

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**„Mikrobiologie der Fermentation in NawaRo-
Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung
des Abbaus von Propionsäure“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Kerstin Seyfarth

geb. am 26.06.1981 in Offenbach am Main

Mainz, November 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2008 bis Oktober 2012 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Helmut König verfasst.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2013

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Posterpräsentationen, Publikationen und Vorträgen veröffentlicht, eingereicht oder sind in Vorbereitung:

Robbin Stantscheff, Kerstin SEYFARTH, Stefan Dröge, Michael Klocke, Helmut König. Culturable methanogenic microbiota from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants and lab-scale biogas fermenters. In Vorbereitung.

Pressemitteilung der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. am 29.03.2012.

Propionsäure im Griff behalten – neue Forschungsergebnisse zur Vermeidung von Übersäuerungen in Biogasanlagen. URL:

[http://www.nachwachsenderohstoffe.de/presseservice/pressemitteilungen/aktuelle-mitteilungen/aktuelle-nachricht/archive/2012/march/article/propionsaeure-im-griff-behalten-neue-forschungsergebnisse-zur-vermeidung-von-uebersaeuerungen-in/?tx_ttnews\[day\]=29&cHash=197957e3cff3e7a54f561d0ff7a0a026](http://www.nachwachsenderohstoffe.de/presseservice/pressemitteilungen/aktuelle-mitteilungen/aktuelle-nachricht/archive/2012/march/article/propionsaeure-im-griff-behalten-neue-forschungsergebnisse-zur-vermeidung-von-uebersaeuerungen-in/?tx_ttnews[day]=29&cHash=197957e3cff3e7a54f561d0ff7a0a026)

Kerstin SEYFARTH, Stefan Dröge, Helmut König. 2011. Abschlussbericht zum Verbundprojekt „Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozesssicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung“. URL:

http://www.nachwachsenderohstoffe.de/index.php?id=948&tabelle=fnr_projekte&alles=1&status=Inhalt&zeitraum=formular&fkz=22004007&suchefkz=&sucheadresse=&von=01.04.1992&bis=29.03.2012&zeitraum=formular&untertitel=Bioenergie&was=&produktlinie=90&minz=240&maxz=250&zurueck=Stichwort. 29.03.2012.

R. Stantscheff, K. SEYFARTH, S. Dröge, M. Klocke, H. König. 2011. Isolation and characterisation of methanogenic Archaea from on-farm biogas plants. Poster. GWP013. URL: www.vaam.uni-halle.de/pdf/VAAM_Tagungsband_2011.pdf (30.06.2012), BIOspektrum Tagungsband der VAAM-Jahrestagung 2011. *Sonderausgabe 2011, ISSN 0947-0867, S. 157. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie 2011, VAAM 2011, 03.-06.04.2011, Karlsruhe.*

Kerstin SEYFARTH, Robbin Stantscheff, Stefan Dröge, Helmut König. 2009. Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. Poster. URL: <http://www.lfl.bayern.de/biogasscience2009/postersession/> (30.06.2012)

Charakterisierung der methanogenen Archaeobakterien in landwirtschaftlichen NaWaRo-Biogasanlagen. Internationale Wissenschaftskonferenz Biogas Science 2009 science meets practice, 02. - 04. Dezember, Erding.

Kerstin SEYFARTH, Robbin Stantscheff, Stefan Dröge, Helmut König. 2009. Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. Poster. Tag der Technologie BioTech in Rheinland-Pfalz. 26.10.2009, ZDF- Konferenzzentrum, Mainz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Erneuerbare-Energien-Gesetz	1
1.2	Primärenergie- und Endernergieverbrauch in Deutschland bis 2011	5
1.3	Primärenergieverbrauch und Energie-Mix in Deutschland bis 2020	13
1.4	Potenziale der Biomassenutzung in Deutschland	17
1.4.1	Flächenverteilung in Deutschland	17
1.4.2	Debatte um die Flächennutzungskonkurrenz zwischen Nahrungs- und Energiepflanzen	18
1.5	Energie aus Biomasse	20
1.5.1	landwirtschaftliche Biogasanlagen	21
1.5.1.1	Verfahrenstechnik landwirtschaftlicher Biogasanlagen	24
1.5.1.2	Inputstoffe zur Biogasherstellung	24
1.5.1.3	Mikrobielle Zusammensetzung in landwirtschaftlichen Biogasanlagen	26
1.5.2	Die Bildung von Biogas aus organischem Material in landwirtschaftlichen Biogasanlagen	29
1.5.2.1	Hydrolyse	30
1.5.2.2	Primäre Fermentation	32
1.5.2.3	Sekundäre Fermentation	32
1.5.2.4	Methanogenese	33
1.5.2.5	Zusammensetzung des Biogases	34
1.6	Propionsäure und seine Verwendung	36
1.7	Propionsäure in Biogasfermentern	37
1.7.1	Mikrobielle anaerobe Bildung von Propionsäure	39
1.7.1.1	Methylmalonyl-CoA-Weg	40
1.7.1.2	Acryloyl-CoA-Weg	42
1.7.1.3	Succinat-Decarboxylierung	44
1.7.2	Mikrobieller anaerober Abbau von Propionsäure	46
1.8	Die anaerobe Bildung von Acetat aus CO ₂ und H ₂	52
1.8.1	Acetyl CoA Weg (Wood-Ljungdahl Weg)	53
1.9	Ursprung und Kreislauf von Methan auf der Erde	57
1.9.1	Die natürliche Bildung von Methan	58
1.9.1.1	Methanogenese	59
1.9.1.1.1	Hydrogenotrophe Methanogenese	62
1.9.1.1.2	Acetoklastische Methanogenese	64
1.9.1.1.3	Methylotrophe Methanogenese	65
1.10	Ziele der vorgelegten Arbeit	68
2	Material	69
2.1	Geräte und Hilfsmittel	69

2.2 Chemikalien	72
2.3 Biochemikalien, Enzyme und Kits	74
2.3.1 Biochemikalien	74
2.3.2 Enzyme.....	75
2.3.3 Kits	75
2.4 Synthetische Oligonukleotide	75
2.5 Puffer und Lösungen	77
2.5.1 Klassische DNA-Isolierung.....	77
2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese	78
2.5.3 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese	79
2.5.4 Temperatur Gradienten Elektrophorese	79
2.5.5 DAPI-Färbung.....	80
2.5.6 HPLC-Puffer	80
2.5.7 DC-Puffer.....	80
2.6 Nährmedien	80
2.7 Organismen	87
3 Methoden	92
3.1 Probenmaterial aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern	92
3.2 Probennahme aus NawaRo-Biogasanlagen	93
3.3 Anaerobe Kultivierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen	94
3.3.1 Isolierung von Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen.....	96
3.3.2 Anreicherung, Kultivierung und Isolierung methanogener Archaea.....	97
3.4 Physiologische Charakterisierung von Eigenisolaten aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern	99
3.4.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie der Eigenisolate	100
3.4.1.1 Titerbestimmung mithilfe der DAPI-Färbung	100
3.4.1.2 Bestimmung des Titers methanogener Archaea	100
3.4.2 Bestimmung des Titers propionsäureabbauender Mikroorganismen mithilfe des MPN-Verfahrens	101
3.4.3 Wachstumsuntersuchungen methanogener Eigenisolate mit unterschiedlichen Substraten	101
3.5 Molekularbiologische Identifizierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen	102
3.5.1 Isolierung chromosomaler Gesamt-DNA aus Fermentern und Kulturen	104
3.5.2 Optimierte Amplifizierung bakterieller 16S rDNA aus chromosomaler DNA für Proben aus NawaRo-Biogasanlagen und daraus stammenden Kulturen.....	105
3.5.3 Amplifizierung der 16S rDNA aus archaealer chromosomaler DNA.....	107

3.5.4	Amplifizierung verschiedener Teilsequenzen der chromosomalen DNA methanogener Archaea	108
3.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	109
3.5.6	Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten mit der Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese und der Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese	110
3.5.7	Klonierung unterschiedlicher 16S rDNA Fragmente	111
3.5.8	Restriktionslängenpolymorphismus-Analyse von 16S rDNA Fragmenten zur Unterscheidung verschiedener Genera und Arten von Mikroorganismen.....	112
3.5.9	Reamplifizierung und Sequenzierung reiner 16S rDNA-Fragmente.....	113
3.5.10	Phylogenetische Analysen partieller 16S rDNA aus eigenisolierten Reinkulturen und Klonen.....	113
3.6	Chemische Analysen von Substraten und Produkten in Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen.....	114
3.6.1	HPLC-Analysen des mikrobiellen anaeroben Propionsäureabbaus.....	114
3.6.2	Gaschromatographie der mikrobiellen Methanbildung.....	117
3.7	Chemische Analyse des Reaktorfiltrats.....	118
3.7.1	Dünnschichtchromatographie des Reaktorfiltrats.....	118
3.7.2	HPLC-Analysen des Reaktorfiltrats	119
4	Ergebnisse	121
4.1	Isolierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen, Laborfermentern und propionsäureabbauenden Mischkulturen.....	121
4.1.1	Isolierung von Bakterien aus propionsäureabbauenden Mischkulturen	121
4.1.2	Isolierung methanogener Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern.....	121
4.2	Morphologie von Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern und anaerob propionsäureabbauender Mischkulturen	122
4.2.1	DAPI-Färbung syntroph propionsäureoxidierender Mischkulturen	123
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen methanogener Archaea.....	124
4.2.2.1	Fluoreszenzmikroskopie der eigenisolierten Reinkulturen der Art <i>Methanobacterium formicicum</i>	125
4.2.2.2	Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen der Art <i>Methanoculleus bourgensis</i>	126
4.2.2.3	Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen der Art <i>Methanosarcina mazei</i>	127
4.2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie der eigenisolierten Reinkultur HWS2.1 der Art <i>Methanosarcina barkeri</i>	128
4.2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie der eigenisolierten Reinkultur LFP3.1 der Art <i>Methanomethylovorans sp.</i>	129
4.3	Titerbestimmung von Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen.....	130
4.3.1	Titerbestimmung propionsäureabbauender Mikroorganismen in Mischkulturen.....	130
4.3.2	Titerbestimmung eigenisolierter methanogener Archaea	130

