Lehtomäki A, Björnsson L, Blackall LL (2007) Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *J Appl Microbiol* 103:516-527

- Claudel-Renard C, Chevalet C, Faraut T, Kahn D (2003) Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM. *Nucleic Acids Res* 31:6633-6639
- Collins G, Kavanagh S, McHugh S, Connaughton S, Kearney A, Rice O, Carrigg C, Scully C, Bhreathnach N, Mahony T, Madden P, Enright AM, O'flaherty V (2006) Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through polyphasic experiments. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41:897-922
- Combet-Blanc Y, Ollivier B, Streicher C, Patel BK, Dwivedi PP, Pot B, Prensier G, Garcia JL (1995) *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 45:9-16
- Connors SB, Mongodin EF, Johnson MR, Montero CI, Nelson KE, Kelly RM (2006) Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiol Rev* 30:872-905
- Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJ, Kuenen JG, Muyzer G (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:1045-1055
- Da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30-39
- Dehning I, Schink B (1989) *Malonomonas rubra* gen. nov. sp. nov., a microaerotolerant anaerobic bacterium growing by decarboxylation of malonate. *Arch Microbiol* 151:427-433
- Dehning I, Stieb M, Schink B (1989) *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Arch Microbiol* 151:421-426
- Dimroth P, Schink B (1998) Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch Microbiol* 170:69-77
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2007). Medium 287. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium287.pdf (Stand: 28.04.2013)
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2012a). Medium 141. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf (Stand: 28.04.2013)
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2012b). Medium 1328. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1328.pdf. (Stand: 08.11.2013)
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2014). Medium 104b: PY + X. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104b.pdf (Stand: 21.05.2014)
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2004) Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 70:5810-5817

- Eram MS, Wong A, Oduaran E, Ma K (2015) Molecular and biochemical characterization of bifunctional pyruvate decarboxylases and pyruvate ferredoxin oxidoreductases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga hypogea*. J Biochem (doi:10.1093/jb/mvv058)
- Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S (2001) Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 51:1521-1528
- Fachverband Biogas (2015) Branchenzahlenprognose für die Jahre 2014 und 2015. [http://www.biogas.org/edcom/webfyb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/\\$file/14-11-25_Biogas%20Branchenzahlen_Prognose_2014-2015.pdf](http://www.biogas.org/edcom/webfyb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/$file/14-11-25_Biogas%20Branchenzahlen_Prognose_2014-2015.pdf) (06.10.2015)
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M (2014) Pfam: the protein families database. Nucleic Acids Res 42:D222-D230
- Fonknechten N, Chaussonnerie S, Tricot S, Lajus A, Andreesen JR, Perchat N, Pelletier E, Gouyvenoux M, Barbe V, Salanoubat M, Le Paslier D, Weissenbach J, Cohen GN, Kreimeyer A (2010) *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. BMC Genomics 11:1-12
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol 42:166-170
- Frock AD, Gray SR, Kelly RM (2012) Hyperthermophilic *Thermotoga* species differ with respect to specific carbohydrate transporters and glycoside hydrolases. Appl Environ Microbiol 8:1978-1986
- Fuchs G (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Godornes C, Leader BT, Molini BJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA (2007) Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. Cytokine 38:1-7
- Gottschalk G (1979) Bacterial Metabolism, 1. Auflage, Springer-Verlag, New York
- Guangsheng C, Plugge CM, Roelofsen W, Houwen FP, Stams, AJM (1992) *Selenomonas acidaminovorans* sp. nov., a versatile thermophilic proton-reducing anaerobe able to grow by decarboxylation of succinate to propionate. Arch Microbiol 157:169-175
- Guo X, Wang C, Sun F, Zhu W, Wu W (2014) A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. Bioresour Technol. 152:420-428
- Hahnke S, Striesow J, Elvert M, Mollar XP, Klocke M (2014) *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. Int J Syst Evol Microbiol 64:2792-2797

- Hernandez-Eugenio G, Fardeau ML, Cayol JL, Patel BK, Thomas P, Macarie H, Garcia JL, Ollivier B (2002) *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1217-1223
- Hetzel M, Brock M, Selmer T, Pierik AJ, Golding BT, Buckel W (2003) Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Eur J Biochem* 270:902-910
- Hofmeister AE, Grabowski R, Linder D, Buckel W (1993) L-serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. *Eur J Biochem* 215:341-349
- Hoster F, Daniel R, Gottschalk G (2001) Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. *J Gen Appl Microbiol* 47:187-192
- Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144:324-333
- Janssen PH, Liesack W (1995) Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. *Arch Microbiol* 164:29-35
- Jiang Y, Zhou Q, Wu K, Li XQ, Shao WL (2006) A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol Lett* 259:254-259
- Kaiser F, Metzner T, Effenberger M, Gronauer A (2008) Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe. LfL (ed.) Freising-Weißenstephan. Lerchl-Druck, Freising.
- Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224
- Kim MD, Song M, Jo M, Shin SG, Khim JH, Hwang S (2010) Growth condition and bacterial community for maximum hydrolysis of suspended organic materials in anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1611-1618
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716-721
- Klocke M, Mähnert P, Mundt K, Souidi K, Linke B (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Syst Appl Microbiol* 30:139-51
- Koeck DE, Wibberg D, Maus I, Winkler A, Albersmeier A, Zverlov VV, Pühler A, Schwarz WH, Liebl W, Schlüter A (2014a) First draft genome sequence of the amylolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol* 192:154-155

- Koeck DE, Zverlov VV, Liebl W, Schwarz WH (2014b) Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Syst Appl Microbiol* 37:311-319
- Krause L, Diaz NN, Edwards RA, Gartemann KH, Krömeke H, Neuweger H, Pühler A, Runte KJ, Schlüter A, Stoye J, Szczepanowski R, Tauch A, Goesmann A (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol* 136:91-101
- Kröber M, Bekel T, Diaz NN, Goesmann A, Jaenicke S, Krause L, Miller D, Runte KJ, Viehöver P, Pühler A, Schlüter A (2009) Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Bacteriol* 142:38-49
- Lebuhn M, Hanreich A, Klocke M, Schlüter A, Bauer C, Pérez CM (2014) Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe* 29:10-21
- Li SL, Whang LM, Chao YC, Wang YH, Wang YF, Hsiao CJ, Tseng IC, Bai MD, Cheng SS (2010) Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *Int J Hydrogen Energ* 35:61-70
- Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 1125:171-189
- Liu Y, Yu P, Song X, Qu Y (2008) Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *Int J Hydrogen Energ* 33:2927-2933
- Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ (2004) Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* 186:2099-2106
- Louis P, McCrae SI, Charrier C, Flint HJ (2007) Organization of butyrate synthetic genes in human colonic bacteria: phylogenetic conservation and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Lett* 269:240-247
- Luo G, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I (2011) Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresour Technol* 102:8700-8706
- Macy JM, Ljungdahl LG, Gottschalk G (1978) Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 134:84-91
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001) *Brock Mikrobiologie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Maus I, Wibberg D, Stantscheff R, Cibis K, Eikmeyer FG, König H, Pühler A, Schlüter A (2013) Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *J Biotechnol* 168:734-736

- Maus I, Cibis KG, Wibberg D, Winkler A, Stolze Y, König H, Pühler A, Schlüter A (2015) Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J Biotechnol* 3:17-18
- Maspolim Y, Zhou Y, Guo C, Xiao K, Ng WJ (2015) The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. *Bioresour Technol* 190:289-298
- May T, Koch-Singenstreu M, Ebling J, Stantscheff R, Müller L, Jakobi F, Polag D, Keppler F, König H (2015) Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analyses of microbial communities in anaerobic biogas digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6855-6863
- Mechichi T, Fardeau ML, Labat M, Garcia JL, Verhé F, Patel BK (2000) *Clostridium peptidivorans* sp. nov., a peptide-fermenting bacterium from an olive mill wastewater treatment digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1259-1264
- Merlin Christy P, Gopinath LR, Divya D (2014) A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev* 34:167-173
- Merlino G, Rizzi A, Schievano A, Tenca A, Scaglia B, Oberti R, Adani F, Daffonchio D (2013) Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Res* 47:1983-1995
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A (2003) GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 31:2187-2195
- Nettmann E, Bergmann I, Mundt K, Linke B, Klocke M (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol* 105:1835-1850
- Nilsen RK, Torsvik T, Lien T (1996) *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a Sulfate reducer isolated from a hot north sea oil reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol* 46:397-402
- Nielsen HB, Uellendahl H, Ahring BK (2007) Regulation and optimization of the biogas process: propionate as a key parameter. *Biomass Bioenerg* 31:820-830
- Niu L, Song L, Dong X (2008) *Proteiniborus ethanoligenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic protein-utilizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:12-16
- Niu L, Song L, Liu X, Dong X (2009) *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2698-2701
- Ohnishi A, Bando Y, Fujimoto N, Suzuki M (2010) Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *Int J Hydrogen Energy* 35:8544-8553

- O-Thong S, Prasertsan P, Karakasheva D, Angelidaki I (2008) Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy* 33:1204-1214
- Parshina SN, Kleerebezem R, Sanz JL, Lettinga G, Nozhevnikova AN, Kostrikina NA, Ly-senko AM, Stams JM (2003) *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1791-1799
- Paynter MJB, Elsdon SR (1970) Mechanism of propionate formation by *Selenomonas ruminantium*, a rumen microorganism. *J Gen Microbiol* 61:1-7
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* 5:53-63
- Pfannebecker J (2008) Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Pfannebecker J, Fröhlich J (2008) Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int J Food Microbiol* 128:288-296
- Pine L, George LK (1969) Reclassification of *Actinomyces propionicus*. *Int. J. Systb. Bacteriol* 19:267-272
- Plugge CM, Zhang W, Scholten JC, Stams AJ (2011) Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol* 2:1-8
- Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ (2002) The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 217:133-139
- Refai S, Wassmann K, Deppenmeier U (2014) Short-term effect of acetate and ethanol on methane formation in biogas sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7271-7280
- Rismani-Yazdi H, Carver SM, Christy AD, Yu Z, Bibby K, Peccia J, Tuovinen OH (2013) Suppression of methanogenesis in cellulose-fed microbial fuel cells in relation to performance, metabolite formation, and microbial population. *Bioresour Technol* 129:281-288
- Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S (2003) CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 31:3763-3766
- Röske I, Sabra W, Nacke H, Daniel R, Zeng AP, Antranikian G, Sahm K (2014) Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9095-9106
- Rossi DM, da Costa JB, de Souza EA, Peralba MCR, Ayub MAZ (2012) Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renew Energ* 39:223-227
- Rost B (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 12:85-94

- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425
- Saripan AF, Reungsang A (2013) Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate. *Electron J Biotechnol* (<http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue1-fulltext-1>)
- Sasaki D, Sasaki K, Watanabe A, Morita M, Igarashi Y, Ohmura N (2013) Efficient production of methane from artificial garbage waste by a cylindrical bioelectrochemical reactor containing carbon fiber textiles. *AMB Express* 3, 1-9
- Scheifinger CC, Wolin MJ, (1973) Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol* 26:789-795
- Schink B (1984) Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C2 compounds. *Arch Microbiol* 137:33-41
- Schink B (1989) Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Gewässersedimenten. *Naturwissenschaften* 76:364-372
- Schink B, Pfennig N (1982) *Propionigenium modestum* gen. nov. sp. nov. a new strictly anaerobic, nonsporulating bacterium growing on succinate. *Arch Microbiol* 133:209-216
- Schink B, Thompson TE, Zeikus JG (1982) Characterization of *Propionispira arboris* gen. nov. sp. nov., a nitrogen-fixing anaerobe common to wetwoods of living trees. *J Gen Microbiol* 128:2771-2779
- Schink B, Kremer DR, Hansen TA (1987) Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. *Arch Microbiol* 147:321-327
- Schlüter A, Bekel T, Diaz NN, Dondrup M, Eichenlaub R, Gartemann KH, Krahn I, Krause L, Krömeke H, Kruse O, Mussgnug JH, Neuweiger H, Niehaus K, Pühler A, Runte KJ, 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. *J Biotechnol* 136:77-90
- Schweiger G, Buckel W (1984) On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Lett* 171:79-84
- Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li F, Hagemeyer C, Thauer RK, Gottschalk G (2008) The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:2128-2133
- Seeliger S, Janssen PH, Schink B (2002) Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol. Lett* 211:65-70