4.4 Physiologische Untersuchungen methanogener Eigenisolate mit unterschiedlichen Substraten	131
4.5 Systematik von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen	132
4.5.1 Analysen bakterieller 16S rDNA aus NawaRo-Biogasanlagen.....	133
4.5.1.1 Identifizierungsergebnisse bakterieller 16S rDNA aus dem Fermenter der NawaRo-Biogasanlage BEG mit Etablierungsergebnissen der PCR-Methode.....	133
4.5.1.2 Identifizierung von Bakterien mit chromosomaler Gesamt-DNA aus den Fermentern weiterer NawaRo-Biogasanlagen und einem Nachgärer.....	137
4.5.2 Identifizierung kultivierbarer Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Misch- und Unterkulturen.....	140
4.5.2.1 Identifizierung von Bakterien aus den Mischkulturen Fp1, Fp1a sowie Unterkulturen Fp1a1264, Fp1a520 und Fp1a63-L.....	141
4.5.2.2 Identifizierung von Bakterien aus der Mischkultur Wp1.....	149
4.5.2.3 Identifizierung von Bakterien aus der Unterkultur Wp2a1264.....	151
4.5.2.4 Identifizierung von Bakterien aus der Mischkultur Gp1a und Unterkultur Gp1b1264.....	154
4.5.2.5 Identifizierung von Bakterien aus den Unterkulturen Ap1a1264 und Ap1a520.....	160
4.5.3 Zusammenfassung der identifizierten und isolierten Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen.....	164
4.6 Identifizierung eigenisolierter methanogener Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen	165
4.6.1 Stammspezifische Identifizierung methanogener Archaea der Art <i>Methanobacterium formicicum</i> mit der SAPD-PCR.....	167
4.6.2 Artspezifische Identifizierung der Eigenisolate methanogener Archaea mit der DGGE.....	168
4.6.3 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen methanogener Archaea.....	171
4.6.3.1 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung <i>Methanobacterium</i>	172
4.6.3.2 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung <i>Methanoculleus</i>	174
4.6.3.3 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung <i>Methanosarcina</i>	176
4.6.3.4 Artspezifische Identifizierung einer eigenisolierten Kultur der Gattung <i>Methanosaeta</i>	179
4.6.3.5 Artspezifische Identifizierung einer eigenisolierten Kultur der Gattung <i>Methanomethylovorans</i>	180
4.6.4 Zusammenfassung der identifizierten eigenisolierten methanogenen Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen.....	181
4.6.5 Phylogenetische Stammbäume bakterieller und archaealer 16S rDNA anaerober Mikroorganismen.....	189
4.6.5.1 Phylogenetische Stammbäume partieller 16S rDNA von Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen.....	189
4.6.5.1.1 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1 stammenden Bakterien.....	190

4.6.5.1.2	Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp2 stammenden Bakterien	191
4.6.5.1.3	Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Gp1 stammenden Bakterien	192
4.6.5.1.4	Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1 stammenden Bakterien	193
4.6.5.2	Phylogenetische Stammbäume partieller 16S rDNA methanogener Archaea	193
4.6.5.2.1	Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA nach einer DGGE aus der Gesamt-DNA von Eigenisolaten methanogener Archaea	194
4.6.5.2.2	Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA aus der Gesamt-DNA von Eigenisolaten methanogener Archaea	195
4.7	Substrate und Produkte anaerober Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen	196
4.7.1	Propionsäureoxidation anaerober Anreicherungskulturen	196
4.7.1.1	Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Fp1	197
4.7.1.2	Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Gp1	198
4.7.1.3	Syntrophe Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Gp1 mit der Reinkultur TAF1	199
4.7.1.4	Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Ap1	200
4.7.1.5	Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Ap3	200
4.7.2	Propionsäureoxidation anaerober Mischkulturen mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	201
4.7.2.1	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Fp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	202
4.7.2.2	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Wp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	203
4.7.2.3	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Wp2 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	204
4.7.2.4	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Gp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	205
4.7.2.5	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Ap1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	206
4.7.2.6	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Ap3 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	207
4.7.3	Propionsäureoxidation anaerober Mischkulturen nach Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure	208
4.7.3.1	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Fp1a und Fp1b	209
4.7.3.2	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Wp1a und Wp1b	210

4.7.3.3	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Wp2a und Wp2b.....	211
4.7.3.4	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Gp1a und Gp1b.....	212
4.7.3.5	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Ap1a und Ap1b.....	212
4.7.3.6	Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Ap3a und Ap3b.....	213
4.7.4	Substrate und Produkte definierter Mischkulturen anaerober Mikroorganismen und methanogener Archaea.....	214
4.7.4.1	Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit <i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292.....	215
4.7.4.2	Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit <i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740217	
4.7.4.3	Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261.....	219
4.7.4.4	Substrate und Produkte methanogener Eigenisolate und <i>Geovibrio thiophilus</i> ^T DSM11263 (Negativkontrollen).....	220
4.7.5	Methanbildung durch methanogene Archaea.....	222
4.7.5.1	Methanbildung syntroph propionsäureoxidierender Mischkulturen.....	223
4.7.5.2	Methanbildung definierter Mischkulturen anaerober Bakterien mit methanogenen Archaea.....	224
4.7.5.3	Methanbildung eigenisolierter Reinkulturen und Typstämmen methanogener Archaea....	226
4.7.5.3.1	Methanbildung des Typstamms <i>Methanobacterium formicicum</i> ^T DSM1535.....	226
4.7.5.3.2	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1....	228
4.7.5.3.3	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1.....	230
4.7.5.3.4	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1.....	231
4.7.5.3.5	Methanbildung des Typstamms <i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053.....	233
4.7.5.3.6	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3.....	234
4.7.5.3.7	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1.....	235
4.7.5.3.8	Methanbildung des Eigenisolats <i>Methanosaeta concilii</i> Stamm BEG4.....	236
4.8	Zusammensetzung des Reaktorfiltrats.....	237
4.8.1	Pflanzenpartikel im Reaktorfiltrat.....	237
4.8.2	Acetat im Reaktorfiltrat.....	238
4.8.3	Aminosäuren im Reaktorfiltrat.....	238
4.8.4	Zuckeralkohol im Reaktorfiltrat.....	240
5	Diskussion.....	241
5.1	Molekularbiologisch identifizierte Bakterien und methanogene Archaea aus NawaRo- Biogasanlagen und Laborfermentern.....	241
5.2	Mikroorganismen in syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen.....	243
5.2.1	Bakterien und eigenisiolierte Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1.....	244

5.2.2	Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp1.....	248
5.2.3	Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp2.....	250
5.2.4	Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Gp1	251
5.2.5	Bakterien und eigenisierte Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1	252
5.3	Titer der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen und Reinkulturen agglomerierender methanogener Archaea.....	254
5.4	Isolierte und angereicherte methanogene Kulturen aus Laborfermentern	254
5.5	Chemisch analysierte Mischkulturen syntroph propionsäureoxidierender Mikroorganismen	255
5.6	Substrate und Produkte definierter Co-Kulturen	255
5.6.1	Co-Kulturen mit <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	256
5.6.2	Co-Kulturen mit <i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	256
5.6.3	Co-Kulturen mit <i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292.....	257
6	Zusammenfassung	258
7	Ausblick.....	260
8	Literaturverzeichnis	261
9	Anhang	300
9.1	Paarweise und multiple Alignierungen bakterieller partieller 16S rDNA Sequenzen aus propionsäureabbauenden Mischkulturen.....	300
9.2	Paarweise und multiple Alignierungen archaealer partieller 16S rDNA Sequenzen aus archaealen Reinkulturen	312
9.3	Verwendete Websites	318

Abkürzungen

A	Adenin
AEE	Agentur für Erneuerbare Energien
AFLP	amplifizierter Fragment Längenpolymorphismus
AGEB	AG Energiebilanzen e. V.
AGEE-Stat	Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik
AKW	Atomkraftwerk
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> (amplifizierte ribosomale DNS Restriktionsanalyse)
ATB	Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEE	Bundesverband Erneuerbare Energien e. V.
BfN	Bundesamt für Naturschutz
BGA	Biogasanlage
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BRD	Bundes Republik Deutschland
BrES	Bromoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CH ₄	Methan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin
DABCO	1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat
deion.	Deionisiert
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxiribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EEA	European Environment Agency
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolysaccharid
EU	Europäische Union
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.
G	Guanin
GC	Guanin + Cytosin-Gehalt [%]
GWh	Gigawattstunden
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser, Dihydrogenoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff, Dihydrogensulfid
ha	Hektar
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IEA	International Association for the Evaluation of Educational Achievement
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kap.	Kapitel
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kWh	Kilowattstunden
L	Liter
kg	Kilogramm
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mrd.	Milliarden
NCBI	National Center for Biotechnology Information
min	Minute
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
Na ⁺	Natriumionen
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
nmol	Nanomol
OECD-FAO	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development-Food and Agriculture</i>