- Sekiguchi Y, Imachi H, Susilorukmi A, Muramatsu M, Ohashi A, Harada H, Hanada S, Kamagata Y (2006) *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1621-1629
- Song H, Lee SY (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Tech* 39:352–361
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849
- Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Päuker O, Hippe H (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:1134-1139
- Stams AJM, Kremer DR, Nicolay K, Weenk GH, Hansen TA (1984) Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol* 139:167-173
- 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*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5719-5735
- Strömpl C, Tindall BJ, Lünsdorf H, Wong TY, Moore ER, Hippe H (2000) Reclassification of *Clostridium quercicolum* as *Dendrosporobacter quercicolus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:101-106
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11030-11035
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729
- Theuerl S, Kohrs F, Benndorf D, Maus I, Wibberg D, Schlüter A, Kausmann R, Heiermann M, Rapp E, Reichl U, Pühler A, Klocke M (2015) Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7791-803
- Tholozan JL, Touzel JP, Samain E, Grivet JP, Prensier G, Albagnac G (1992) *Clostridium neopropionicum* sp. nov., a strict anaerobic bacterium fermenting ethanol to propionate through acrylate pathway. *Arch Microbiol* 157:249-257
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Volume Three -The Firmicutes*, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Wagner AO, Lins P, Malin C, Reitschuler C, Illmer P (2013) Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Sci Total Environ* 458-460:256-66

- Wallrabenstein, C., Hauschild, E., and Schink, B. (1995) *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. Arch Microbiol 164:346-352
- Wassenberg D, Liebl W, Jaenicke R (2000) Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. J Mol Biol 295: 279-288
- Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 85:849-860
- Weiss A, Jérôme V, Freitag R, Mayer HK (2008) Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. Appl Microbiol Biotechnol 81:163-173
- Wendland M, Attenberger E (2009) Wirtschaftsdünger und Gewässerschutz, Lagerung und Ausbringung von Wirtschaftsdüngern in der Landwirtschaft. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe. LfL (ed.) Freising-Weihenstephan. Druckhaus Kastner, Wolnzach
- Westerholm M, Dolfing J, Sherry A, Gray ND, Head IM, Schnürer A (2011a) Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. Environ Microbiol Rep 3:500-505
- Westerholm M, Roos S, Schnürer A (2011b) *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. Syst Appl Microbiol 34:260-266
- Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnol Biofuels 5:41
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13:134
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol Bioeng 89:670-679
- Zhang K, Dong X (2009) *Selenomonas bovis* sp. nov., isolated from yak rumen contents. Int J Syst Evol Microbiol 59:2080-2083

7. Anhang

7.1 Substratverwertungsversuche

Tabelle 7.1: Substratverbrauch und Produktbildung [g/l] nach ca. 8 Wochen Inkubation von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3.

Woche	Arabinose		Buttersäure		Cellobiose		Fructose	
1 ¹	3,565	Arabinose	3,564	Buttersäure	0,523	Glucose	0,798	Glucose
					0,110	Fructose	2,267	Fructose
8 ²	0,228	Glucose	3,303	Buttersäure	2,079	Glucose	0,876	Glucose
	0,082	Fructose			0,924	Fructose	2,168	Fructose
	2,601	Arabinose			0,065	Milchsäure		
	0,054	Milchsäure						
8 ²	0,249	Glucose	3,274	Buttersäure	2,075	Glucose	0,883	Glucose
	0,088	Fructose			0,924	Fructose	2,138	Fructose
	2,546	Arabinose			0,066	Milchsäure		
	0,054	Milchsäure						
Woche	Galactose		Glucose		Glycerin		Lactose	
1 ¹	3,531	Galactose	2,511	Glucose	5,489	Glycerin	4,169	Lactose
			1,372	Fructose			0,401	Galactose
8 ²	3,232	Galactose	2,359	Glucose	5,244	Glycerin	2,625	Lactose
			1,508	Fructose			0,302	Glucose
			0,065	Milchsäure			1,535	Galactose
8 ²	3,226	Galactose	2,337	Glucose	5,210	Glycerin	2,821	Lactose
			1,507	Fructose			0,280	Glucose
			0,066	Milchsäure			0,138	Galactose
Woche	Maltose		Milchsäure		Propionsäure		Rhamnose	
1 ¹	3,200	Maltose	5,076	Milchsäure	5,547	Propionsäure	0,223	Fructose
	0,655	Glucose					3,890	Rhamnose
	0,167	Fructose						
8 ²	1,811	Maltose	4,853	Milchsäure	5,210	Propionsäure	0,209	Glucose
	1,432	Glucose					0,252	Fructose
	0,699	Fructose					3,559	Rhamnose
	0,067	Milchsäure						
8 ²	1,760	Maltose	4,858	Milchsäure	5,206	Propionsäure	0,215	Glucose
	1,475	Glucose					0,249	Fructose
	0,748	Fructose					3,574	Rhamnose
	0,080	Milchsäure						
Woche	Ribose		Stärke		Trehalose		Xylose	
1 ¹	2,840	Ribose	-	-	3,039	Trehalose	2,957	Xylose
							0,699	Fructose
8 ²	2,054	Ribose	1,835	Maltose	2,550	Trehalose	0,245	Glucose
			1,455	Glucose	0,717	Glucose	2,624	Xylose
			0,288	Fructose	0,156	Fructose	0,598	Fructose
							0,252	Milchsäure
8 ²	2,040	Ribose	1,876	Maltose	2,618	Trehalose	0,241	Glucose
			1,632	Glucose	0,660	Glucose	2,653	Xylose
			0,328	Fructose	0,146	Fructose	0,604	Fructose
			0,052	Milchsäure			0,248	Milchsäure
Woche	L-Arabinose							
1 ¹	2,888	Arabinose						
8 ²	2,666	Arabinose						
8 ²	2,697	Arabinose						

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

Tabelle 7.2: Substratverwertung und Produktbildung [g/l] L14 nach ca. 5 Wochen Inkubation von Isolat *Desulfotomaculum australicum* L14.