	<i>Organization of the United Nations</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PFI	Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V.
pmol	Picomol
PJ	Peta Joule
ppmv	<i>Parts per million</i>
r min ⁻¹	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rDNA	<i>Ribosomal Desoxyribonucleic Acid</i> (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (Randomisiert amplifizierte polymorphe DNS)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RIU · F.S. ⁻¹	<i>Refractive Index Units per Full Scale</i>
RWI Essen	Rheinisch-Westfälische Institut für Wirtschaftsforschung
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SAPD	<i>Specifically Amplified Polymorphic DNA</i> (Spezifisch amplifizierte polymorphe DNS)
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> (Sequenzabhängige amplifizierte Region)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SKE	Steinkohleeinheit
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> (einfache Sequenzwiederholung)
SSU	<i>Small Subunit</i> (kleine Untereinheit)
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> (Wiederholung in direkter Folge)
T	Thymin
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tg	Terragramm
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
T _m [° C]	<i>Melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat
TWh	Terrawattstunden

U	Unit (Einheit)
UNFCCC	United Nations Framework Convention on Climate Change
V	Volt
WBGU	Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen
WI	Wuppertal Institut für Klima, Umwelt, Energie GmbH
β X-Gal	β 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid

1 Einleitung

Sicherheit, Gesundheit und Umwelt des Menschen bedürfen große Mengen von Energie und Abfallbeseitigung. Aufgrund von Energiegewinnung durch zum Beispiel fossile Brennstoffe und Atomenergie, kam es zu erhöhten Treibhausgas-Emissionen, insbesondere des Kohlenstoffdioxids (CO₂). Daraus resultierte ein andauernder Klimawandel (UNFCCC 2012). Außerdem neigen sich die Ressourcen der fossilen Brennstoffe dem Ende zu und die Entsorgung des atomaren Mülls ist als ein großes Problem erkannt geworden. Aus diesen Gründen wächst das Interesse weltweit, alternative Wege zur Energiegewinnung einzuschlagen. Energie aus nachwachsenden Rohstoffen ist ein alternativer Weg. Dazu zählen Solarenergie, Windenergie, Wasserenergie, Bioenergie und seit 2009 die Geothermie. Energie aus nachwachsenden Rohstoffen kann nahezu CO₂-Emissionsneutral hergestellt werden. Des Weiteren erschöpfen nachwachsende Rohstoffe, ökologisch genutzt, nicht. Und die Energetisierung nachwachsender Rohstoffe kann auch zur Abfallentsorgung beitragen. Die Biogasherstellung kombiniert beide Bedürfnisse des Menschen: Energie, also Strom und Wärme kann aus Biogas hergestellt und Biogas kann aus biologischen Abfällen produziert werden. Die Biogasherstellung ist ein Vorgang, bei dem Technologie und Mikrobiologie eng zusammenwirken. Biogas wird aus organischen Stoffen unter anaeroben Bedingungen mikrobiell hergestellt. Die technologische Entwicklung hat große Fortschritte gemacht, wobei technologische Entwicklung weiterhin nicht am Ende ist. Wie steht es um die mikrobiologische Entwicklung? Die Mikrobiologie in Klärschlämmen ist gut erforscht und die Abläufe bekannt. Doch verhalten sich die gleichen Mikroorganismen genauso in Biogasanlagen? Es besteht noch viel Entwicklungsbedarf bei den Erneuerbaren Energien, insbesondere bei der Herstellung von Biogas. Seit 1990 werden die Wege für Energie aus nachwachsenden Rohstoffen auch von politischer Seite begünstigt (BMU 1990, 2000, 2004, 2008a, b und 2011). Seitdem fand eine rasante Entwicklung unter anderem auch bei der Biogasherstellung statt. Um die Hintergründe der bisherigen Entwicklung in der Biogasherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen zu erläutern folgt eine chronologische Aufführung der gesetzlichen Beschlüsse im Bereich Erneuerbare Energien.

1.1 Das Erneuerbare-Energien-Gesetz

Strom aus Erneuerbaren Energien wurde hauptsächlich von kleinen Unternehmen hergestellt. Das Einspeisen von Strom aus Erneuerbaren Energien in das Verbundnetz wurde von großen Stromerzeugern stark erschwert. Daher wurde vom Bundestag das Gesetz über die Einspeisung von Strom aus Erneuerbaren Energien in das öffentliche Netz (Stromeinspeisungsgesetz) erlassen (BMU 1990), welches 1991 in Kraft trat. Es heißt im § 1 Anwendungsbereich: “ *Dieses*

Gesetz regelt die Abnahme und die Vergütung von Strom, der ausschließlich aus Wasserkraft, Windkraft, Sonnenenergie, Deponiegas, Klärgas oder aus Biomasse im Geltungsbereich dieses Gesetzes gewonnen wird, durch öffentliche Elektrizitätsversorgungsunternehmen. ...“ und ebnet mit Vergütungen den verpflichtenden Weg zur Einspeisung von Strom aus Erneuerbaren Energien in das Verbundnetz.

Am 01.04.2000 tritt das Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz – EEG, BMU 2000) in Kraft. In dessen Zielsetzung (§ 1 Ziel des Gesetzes) steht: *„Ziel dieses Gesetzes ist es, im Interesse des Klima- und Umweltschutzes eine nachhaltige Entwicklung der Energieversorgung zu ermöglichen und den Beitrag Erneuerbarer Energien an der Stromversorgung deutlich zu erhöhen, um entsprechend den Zielen der Europäischen Union und der Bundesrepublik Deutschland den Anteil Erneuerbarer Energien am gesamten Energieverbrauch bis zum Jahr 2010 mindestens zu verdoppeln.“*(BMU 2000).

Im Erfahrungsbericht der Bundesregierung zum EEG 2002 (BMU 2002) heißt es in der Einführung unter anderem: *„...Die Zielsetzung in Deutschland ist eingebettet in einen europäischen Rahmen. In der EU-Richtlinie zur Förderung der Stromerzeugung aus Erneuerbaren Energiequellen im Elektrizitätsbinnenmarkt vom 27. September 2001 hat sich Deutschland zu dem Ziel bekannt, bis zum Jahr 2010 den Anteil regenerativ erzeugten Stroms im heimischen Elektrizitätsmarkt auf rd. 12,5 % zu steigern. Trotz unverkennbarer Erfolge – nach einem Anteil der Erneuerbaren Energien am Netto- Stromverbrauch von 5,2 % im Jahr 1998 und von annähernd 7 % im Jahr 2000 gab es im Jahr 2001 einen Anstieg auf knapp 7,5 % – erfordert der weitere Ausbau Erneuerbarer Energien derzeit auf absehbare Zeit noch eine gezielte staatliche Unterstützung. Diese reicht von der Förderung von Forschung und Entwicklung im Bereich Erneuerbarer Energien über die Gewährung von Investitionsanreizen zur Nachfragestimulierung bis hin zu gesetzlichen Einspeise- und Vergütungsregelungen. ...“*. Die Auswirkungen werden in Kapitel 1.2 erläutert.

Das EEG wurde am 21.07.2004 zur Umsetzung der Richtlinie 2001/77/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. September 2001 zur Förderung der Stromerzeugung aus Erneuerbaren Energiequellen im Elektrizitätsbinnenmarkt in das Gesetz zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich geändert. Im Zweck des Gesetzes Artikel 1, §1, Absatz 2 steht nun: *“Zweck dieses Gesetzes ist ferner, dazu beizutragen, den Anteil Erneuerbarer Energien an der Stromversorgung bis zum Jahr 2010 auf mindestens 12,5 Prozent und bis zum Jahr 2020 auf mindestens 20 Prozent zu erhöhen.“* (BMU 2004). Hervorzuheben ist, dass mit der Neufassung des EEG 2004 mit § 8 Vergütung von Strom aus Biomasse Absatz 2 Nr. 1 eine Zusatzvergütung für Strom aus nachwachsenden Rohstoffen von der Bundesregierung eingeführt wurde. Als nachwachsende Rohstoffe wurden Pflanzen oder Pflanzenbestandteile definiert, die ausschließlich zur Nutzung in Biomasseanlagen angebaut und verarbeitet werden und Gülle beziehungsweise aus landwirtschaftlichen Brennereien anfallende

Schlempe, für die keine anderweitige Verwendungspflicht besteht. Die Auswirkungen des EEG 2004 werden in Kapitel 1.2 und 1.4 erläutert.

Der Anteil der Erneuerbaren Energien am Primärenergieverbrauch hat sich seit Inkrafttreten des EEG im Jahr 2000 von 2,6 % auf rund 5,8 % im Jahr 2006 und am gesamten Endenergieverbrauch von 3,8 % auf rund 8,0 % im Jahr 2006 mehr als verdoppelt (BMU 2007). Der Anteil der Erneuerbaren Energien am gesamten Bruttostromverbrauch hat sich laut BMU ebenfalls fast verdoppelt: von 6,3 % im Jahr 2000 auf rund 11,6 % im Jahr 2006. Für 2007 erwartete das BMU über 13 % erwartet, womit das Ausbauziel des EEG bis 2010 bereits 2007 überschritten werde.

Bezüglich der Erneuerbaren Energien aus Biomasse schreibt das BMU (2007) in ihrem Erfahrungsbericht, dass die Stromerzeugung aus Biomasse (inklusive biogener Abfall) einen starken Aufwärtstrend zeigte, die sich von rund 8,0 Mrd. kWh im Jahr 2004 auf rund 15,6 Mrd. kWh 2006 steigern konnte, was einem Anteil von etwa 2,5 % am Bruttostromverbrauch entsprach. Der mit der Neufassung des EEG 2004 eingeführte „NawaRo-Bonus“ (Nachwachsende Rohstoffe-Bonus) hatte zur Folge, dass sich das Wachstum bei Biogasanlagen zwischen 2004 und 2006 vervierfachte, womit ein Trend zu größeren Anlagen einherging, so das BMU in seinem Erfahrungsbericht 2007.

Das System des EEG gilt als das erfolgreichste im Klimaschutz und wird von mehr als 40 Ländern ähnlich durchgeführt (BMU 2007). Ebenfalls 2007 wird jedoch von verschiedenen Stellen unter anderem die Abschaffung des „NawaRo-Bonus“ gefordert: Aufgrund einer drohenden Flächenkonkurrenz zwischen dem Anbau von Energiepflanzen und Futter- und Nahrungsmittelproduktion würden die durch schlechte Ernten, zu geringen Vorräten und den Ausbau der Bioethanolproduktion erhöhten Preise von Agrarprodukten weiter in die Höhe getrieben (Genauere Erläuterungen siehe Kapitel 1.4).

Am 01.01.2009 trat das neue EEG in Kraft. Im Teil I Allgemeine Vorschriften § 1 Zweck des Gesetzes steht: *„(1) Zweck dieses Gesetzes ist es, insbesondere im Interesse des Klima- und Umweltschutzes eine nachhaltige Entwicklung der Energieversorgung zu ermöglichen, die volkswirtschaftlichen Kosten der Energieversorgung auch durch die Einbeziehung langfristiger externer Effekte zu verringern, fossile Energieressourcen zu schonen und die Weiterentwicklung von Technologien zur Erzeugung von Strom aus Erneuerbaren Energien zu fördern.*

(2) Um den Zweck des Absatzes 1 zu erreichen, verfolgt dieses Gesetz das Ziel, den Anteil Erneuerbarer Energien an der Stromversorgung bis zum Jahr 2020 auf mindestens 30 Prozent und danach kontinuierlich weiter zu erhöhen.“

Der Bonus für Strom aus nachwachsenden Rohstoffen wurde erhöht und eine Anlage 2 erzeugt, in der die Ausschließlichkeit der nachwachsenden Rohstoffe gestrichen wurde (BMU 2008b). Das bedeutet: Gülle wurde dem Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen gleichgestellt.

Außerdem enthält Anhang 2 eine Positiv- (Ziffer III) und eine Negativliste (Ziffer IV), in den nachwachsende Rohstoffe beziehungsweise nicht nachwachsende Rohstoffe nach Ziffer I1.a definiert wurden. Diesen Listen nachgestellt ist eine Positivliste V, die einige als nicht nachwachsende Rohstoffe eingestufte, rein pflanzliche Nebenprodukte wie zum Beispiel Gemüseabputz, Glycerin aus der Verarbeitung von Pflanzenölen oder frischer, unbehandelter Obsttrester für den Einsatz in Biogasanlagen erlaubt. Zusätzlich wurde ein Gülle- (Ziffer VI 2.b) und ein Landschaftspflegebonus (Ziffer VI 2.c) eingeführt.

Im Dezember 2011 wurde das EEG (BMU 2008a) im Bereich Biogasherstellung dahingehend geändert beziehungsweise ergänzt, dass aus überwiegend Biomasse-Abfällen (§ 27a) und Gülle (§ 27b) hergestelltes Biogas ebenfalls gestaffelt vergütet wird. Neu wurde eine Nachweispflicht (§ 27c) eingeführt, bei der Anlagenbetreiber dokumentieren müssen, aus welcher Biomasse wie viel Biogas beziehungsweise Strom hergestellt worden ist (BMU 2011). Die Beweggründe des Bundesministeriums sind im Kapitel 1.4 erläutert.

Die oben erläuterten politischen Entscheidungen und neuen Gesetzgebungen haben den Energiemix in Deutschland beeinflusst. Die Energiegewinnung aus Erneuerbaren Rohstoffen ist gestiegen. Auf den Energiemix in Deutschland und dessen Veränderung wird daher im folgenden Kapitel 1.2 näher eingegangen.

1.2 Primärenergie- und Endernergieverbrauch in Deutschland bis 2011

In den VDI-Richtlinien VDI 4661 (VDI 2003) und VDI 4608 (VDI 2005) Blatt 1 definieren die Primärenergie als Energie aus natürlichen Energieträgern. Dazu zählen zum Beispiel Stein- und Braunkohle, Mineralöl, Erdgas, Erneuerbare Energien und die Kernenergie. Die Endenergie wird beschrieben als die Energie, die zum Beispiel in Form von Brenn- beziehungsweise Treibstoffen oder elektrischer Energie beim Endverbraucher ankommt. Dabei hat die Endenergie einen großen Bestandteil an Sekundärenergie, welche aus der Umwandlung von Primärenergie entsteht (VDI 4661, VDI 4608 Blatt 1). Im Folgenden behandeln Abbildungen und Erläuterungen den Primärenergieverbrauch der Jahre 1990 bis 2011 (Abbildung 1, AGEB 2012) und des Primärenergie-Mixes 2011 in Deutschland (Abbildung 2, AGEB 2012).

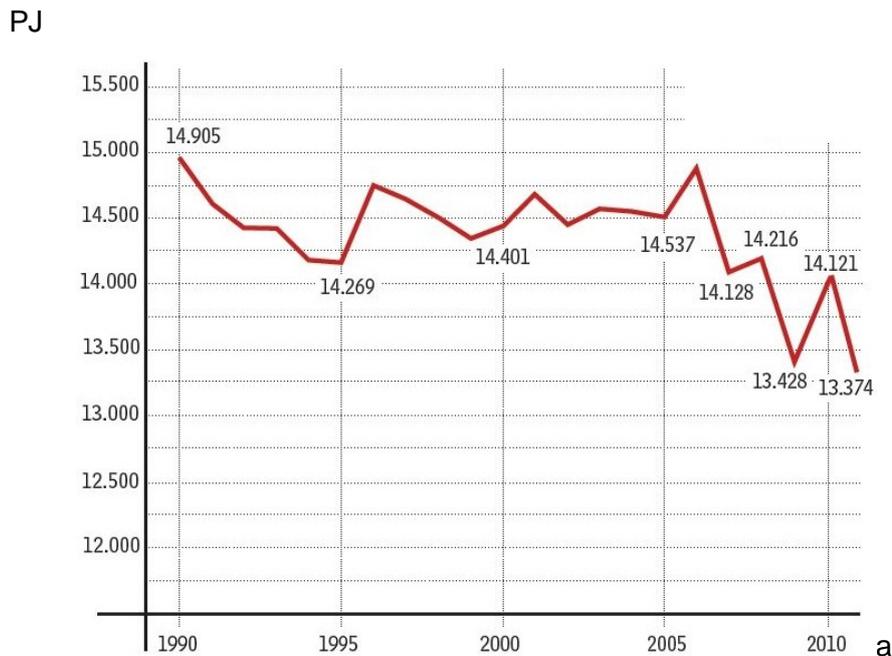


Abbildung 1: Entwicklung des Primärenergieverbrauchs in Deutschland 1990-2011 in Peta Joule [PJ] gegen die Zeit in Jahren [a]; Stand: Februar 2012; Quelle: Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V. (AGEB 2012); Druckgenehmigung von Dr. H.-J. Ziesing (Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V.) vom 29.09.2012.

Der Primärenergieverbrauch in Deutschland verfolgt eine seit 1990 im Trend rückläufige Tendenz (Abbildung 1). 2009 sank Verbrauch infolge der Konjunkturkrise nach Einschätzung der AGEB auf den niedrigsten Stand seit Anfang der 1970er Jahre. Der Verbrauch erholte sich 2010 laut der Pressemitteilung der AGEB im Februar 2012 aufgrund des Konjunkturaufschwungs und der kälteren Witterung. Im vergangenen Jahr 2011 wurde der Verbrauch des Jahres 2009

hauptsächlich aufgrund warmer Witterungsbedingungen und aufgrund des hohen Preisniveaus unterschritten.

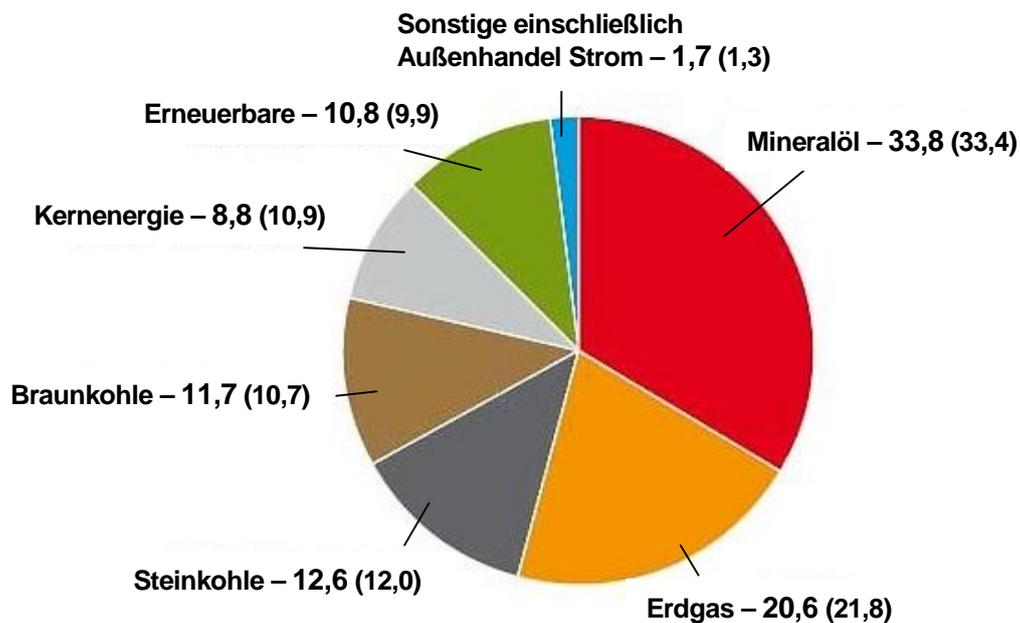


Abbildung 2: Energiemix 2011 mit leichten Verschiebungen, Struktur des Primärenergieverbrauchs in Deutschland, Anteile in Prozent (Vorjahr in Klammern), gesamt 13374 PJ oder 456,4 Mio. t Steinkohleeinheiten (SKE); Quelle nach: AG Energiebilanzen e. V. (AGEB); Druckgenehmigung von Dr. H.-J. Ziesing (Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V.) vom 29.09.2012.