Woche	Arabinose		Buttersäure		Cellobiose		Galactose	
1 ¹	3,565	Arabinose	3,564	Buttersäure	0,523	Glucose	3,531	Galactose
					0,110	Fructose		
5 ²	3,132	Arabinose	0,151	Essigsäure	0,814	Glucose	3,153	Galactose
			3,320	Buttersäure	0,204	Fructose		
					0,437	Essigsäure		
5 ²	3,104	Arabinose	0,119	Essigsäure	0,805	Glucose	3,185	Galactose
			3,307	Buttersäure	0,197	Fructose		
					0,192	Essigsäure		
Woche	Glucose		Glycerin		H ₂ /CO ₂		Maltose	
1 ¹	2,511	Glucose	5,489	Glycerin	-	-	3,200	Maltose
	1,372	Fructose					0,655	Glucose
							0,167	Fructose
5 ²	2,304	Glucose	5,113	Glycerin	0,173	Essigsäure	2,782	Maltose
	1,249	Fructose	0,356	Essigsäure			0,785	Glucose
	0,336	Essigsäure					0,211	Fructose
5 ²	2,300	Glucose	5,136	Glycerin	0,478	Essigsäure	2,778	Maltose
	1,271	Fructose	0,366	Essigsäure			0,780	Glucose
	0,141	Essigsäure					0,198	Fructose
Woche	Milchsäure		Propionsäure		Ribose			
1 ¹	5,076	Milchsäure	5,547	Propionsäure	2,840	Ribose		
5 ²	3,428	Milchsäure	0,331	Essigsäure	0,043	Fructose		
	0,706	Essigsäure	5,113	Propionsäure	2,361	Ribose		
5 ²	3,805	Milchsäure	0,322	Essigsäure	0,046	Glucose		
	0,514	Essigsäure	5,083	Propionsäure	0,033	Fructose		
					2,419	Ribose		

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

Tabelle 7.3: Substratverwertung und Produktbildung [g/l] nach ca. 5 Wochen Inkubation von Isolat *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc4.

Woche	Arabinose		Cellobiose		Fructose		Galactose	
1 ¹	3,565	Arabinose	0,523	Glucose	0,798	Glucose	3,531	Galactose
			0,110	Fructose	2,267	Fructose		
5 ²	0,241	Essigsäure	2,008	Milchsäure	0,115	Fructose	0,671	Galactose
	0,521	Buttersäure	0,115	Essigsäure	0,140	Essigsäure	0,080	Fructose
			0,312	Buttersäure	0,578	Buttersäure	0,088	Milchsäure
							0,153	Essigsäure
5 ²	0,556	Milchsäure	2,106	Milchsäure	0,113	Fructose	0,670	Galactose
	0,174	Essigsäure	0,099	Essigsäure	0,327	Milchsäure	0,081	Fructose
	0,454	Buttersäure	0,290	Buttersäure	0,234	Essigsäure	0,241	Milchsäure
					0,343	Buttersäure	0,150	Essigsäure
							0,400	Buttersäure
Woche	Glucose		Lactose		Maltose		Mannitol	
1 ¹	2,511	Glucose	4,169	Lactose	3,200	Maltose	4,598	Mannitol
	1,372	Fructose	0,401	Galactose	0,655	Glucose		
5 ²	0,039	Fructose	0,060	Fructose	0,021	Fructose	1,310	Milchsäure
	1,716	Milchsäure	1,197	Milchsäure	0,453	Milchsäure	0,604	Ethanol
	0,161	Essigsäure	0,177	Essigsäure	0,440	Essigsäure		
	0,224	Buttersäure	0,523	Buttersäure	0,381	Buttersäure		
	0,456	Ethanol						
5 ²	0,041	Fructose	0,019	Fructose	0,021	Fructose	1,500	Milchsäure
	1,721	Milchsäure	0,804	Milchsäure	0,290	Milchsäure	0,635	Ethanol
	0,160	Essigsäure	0,183	Essigsäure	0,450	Essigsäure		
	0,248	Buttersäure	0,559	Buttersäure	0,418	Buttersäure		
	0,376	Ethanol						
Woche	Mannose		Ribose		Saccharose		Stärke	
1 ¹	0,348	Glucose	2,840	Ribose	2,716	Glucose	-	-
	3,393	Mannose			2,377	Fructose		
5 ²	0,017	Fructose	0,034	Glucose	0,272	Milchsäure	0,647	Milchsäure
	1,793	Milchsäure	0,696	Ribose	0,338	Essigsäure	0,137	Essigsäure
	0,171	Essigsäure	0,111	Essigsäure	0,934	Buttersäure		
	0,221	Buttersäure	0,447	Buttersäure	0,594	Ethanol		
5 ²	1,762	Milchsäure	0,034	Glucose	0,086	Fructose	0,774	Milchsäure
	0,182	Essigsäure	0,667	Ribose	1,641	Milchsäure	0,098	Essigsäure
	0,247	Buttersäure	0,163	Essigsäure	0,250	Essigsäure	0,453	Buttersäure
			0,402	Buttersäure	0,446	Buttersäure		
		0,392	Ethanol					
Woche	Trehalose		Xylose		L-Arabinose		Xylan	
1 ¹	3,039	Trehalose	2,957	Xylose	2,888	Arabinose	-	-
			0,699	Fructose				
5 ²	2,366	Milchsäure	0,096	Xylose	0,040	Succinat	0,056	Citrat
	0,136	Essigsäure	0,539	Milchsäure	0,190	Essigsäure	0,090	Glucose
			0,345	Essigsäure	0,591	Buttersäure	0,023	Fructose
			0,247	Buttersäure	1,306	Ethanol	0,297	Essigsäure
5 ²							0,308	Buttersäure
							0,469	Ethanol
	2,286	Milchsäure	0,128	Xylose	0,029	Succinat	0,028	Citrat
	0,147	Essigsäure	0,770	Milchsäure	0,154	Essigsäure	0,022	Fructose
			0,317	Essigsäure	0,629	Buttersäure	0,264	Essigsäure
			0,244	Buttersäure	1,371	Ethanol	0,372	Buttersäure
						0,446	Ethanol	

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

Tabelle 7.4: Substratverwertung und Produktbildung [g/l] nach ca. 5 Wochen Inkubation von Isolat *Gallicola* sp. SG1.4B.

Woche	Arabinose		Cellobiose		Galactose		Glucose	
1 ¹	3,565	Arabinose	0,523	Glucose	3,531	Galactose	2,511	Glucose
			0,110	Fructose			1,372	Fructose
5 ²	3,339	Arabinose	0,086	Fructose	2,868	Galactose	2,021	Glucose
	0,132	Essigsäure	0,416	Essigsäure	0,304	Essigsäure	1,485	Fructose
							0,257	Essigsäure
5 ²	3,371	Arabinose	0,074	Fructose	2,926	Fructose	1,935	Glucose
	0,124	Essigsäure	0,367	Essigsäure	0,268	Essigsäure	1,316	Fructose
							0,269	Essigsäure
Woche	Glycerin		H ₂ /CO ₂		Mannitol		Ribose	
1 ¹	5,489	Glycerin	-	-	4,598	Mannitol	2,840	Ribose
5 ²	4,998	Glycerin	0,228	Essigsäure	4,147	Mannitol	0,016	Fructose
	0,452	Essigsäure			0,530	Essigsäure	1,754	Ribose
							0,538	Essigsäure
5 ²	4,691	Glycerin	0,221	Essigsäure	4,395	Mannitol	0,021	Fructose
	0,640	Essigsäure			0,426	Essigsäure	1,801	Ribose
							0,482	Essigsäure
Woche	Trehalose							
1 ¹	3,039	Trehalose						
5 ²	2,352	Trehalose						
	0,017	Glucose						
	0,071	Glycerin						
	0,711	Essigsäure						
5 ²	2,255	Trehalose						
	0,042	Glucose						
	0,749	Essigsäure						

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

Tabelle 7.5: Substratverwertung und Produktbildung [g/l] nach ca. 5 Wochen Inkubation von Isolat *Selemonas bovis* GlyW3.4.

Woche	Arabinose		Cellobiose		Galactose		Glucose			
1 ¹	3,565	Arabinose	0,523	Glucose	3,531	Galactose	2,511	Glucose		
			0,110	Fructose			1,372	Fructose		
5 ²	0,710	Arabinose	0,826	Glucose	3,329	Galactose	0,052	Glucose		
		1,615	Succinat	0,175			Fructose	0,039	Fructose	
		0,149	Milchsäure					0,704	Succinat	
		0,355	Essigsäure					2,214	Milchsäure	
		0,254	Propionsäure					0,125	Essigsäure	
5 ²	0,014	Glucose	0,313	Succinat	3,386	Galactose	0,094	Glucose		
		0,491	Arabinose	0,208			Milchsäure	0,045	Fructose	
		1,689	Succinat	0,089			Essigsäure	0,666	Succinat	
		0,374	Essigsäure					2,195	Milchsäure	
		0,198	Propionsäure					0,125	Essigsäure	
Woche	Glycerin ³		Lactose		Maltose		Mannose			
1 ¹	5,489	Glycerin	4,169	Lactose	3,200	Maltose	0,348	Glucose		
			0,401	Galactose	0,655	Glucose	3,393	Mannose		
5 ²	1,316	Succinat	0,186	Glucose	0,031	Maltose	0,809	Succinat		
			3,681	Glycerin	2,448	Galactose	0,050	Glucose	2,366	Milchsäure
					0,422	Succinat	0,016	Fructose	0,161	Essigsäure
					0,768	Milchsäure	0,763	Succinat	0,152	Propionsäure
							2,186	Milchsäure		
5 ²	1,071	Succinat	0,066	Glucose	0,034	Maltose	0,819	Succinat		
			3,939	Glycerin	0,043	Fructose	0,042	Glucose	2,353	Milchsäure
					0,904	Succinat	0,016	Fructose	0,162	Essigsäure
					2,335	Milchsäure	0,760	Succinat	0,156	Propionsäure
					0,130	Essigsäure	2,185	Milchsäure		
		0,158	Propionsäure	0,135	Essigsäure					
Woche	Rhamnose		Ribose		Saccharose		Stärke			
1 ¹	0,223	Fructose	2,840	Ribose	2,716	Glucose	-	-		
		3,890			Rhamnose	2,377	Fructose			
5 ²	0,079	Glucose	0,012	Fructose	0,433	Glucose	1,450	Glucose		
		0,233	Fructose	1,321	Ribose	0,201	Fructose	0,547	Succinat	
		0,444	Rhamnose	0,412	Essigsäure	0,870	Succinat	0,839	Milchsäure	
		0,684	Succinat			3,099	Milchsäure	0,114	Essigsäure	
		0,027	Milchsäure			0,075	Essigsäure	0,134	Propionsäure	
		0,322	Glycerin							
		0,149	Essigsäure							
5 ²	0,170	Glucose	0,059	Fructose	0,280	Glucose	0,943	Glucose		
		0,324	Fructose	1,412	Ribose	0,106	Fructose	0,807	Succinat	
		0,631	Rhamnose	0,407	Essigsäure	0,914	Succinat	1,157	Milchsäure	
		0,746	Succinat			3,184	Milchsäure	0,137	Essigsäure	
		0,055	Milchsäure			0,098	Essigsäure	0,122	Propionsäure	
		0,338	Glycerin			0,136	Propionsäure			
		0,148	Essigsäure							
0,479	Propionsäure									

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

³ Bildung von Propionsäure aus Glycerin in einer anderen Kultur von GlyW3.4 (Angabe in [g/l]): Kontrolle: 5,510 Glycerin; Kultur von GlyW3.4: 3,173 Succinat, 0,081 Milchsäure, 3,168 Glycerin; 0,250 Propionsäure.