In Abbildung 2 wird ein Rückgang der Kernenergie im Primärenergie-Mix im Vergleich zum Vorjahr gezeigt (AGEB 2012). Nach der AGEB wurde der gesunkene Anteil der Kernenergie zum einen durch Braunkohle und zum anderen durch Erneuerbare Energien aufgefangen. Die Erneuerbaren Energien steuerten einen erstmals zweistelligen Beitrag von 10,9 % zum Primärenergieverbrauch bei. Für das Jahr 2011 veröffentlichte das BMU im März 2012 Statistiken zum Anteil Erneuerbarer Energien am Endenergieverbrauch in Deutschland im Jahr 2011, welche in den folgenden Abbildungen graphisch mit Erläuterungen dargestellt sind.

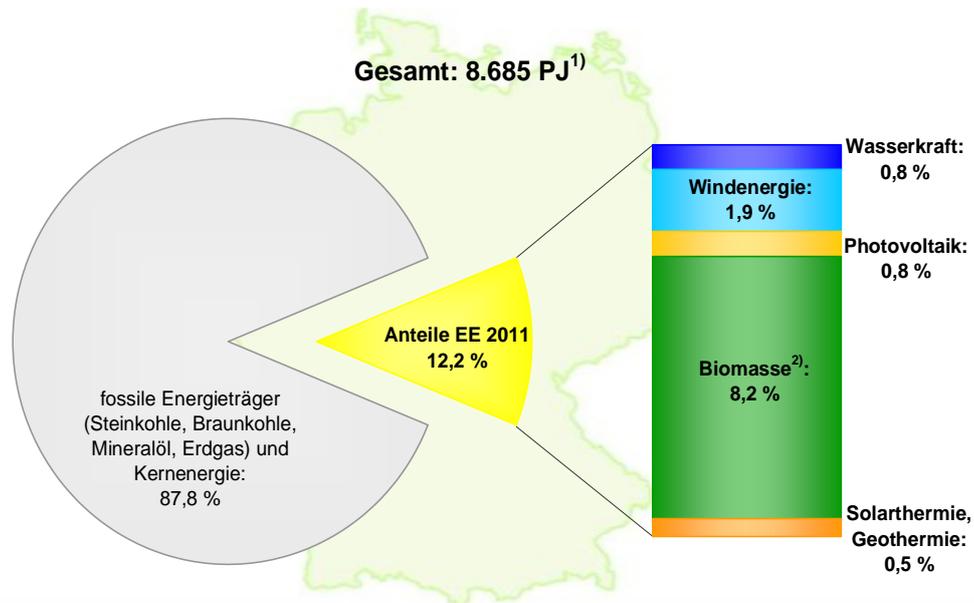


Abbildung 3: Anteil Erneuerbarer Energien am Endenergieverbrauch in Deutschland im Jahr 2011; ¹⁾ Quelle: *Energy Environment Forecast Analysis (EEFA) GmbH & Co KG*, PJ = Petajoule; ²⁾ Feste und flüssige Biomasse, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls, Biokraftstoffe; Quelle: BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat) und ZSW, unter Verwendung von Angaben der Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e.V. (AGEB); EE: Erneuerbare Energien; 1 PJ = 10¹⁵ Joule; Abweichungen in den Summen durch Rundungen; Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Der Anteil der Erneuerbaren Energien am Endenergieverbrauch lag 2011 mit 12,2 % (Abbildung 3) höher als der Primärenergieverbrauch 2011 in Deutschland (Abbildung 2) aufgrund der Einberechnung der Sekundärenergie. Den größten Anteil des Endenergieverbrauchs aus Erneuerbaren Energien nahm die Biomasse mit 8,2 % ein. Der Endenergieverbrauch setzt sich aus der auf den gesamten Bruttostromverbrauch bezogenen Stromerzeugung, der gesamten Wärmebereitstellung und dem gesamten Kraftstoffverbrauch ohne Flugbenzin zusammen. Nach den Angaben des BMU betrug der Anteil Erneuerbarer Energien im Jahr 2011 an der Stromerzeugung 20,0 %, wovon 6,1 % aus Biomasse entstand. An der Wärmebereitstellung 2011 waren die Erneuerbaren Energien zu 10,4 % (9,5 % aus Biomasse) beteiligt und Biokraftstoffe wurden zu 5,6 % des gesamten Kraftstoffverbrauchs verwendet. Die Erneuerbaren Energieträger Wind, Wasser und Photovoltaik wurden ausschließlich zur Stromverwertung und Geo- sowie Solarthermie ausnahmslos zur Wärmeerzeugung eingesetzt. Biogene Kraftstoffe (Biodiesel, Bioethanol und Pflanzenöl) wurden 2011 nach der Bilanz des BMU beim Kraftstoffverbrauch verwendet.

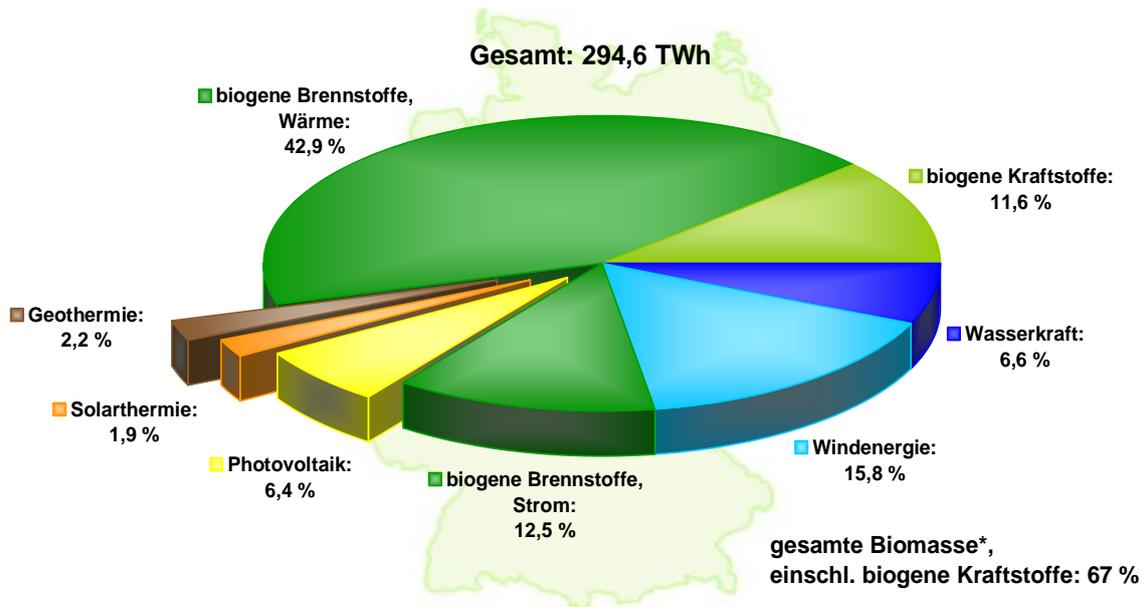


Abbildung 4: Struktur der Endenergiebereitstellung aus Erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011; * Feste und flüssige Biomasse, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls; 1 TWh = 1 Mrd. kWh; Abweichungen in den Summen durch Rundungen; Quelle BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE-Stat); Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Eine detailliertere Aufschlüsselung der Zusammensetzung der Endenergiebereitstellung aus Erneuerbaren Energien zeigt Abbildung 4. Hier wird deutlich, dass biogene Brennstoffe sowohl zur Herstellung von Strom als auch für Wärme mit insgesamt 55,4 % im Jahre 2011 verwendet wurden. Biomasse setzt sich aus Biogas, biogenen Festbrennstoffen in Haushalt, Industrie und aus Heiz- beziehungsweise Heizkraftwerken, biogene flüssige Brennstoffe, der biogene Anteil des Abfalls, Klärgas und Deponiegas zusammen und wird bei der Verstromung und der Generierung von Wärme in unterschiedlich verteilten Zusammensetzungen verwendet.