Tabelle 7.6: Substratverwertung und Produktbildung [g/l] nach ca. 7 Wochen Inkubation von Isolat *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3.

Woche	Arabinose		Cellobiose		Galactose		Glycerin	
1 ¹	3,565	Arabinose	0,523	Glucose	3,531	Galactose	5,489	Glycerin
			0,110	Fructose				
7 ²	3,392	Arabinose	0,771	Glucose	3,395	Galactose	5,391	Glycerin
			0,188	Fructose				
7 ²	3,369	Arabinose	0,775	Glucose	3,308	Galactose	5,389	Glycerin
			0,190	Fructose				
Woche	Maltose		Rhamnose		Ribose		Trehalose	
1 ¹	3,200	Maltose	0,223	Fructose	2,840	Ribose	3,039	Trehalose
	0,655	Glucose	3,890	Rhamnose				
	0,167	Fructose						
7 ²	2,757	Maltose	0,207	Fructose	2,607	Ribose	2,897	Trehalose
	0,840	Glucose	3,687	Rhamnose				
	0,235	Fructose						
7 ²	3,144	Maltose	0,197	Fructose	2,568	Ribose	2,923	Trehalose
	0,752	Glucose	3,736	Rhamnose				
	0,190	Fructose						

¹ Angegeben ist der Mittelwert der Duplikatmessung. Die Angaben beziehen sich auf Tag 1.

² Die Substratverwertungsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind die Messwerte beider Kulturen.

7.2 Quantifizierung der Isolate mittels qPCR

Tabelle 7.7: Geradengleichungen und Parameter für die Auswertung der qPCR-Ergebnisse. Aufgeführt sind Geradengleichungen, welche aus den gemessenen Ct-Werten in PCR-Reaktionen mit den entsprechenden Primerpaaren erhalten wurden. Mit Hilfe dieser Gleichungen konnte die Anzahl der Kopien der 16S rDNA/g BGA-Probe berechnet werden. Die berechneten Werte sind Tabelle 7.8 aufgeführt. Weiterhin sind das Bestimmtheitsmaß R^2 und die Effizienzen der qPCR-Reaktionen angegeben.

Primerpaar	Gleichung	Parameter	
		R^2	Effizienz
Bac338F/Bac805R	$y = -3,5966x + 43,318$	0,9964	1,09
Desausfw/Desausrev	$y = -3,513x + 41,953$	0,9999	0,92
GlyW34fw/GlyW34rev	$y = -3,5023x + 42,302$	0,9996	0,92
Pr.eth.fw/Pr.eth.rev	$y = -3,7139x + 44,558$	0,9993	0,86
ASG2.3fw/ASG2.3rev	$y = -3,5925x + 44,182$	0,9972	0,90
Tpf/Tpr	$y = -3,4529x + 42,236$	0,9922	0,95
ASG1.4fw/ASG1.4rev	$y = -3,45826x + 42,462$	0,9979	0,95
Thesacfw/Thesacrev	$y = -3,4763x + 41,745$	0,9987	0,96
SG14fw/SG14rev	$y = -3,4883x + 43,119$	0,9971	0,94
LakG2.4fw/LakG2.4rev	$y = -3,4118x + 41,957$	0,9988	0,97
AS34fw/AS34rev	$y = -3,5099x + 42,519$	0,9985	0,93
L3fw/L3rev	$y = -3,4132x + 42,02$	0,9995	0,96
Tepsynfw/Tepsynrev	$y = -3,3644x + 42,464$	0,9985	0,98

Tabelle 7.8: Rohdaten der bestimmten Kopien des 16S rRNA-Gens in 1 g Biogasanlagen-Probe. Die Werte wurden mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden in Tabelle 7.7 berechnet.

1 = Bakterien, 2= *Clostridium kluyveri*/Stamm SG1.4, 3 = *Desulfotomaculum australicum*/Stamm L14, 4 = *Clostridium sporosphaeroides*/Stamm ASG2.3, 5 = *Proteiniborus ethanolicus*, 6 = *Proteiniborus* sp./Stamm ASG1.4, 7 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, 8 = *Tepidanaerobacter syntrophicus*, 9 = *Tepidanaerobacter* sp./Stamm AS34, 10 = *Thermoanaerobacterium* sp./gruppenspezifisch, 11 = *Dendrosporobacter* sp./Stamm LakG2.4, 12 = *Selenomonas bovis*/Stamm GlyW3.4, 13 = *Defluviitoga tunisiensis*/Stamm L3