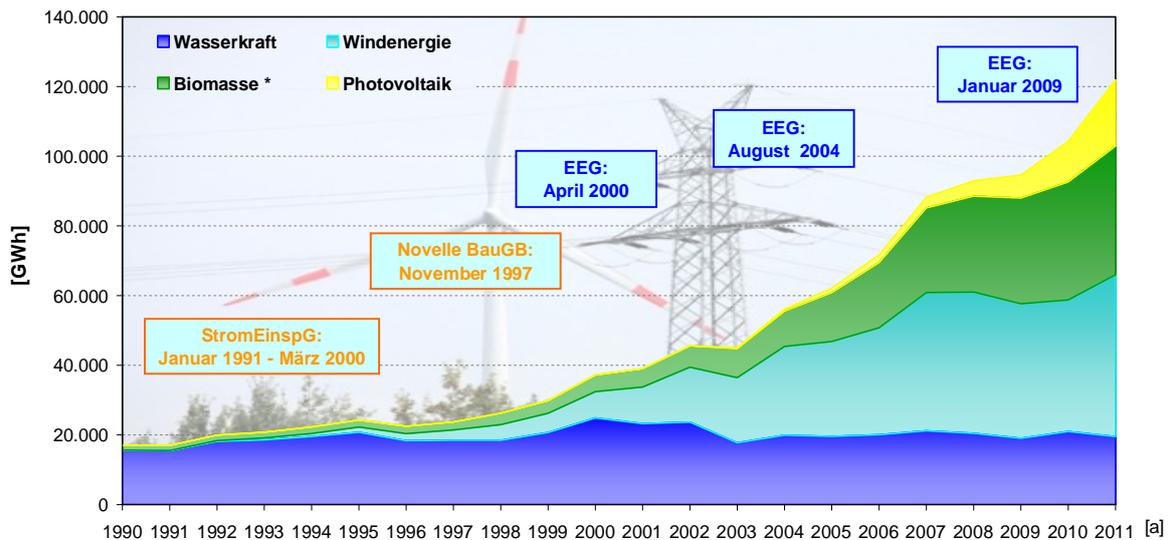


Abbildung 5: Beitrag der Erneuerbaren Energien zur Strombereitstellung in den Jahren 1990-2010 [a] in Deutschland; * Feste und flüssige Brennstoffe, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls 1 GWh = 1 Mio. kWh; Aufgrund geringer Strommengen ist die Tiefengeothermie nicht dargestellt; StromEinspG = Stromeinspeisungsgesetz; BauGB = Baugesetzbuch; EEG = Erneuerbare-Energien-Gesetz; Quelle: BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE-Stat); Hintergrundbild: BMU / Christoph Edelhoff; Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Abbildung 5 stellt dar, dass die Strombereitstellung aus Erneuerbaren Energien stetig steigt. Sobald eine Gesetzesänderung in Kraft getreten ist, erfuhr der Beitrag an Erneuerbaren Energien einen Anstieg. Besonders seit der Einführung des Erneuerbaren Energien Gesetzes (EEG, siehe Kapitel 1.1) reagierte der Energiemarkt wiederholt mit sprunghaften Anstiegen der einen oder anderen Erneuerbaren Energie auf Novellierungen des EEG. Wasserkraft stieg dabei nicht an, da die natürlichen Vorkommen bereits ausgenutzt sind und keine weitere Steigerung zulassen.

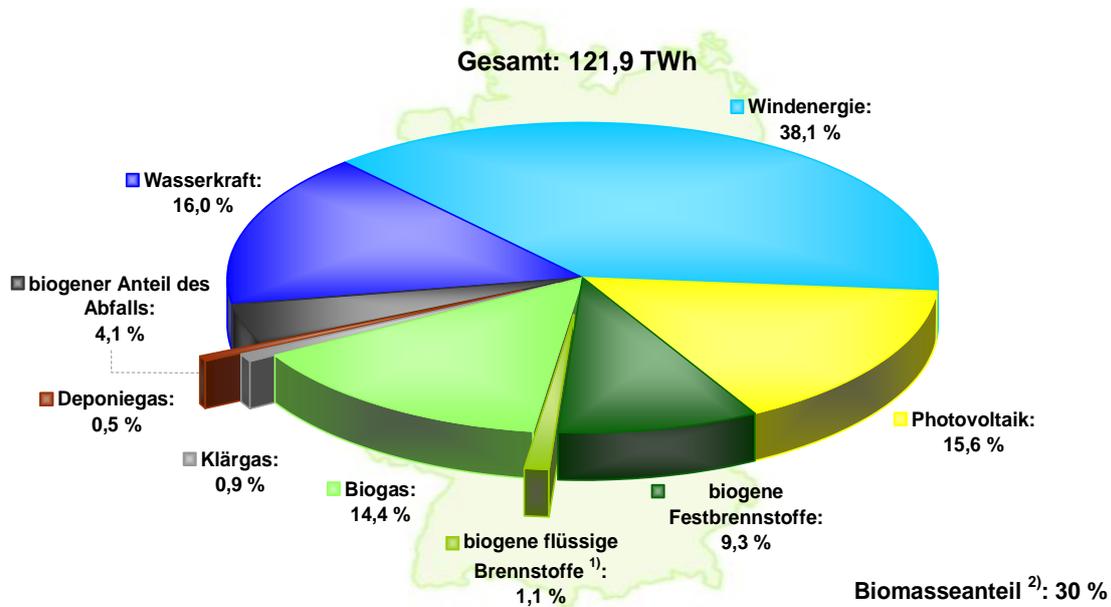


Abbildung 6: Struktur der Strombereitstellung aus Erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011; ¹⁾ inklusive Pflanzenöl; ²⁾ Feste und flüssige Biomasse, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls; aufgrund geringer Strommengen ist die Tiefengeothermie nicht dargestellt; 1 TWh = 1 Mrd. kWh; Abweichungen in den Summen durch Rundungen; Quelle BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE-Stat); Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Abbildung 6 zeigt eine genauere Darstellung der Strombereitstellung aus Erneuerbaren Energien. Nach der Windenergie und der Wasserkraft wurde die verstromte Biomasse (30 %) mit fast der Hälfte von Biogas mit 14,4 % angeführt. Dem Biogas folgten nach Anteilen geordnet biogene Festbrennstoffe, der biogener Anteil des Abfalls, biogene flüssige Brennstoffe, Klärgas und Deponiegas.

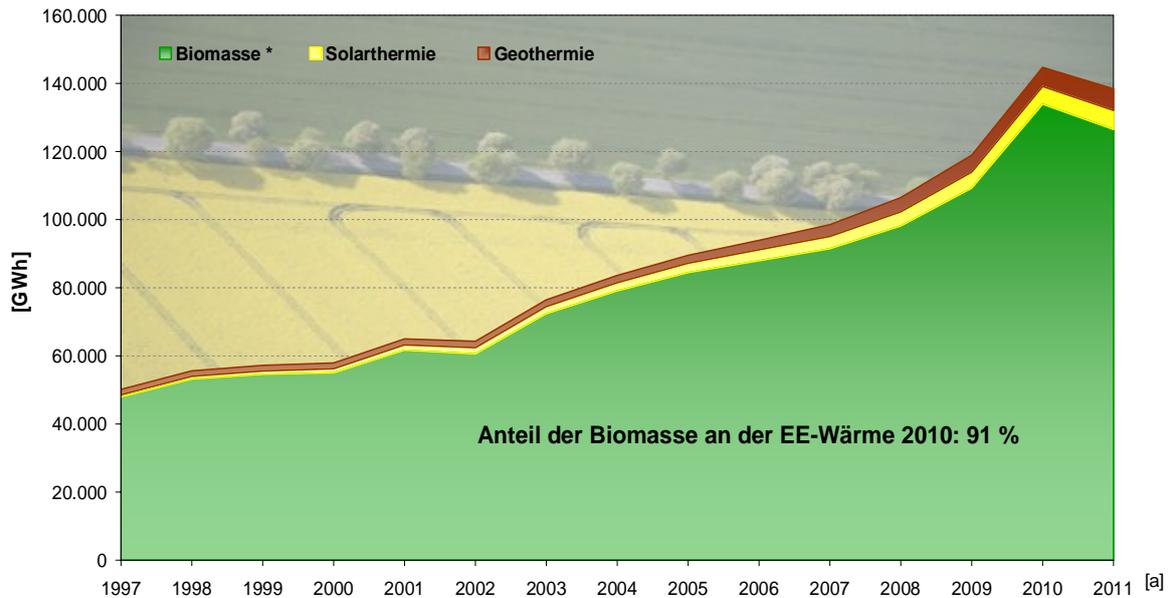


Abbildung 7: Wärmebereitstellung in Deutschland in den Jahren 1997 bis 2011; * Feste und flüssige Brennstoffe, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls 1 GWh = 1 Mio. kWh; EE = Erneuerbare Energien; Quelle: BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE-Stat); Hintergrundbild: BMU / Brigitte Hiss; Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Die Wärmeerzeugung unterliegt witterungsbedingten Schwankungen, da in milderer Wintern weniger geheizt wurde, wie es 2011 der Fall war. Wie bereits unter Abbildung 4 erwähnt, wurde im Jahr 2011 ein großer Teil der endverbrauchten Wärme aus Erneuerbaren Energien mit Biomasse (91 %) generiert (Abbildung 7). Die Wärmeerzeugung aus Biogas stieg im Vergleich zum Vorjahr neben der Geo- und Solarthermie.

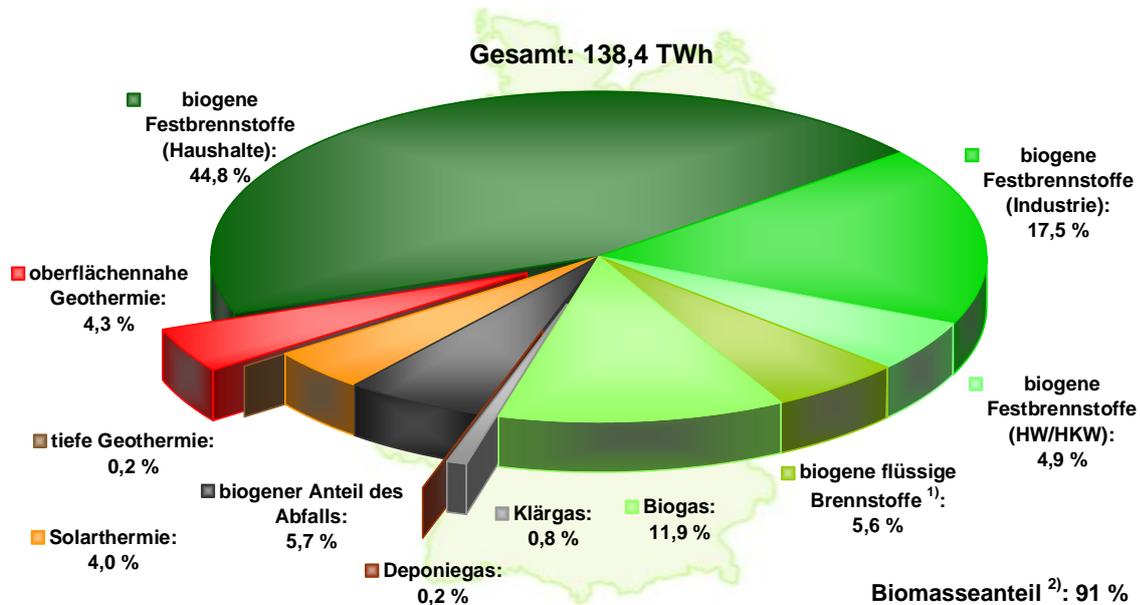


Abbildung 8: Struktur der Wärmebereitstellung aus Erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011; ¹⁾ Inklusiv Pflanzenöl; ²⁾ Feste und flüssige Biomasse, Biogas, Deponie- und Klärgas, biogener Anteil des Abfalls; 1 TWh = 1 Mrd. kWh; Quelle: BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat); Abweichungen in den Summen durch Rundungen; Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Der Biomasseanteil der Wärmebereitstellung 2011 aus Erneuerbaren Energien betrug 91 %. Neben Holzsplittern wurden nach Angaben des BMU zunehmend Holzpellets zur Wärmeerzeugung in Haushalten verwendet. Außer Biomasse wurden oberflächennahe sowie tiefe Geothermie und Solarthermie zur Wärmebereitstellung verwendet.