Kopien der 16S rDNA in 1 g BGA-Probe													
Biogasanlage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
BGA Butschen	3,45 x 10 ⁹	2,97 x 10 ³	4,95 x 10 ³	1,70 x 10 ⁴	3,38 x 10 ³	1,85 x 10 ⁵	1,66 x 10 ³	1,60 x 10 ³	1,06 x 10 ⁷	6,55 x 10 ⁷	6,89 x 10 ²	9,26 x 10 ²	1,72 x 10 ⁸
BGA Glahn	8,15 x 10 ⁹	5,25 x 10 ³	5,47 x 10 ³	1,02 x 10 ⁵	8,45 x 10 ²	5,42 x 10 ⁵	1,23 x 10 ³	6,71 x 10 ³	3,70 x 10 ⁷	1,07 x 10 ⁹	5,59 x 10 ³	5,35 x 10 ⁴	2,02 x 10 ⁶
BGA Gebel	4,83 x 10 ⁹	1,10 x 10 ⁴	4,89 x 10 ³	1,44 x 10 ⁶	3,94 x 10 ³	3,52 x 10 ⁵	7,45 x 10 ¹	4,65 x 10 ³	1,06 x 10 ⁷	5,80 x 10 ⁸	4,55 x 10 ³	1,05 x 10 ³	7,49 x 10 ⁴
BGA Wagner	5,17 x 10 ⁹	2,58 x 10 ³	4,19 x 10 ³	8,08 x 10 ⁶	1,64 x 10 ³	6,27 x 10 ⁵	1,03 x 10 ²	8,56 x 10 ³	3,42 x 10 ⁷	4,03 x 10 ⁸	3,24 x 10 ³	1,42 x 10 ⁵	3,95 x 10 ⁷
Minimale and maximale Werte der Kopien der 16S rDNA in 1 g BGA-Probe													
BGA Butschen minimal	3,13 x 10 ⁹	1,21 x 10 ³	2,88 x 10 ³	1,66 x 10 ⁴	2,80 x 10 ³	2,03 x 10 ⁵	1,37 x 10 ³	1,50 x 10 ³	1,03 x 10 ⁷	5,98 x 10 ⁷	6,17 x 10 ²	8,93 x 10 ²	1,54 x 10 ⁸
BGA Butschen maximal	3,84 x 10 ⁹	5,24 x 10 ³	6,74 x 10 ³	1,77 x 10 ⁴	3,98 x 10 ³	1,58 x 10 ⁵	2,02 x 10 ³	1,65 x 10 ³	1,09 x 10 ⁷	7,24 x 10 ⁷	7,67 x 10 ²	9,60 x 10 ²	1,93 x 10 ⁸
BGA Glahn minimal	7,42 x 10 ⁹	4,53 x 10 ³	4,20 x 10 ³	7,46 x 10 ⁴	7,35 x 10 ²	4,92 x 10 ⁵	1,17 x 10 ³	2,48 x 10 ³	3,01 x 10 ⁷	1,05 x 10 ⁹	4,55 x 10 ³	5,23 x 10 ⁴	1,95 x 10 ⁶
BGA Glahn maximal	9,28 x 10 ⁹	5,90 x 10 ³	6,79 x 10 ³	1,31 x 10 ⁵	9,94 x 10 ²	6,38 x 10 ⁵	1,28 x 10 ³	3,77 x 10 ⁴	4,55 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁹	6,31 x 10 ³	5,47 x 10 ⁴	2,09 x 10 ⁶
BGA Gebel minimal	4,17 x 10 ⁹	1,00 x 10 ⁴	4,52 x 10 ³	1,27 x 10 ⁶	3,31 x 10 ³	2,93 x 10 ⁵	6,95 x 10 ¹	2,80 x 10 ³	9,75 x 10 ⁷	5,43 x 10 ⁸	3,69 x 10 ³	8,42 x 10 ²	7,36 x 10 ⁴
BGA Gebel maximal	5,74 x 10 ⁹	1,23 x 10 ⁴	5,52 x 10 ³	1,67 x 10 ⁶	4,35 x 10 ³	3,98 x 10 ⁵	7,99 x 10 ¹	7,82 x 10 ³	1,15 x 10 ⁷	6,03 x 10 ⁸	6,78 x 10 ³	1,32 x 10 ³	7,61 x 10 ⁴
BGA Wagner minimal	4,86 x 10 ⁹	2,00 x 10 ³	3,62 x 10 ³	7,78 x 10 ⁶	1,40 x 10 ³	5,66 x 10 ⁵	4,13 x 10 ¹	4,87 x 10 ³	3,17 x 10 ⁷	3,32 x 10 ⁸	2,34 x 10 ³	1,31 x 10 ⁵	3,68 x 10 ⁷
BGA Wagner maximal	5,64 x 10 ⁹	3,22 x 10 ³	5,30 x 10 ³	8,67 x 10 ⁶	1,94 x 10 ³	6,78 x 10 ⁵	2,55 x 10 ²	2,48 x 10 ⁴	3,69 x 10 ⁷	4,69 x 10 ⁸	4,45 x 10 ³	1,54 x 10 ⁵	4,24 x 10 ⁷

Alle Untersuchungen wurden in Zweifach- oder Dreifachbestimmungen (Biogasanlagen) oder in Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 7.9: Arten, welche laut Primer-Blast mit dem Primerpaar Thesacfw/rev PCR-Produkte bilden könnten. Angegeben ist, in wie vielen Basenpaaren sich die Ziel-DNA vom Primerpaar unterschieden haben. In PCR-Reaktionen muss überprüft werden, ob mit dem Primerpaar und dem jeweiligen Organismus ein PCR-Produkt generiert wird.