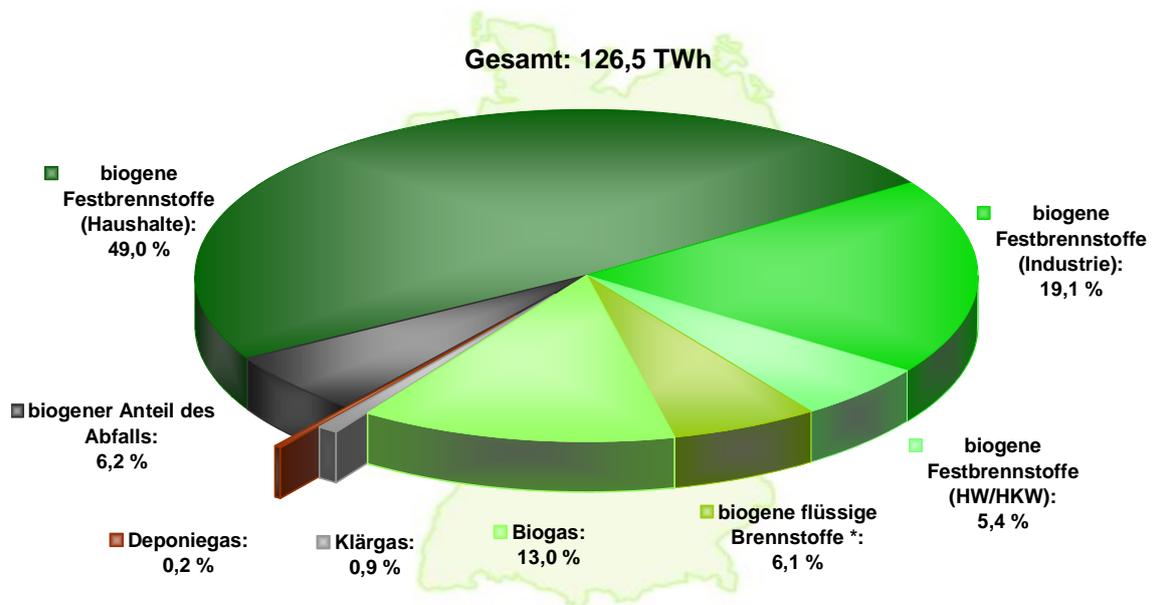


Abbildung 9: Struktur der Wärmebereitstellung aus Biomasse in Deutschland im Jahr 2011; * Inklusive Pflanzenöl; HW/HKW = Heizwerke/Heizkraftwerke; Quelle: BMU-KI III 1 nach Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat); 1 TWh = 1 Mrd. kWh; Abweichungen in den Summen durch Rundungen; Stand: März 2012; Angaben vorläufig; Druckzustimmung von D. Böhme, BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.

Der Hauptbestandteil der zur Wärmebereitstellungen verwendeten Biomasse waren 2011 die biogenen Festbrennstoffe in Haushalt, Industrie und aus Heiz- beziehungsweise Heizkraftwerken (Abbildung 9). Auch bei der Bereitstellung für Wärme hatte Biogas einen Anteil von 13,0 %.

1.3 Primärenergieverbrauch und Energie-Mix in Deutschland bis 2020

Aufgrund einer Umweltkatastrophe in Japan ereigneten sich Unfälle bei den dortigen Atomanlagen (Fukushima I und II, Präfektur Fukushima, Japan) seit dem 11. März 2011. Die Bundesregierung reagierte mit einem Moratorium, also einer Aufschiebung der Laufzeitverlängerung der Atomkraftwerke und verfügte, die ältesten AKW vom Netz zu nehmen. Die Agentur für Erneuerbare Energien (AEE) veröffentlichte im März 2011 (AEE, 2011a, b, c) eine auf die Branchenprognose des Bundesverbandes Erneuerbarer Energie e. V. (BEE 2011) des selbigen Monats gestützt einige Zahlen zur Entwicklung des Primärenergieverbrauchs und des Energie-Mix in Deutschland unter Annahme des vollständigen Atomausstiegs Deutschlands.

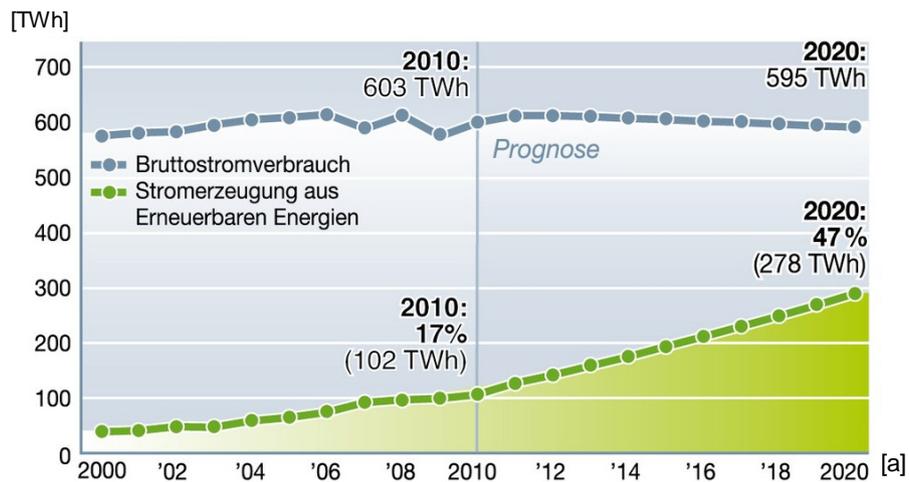


Abbildung 10: Anteil der Erneuerbaren Energien am Stromverbrauch in Deutschland bis 2020; Der Anteil Erneuerbarer Energien wächst auf 47 %; [TWh] = Terrawattstunden pro Jahr gegen [a] = Jahre; Quellen: BMU/AGEE-Stat., BMWi, BEE (Branchenprognose 2020), Berechnungen der AEE, Stand:03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirrmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Der Anteil der Erneuerbaren Energien wird laut der AEE von 17 % 2010 bis auf 47 % 2020 wachsen, wobei der Bruttostromverbrauch stagnieren wird (AEE 2011a).

Der Ausbau der Erneuerbaren Energien bis 2020 berechnete die AEE ebenfalls (Abbildung 11).

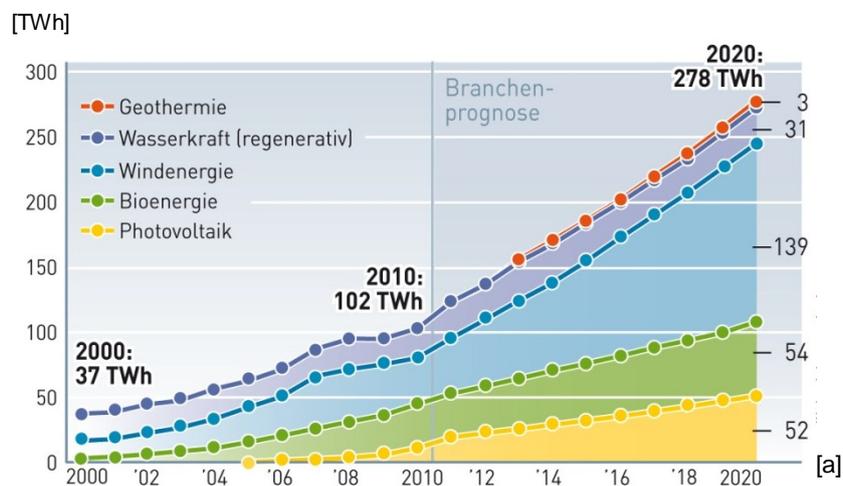


Abbildung 11: Stromerzeugung aus Erneuerbaren Energien in Deutschland bis 2020; [TWh] = Terrawattstunden gegen [a] = Jahre; Quellen: BMU/AGEE-Stat, BEE, Stand 03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirrmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Den größten Beitrag zur Stromerzeugung in Deutschland im Jahre 2020 wird die Windenergie leisten, nach der Prognose der AEE (2011b). Die Energie aus Biomasse erföhre einen weiteren Ausbau und beträgt 2020 in Folge dessen 54 TWh in Deutschland. Ebenfalls kann die

Photovoltaik ausgebaut werden. Energie aus Wasserkraft ist zum heutigen Zeitpunkt schon ausgeschöpft. Daher kann die Energiegewinnung nicht weiter erhöht werden.

Eine andere Aufführung der AEE zeigt die Leistung, die aus Erneuerbaren Energien bis 2020 gewonnen werden kann.