0 Basenpaare
<i>[Clostridium] sordellii</i> , <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> , <i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> , <i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i> , <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i> , <i>Clostridium thermoamylolyticum</i> , <i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> , <i>Thermoanaerobium lactoethylicum</i>
1 Basenpaar
<i>[Clostridium] cellulosi</i> , <i>Eubacterium acidaminophilum</i> , <i>Eubacterium acidaminophilum</i> , <i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> , <i>Sedimentibacter hongkongensis</i> , <i>Clostridium hastiforme</i>
2 Basenpaare
<i>Bacillus halodurans</i> , <i>Paenibacillus durus</i> , <i>Paenibacillus riograndensis</i> , <i>Paenibacillus beijingensis</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Paenibacillus odorifer</i> , <i>Paenibacillus graminis</i> , <i>Paenibacillus stellifer</i> , <i>Paenibacillus borealis</i> , <i>Paenibacillus sabinae</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> , <i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> , <i>Paenibacillus terrae</i> , <i>Helcococcus seattlensis</i> , <i>Paenibacillus campinasensis</i> , <i>Paenibacillus macerans</i> , <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> , <i>Paenibacillus lentus</i> , <i>[Clostridium] clariflavum</i> , <i>[Clostridium] stercorarium</i> , <i>Thermobacillus composti</i> , <i>Ammonibacillus agariperforans</i> , <i>Bacillus baekryungensis</i> , <i>Paenibacillus xylanilyticus</i> , <i>Symbiobacterium thermophilum</i> , <i>Bacillus clausii</i> , <i>Sulfobacillus acidophilus</i> , <i>Finegoldia magna</i> , <i>Ruminiclostridium thermocellum</i> , <i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Anaerococcus prevotii</i> , <i>Gottschalkia acidurici</i> , <i>Acetobacterium woodii</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Ethanoligenens harbinense</i> , <i>Clostridium acidurici</i> , <i>Paenibacillus lautus</i> , <i>Cohnella xylanilytica</i> , <i>Anaerobranca horikoshii</i> , <i>Clostridium clariflavum</i> , <i>Paenibacillus turicensis</i> , <i>Sporobacter termitidis</i> , <i>Paenibacillus xylanexedens</i> , <i>Fusibacter tunisiensis</i> , <i>Bacillus hwajinpoensis</i> , <i>Acetobacterium wieringae</i> , <i>Paenibacillus humicus</i> , <i>Paenibacillus fonticola</i> , <i>Paenibacillus timonensis</i> , <i>Tissierella creatinine</i> , <i>[Clostridium] purinilyticum</i> , <i>Paenibacillus vortex</i> , <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> , <i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> , <i>Paenibacillus tianmuensis</i> , <i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Paenibacillus validus</i> , <i>Paenibacillus chungangensis</i> , <i>Paenibacillus uliginis</i> , <i>Paenibacillus macerans</i> , <i>Anaerococcus tetradius</i> , <i>Paenibacillus lactis</i> , <i>Bacillus algicola</i> , <i>Acetobacterium bakii</i> , <i>Acetobacterium bakii</i> , <i>Paenibacillus abekawaensis</i> , <i>Paenibacillus fujiensis</i> , <i>[Clostridium] aldrichii</i> , <i>Pullulanibacillus uraniitolerans</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i> , <i>Paenibacillus castaneae</i> , <i>Sporolactobacillus inulinus</i> , <i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> , <i>Sporolactobacillus nakayamae</i> , <i>Paenibacillus amylolyticus</i> , <i>Paenibacillus macquariensis</i> , <i>Cohnella phaseoli</i> , <i>Alicyclobacillus fastidiosus</i> , <i>Alicyclobacillus sacchari</i> , <i>Sporanaerobacter acetigenes</i> , <i>Paenibacillus anaericanus</i> , <i>Paenibacillus favisporus</i> , <i>Proteiniborus ethanoligenes</i> , <i>Alicyclobacillus pohliae</i> , <i>Paenibacillus taiwanensis</i> , <i>Paenibacillus pabuli</i> , <i>Paenibacillus woosongensis</i> , <i>Acetanaerobacterium elongatum</i> , <i>Carboxydotherrum hydrogeniformans</i> , <i>Acetobacterium submarinus</i> , <i>Paenibacillus motobuensis</i> , <i>Soehngenia saccharolytica</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> , <i>Symbiobacterium thermophilum</i> , <i>Paenibacillus ruminocola</i> , <i>Helcococcus sueciensis</i> , <i>Paenibacillus wynnii</i> , <i>Linmingia china</i> , <i>Paenibacillus chinjuensis</i> , <i>Paenibacillus popilliae</i> , <i>Paenibacillus barcinonensis</i> , <i>Sporolactobacillus terrae</i> , <i>Sporolactobacillus kofuensis</i> , <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , <i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i> , <i>Alicyclobacillus pomorum</i> , <i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> , <i>Alicyclobacillus tolerans</i> , <i>Paenibacillus sepulcri</i> , <i>Paenibacillus alkaliterrae</i> , <i>Saccharofermentans acetigenes</i> , <i>Paenibacillus curdolanolyticus</i> , <i>Paenibacillus apiaries</i> , <i>Bacillus cycloheptanicus</i> , <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> , <i>Alicyclobacillus hesperidum</i> , <i>Alicyclobacillus herbarius</i> , <i>Paenibacillus agarexedens</i> , <i>Paenibacillus stellifer</i> , <i>Paenibacillus alvei</i> , <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> , <i>Pullulanibacillus naganoensis</i> , <i>Paenibacillus ehimensis</i> , <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> , <i>Eubacterium aggregans</i> , <i>Bacillus tipchiralis</i> , <i>Bacillus vortex</i> , <i>[Eubacterium] minutum</i> , <i>Peptoniphilus lacrimalis</i> , <i>Mahella australiensis</i> , <i>Thermotalea metallivorans</i> , <i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>
3 Basenpaare
<i>Anaerovirgula multivorans</i> , <i>Thermohalobacter berrensensis</i> , <i>Cylicostephanus goldi</i> , <i>Patulibacter medicamentivorans</i>
4 Basenpaare
<i>Streptomyces badius</i> , <i>Streptomyces albus</i> , <i>Streptomyces lydicus</i> , <i>Streptomyces vietnamensis</i> , <i>Streptomyces auratus</i> , <i>Streptomyces scopuliridis</i> , <i>Oxobacter pfennigii</i> , <i>Trichocoleus desertorum</i> , <i>Streptomyces gramineus</i> , <i>Streptomyces nigrescens</i> , <i>Streptomyces sanglieri</i> , <i>Streptomyces niveus</i>

8. Eidesstattliche Erklärung

9. Danksagungen

10. Lebenslauf