Abbildung 12: Installierte Leistung zur Stromerzeugung aus Erneuerbaren Energien in Deutschland bis 2020; [GW] = Gigawatt gegen [a] = Jahre; Quellen: BMU/AGEE-Stat., BEE, Stand 03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirrmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Die meiste Leistung bringt die Windenergie, dicht gefolgt von der Photovoltaik, welche den größten Leistungsausbau erfahren wird (Abbildung 12). Bioenergie wird mit leichtem Leistungsgewinn 2020 auf 10,8 GW geschätzt.

Der Strom-Mix in Deutschland wird 2020 von der AEE (2011c) wie folgt prognostiziert.

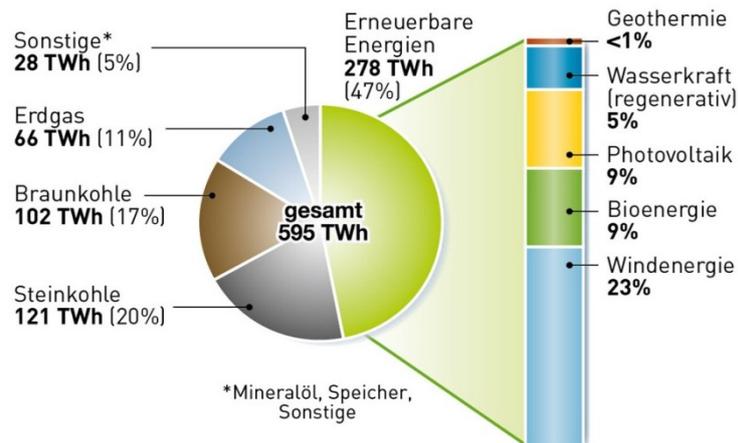


Abbildung 13: Der Strom-Mix im Jahr 2020; Erneuerbare Energien stellen 47 % der Versorgung; TWh = Terrawattstunden; Quelle: Berechnungen der AEE auf Basis der Branchenprognose, BEE, Stand: 03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Der Vergleich des Strom-Mixes 2020 in Abbildung 13 mit dem Anteil der Erneuerbaren Energien am Stromverbrauch in Deutschland bis 2020 (Abbildung 10) zeigt deutlich, dass die Erneuerbaren Energien 2020 den gesamten Strom der Kernenergie (-22,4 %) ablösen und fast den gesamten Verlust der Braunkohle (-6,7 %) und des Erdgases (-2,8 %) kompensieren können. Nur einen geringen Prozentsatz (1,3 %) wird die Steinkohle bei einer solchen Entwicklung übernehmen.

Auch der Kraftwerkpark kann sich nach der AEE (2011c) durch die Umstrukturierung des Energie-Mixes bis 2020 in Deutschland ändern.

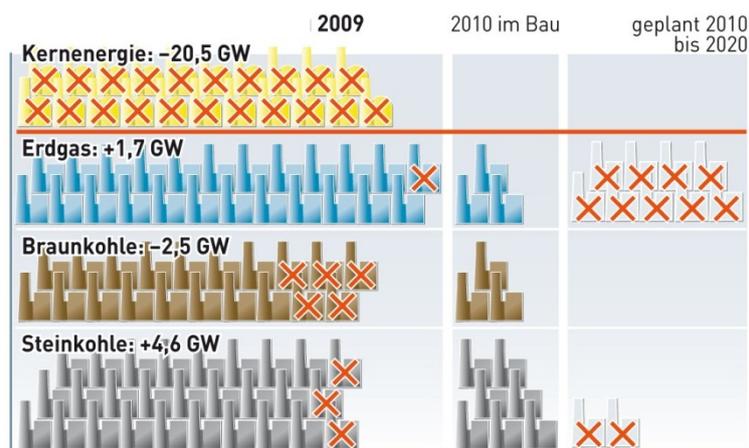


Abbildung 14: Prognostizierter Kraftwerkpark 2020 in Deutschland; 2020 werden weniger konventionelle Kraftwerke benötigt als geplant; Bestand 2020 im Vergleich zu 2009, x (rot) = Prognose abgeschalteter Werke (2009) und Prognose verworfener Bauplanungen (bis 2020); Quelle: BEE, BNetzA 2010, Stand 03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Abbildung 14 zeigt die Annahme der AEE (2011c), dass alle Atomkraftwerke und wenige Erdgas-, Braunkohle- und Steinkohlekraftwerke geschlossen werden und keine neuen Erdgas- und Steinkohlekraftwerke gebaut werden, die bis 2020 geplant waren. Somit übernehmen die Erneuerbaren Energien 16,7 GW Leistung. Diese Annahme deckt sich mit den Berechnungen des BEE, dass die produzierte Strommenge ohne Kernenergie und mit geringerer Energiegewinnung aus Erdgas und Braunkohle im Jahr 2020 den Primärverbrauch deckt.

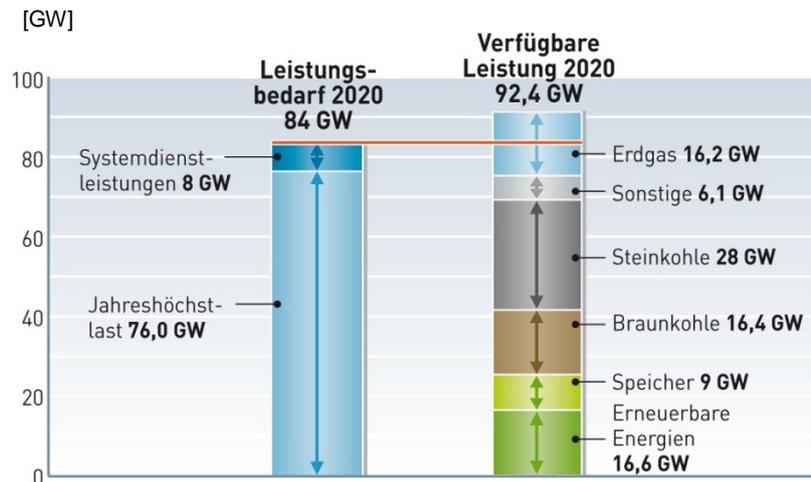


Abbildung 15: Leistungsbilanz im Jahr 2020: Die Jahreshöchstlast ist gedeckt; Deutschland verfügt über 8,4 Gigawatt mehr gesicherte Leistung als benötigt; [GW] = Gigawatt; Quelle: Berechnung der AEE auf Basis der Branchenprognose 2020, BEE, Stand 03/2011; Druckgenehmigung von S. Kirrmann, Agentur für Erneuerbaren Energien vom 15.10.2012.

Nach den Berechnungen der AEE (2011b) wird Deutschland mit der Erhöhung der Energie aus Erneuerbaren Rohstoffen 2020 über 8,4 GW mehr verfügen, als benötigt werden wird (Abbildung 15).

1.4 Potenziale der Biomassennutzung in Deutschland

1.4.1 Flächenverteilung in Deutschland

Deutschland hat eine Fläche von 357050 km². Die Aufteilung der Nutzung wird in Tabelle 1 prozentual erläutert.

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Fläche Deutschlands

Landwirtschaftlich genutzte Flächen	53 % ¹
Wald	29,8 % ⁴
Nationalparke und Biosphärenreservate	0,54 % ^{2b} 3,7 % ^{2a}
Siedlungen	12,3 % ³
Sonstige Flächen	4,7 % ³

¹ Statistisches Bundesamt 2006; ^{2a} BfN 2011, ^{2b} BfN 2012, ³ Statistisches Bundesamt 2002, ⁴ Statistisches Bundesamt 2005, ⁵ Moss *et al.* 1996.

Der Anteil der geschützten Landbiotope an der Gesamtfläche beträgt 8,3 %, weil ein Teil der Naturschutzgebiete sich mit Teilen der Biosphärenreservate und Nationalparke überschneidet (Moss *et al.* 1996).

Die Hälfte der prozentualen Fläche Deutschlands wird landwirtschaftlich genutzt. Durch die in Kapitel 1.1 beschriebene Einführung von Gesetzen zur Erweiterung der Energiegewinnung aus erneuerbaren Rohstoffen, gingen Agrarwirte dazu über, in Deutschland vermehrt Nutzpflanzen anzubauen. So entstand eine Debatte über eine Flächennutzungskonkurrenz zwischen Futter- und Nahrungsmittelpflanzen und Energiepflanzen.

1.4.2 Debatte um die Flächennutzungskonkurrenz zwischen Nahrungs- und Energiepflanzen

Die Flächenstilllegungsregelung (Henning 2012) wurde von der EU 1992 beschlossen, um die Preise auf dem Agrarmarkt von politischer Seite stabil halten zu können. Zum einen durften auf stillgelegten Flächen Energiepflanzen angebaut werden, was die Landwirte in Deutschland aufgrund des EEG 2004 (Kapitel 1.1) stark nutzten. Zum anderen führten die Subventionen der Flächenstilllegungsregelung und andere Gründe dazu, dass Landwirte den Anbau einjähriger Pflanzen bevorzugten, die den Einsatz von viel Pestiziden und Dünger erforderlich machen. Das ökologisch nachhaltige Potenzial einjähriger Arten liegt etwa 30 % unter dem wirtschaftlichen Potenzial. Außerdem sind mehrjährige Pflanzen vorzuziehen, da sie geringere Düngermengen brauchen, ohne Pestizideinsatz auskommen und bei geringer Bodenbearbeitung höhere Energieerträge liefern als einjährige Pflanzen (Börjesson *et al.* 1997).

Im Jahr 2007 stiegen die Preise für Agrarprodukte aufgrund von schlechten Ernten, zu geringen Vorräten und durch den Ausbau der Bioethanolproduktion weltweit (OECD-FAO 2007). Daher wurden Stimmen laut, die unter anderem die Abschaffung des „NawaRo-Bonus“ forderten aufgrund einer drohenden Flächennutzungskonkurrenz zwischen dem Anbau von Energiepflanzen und der Futter- und Nahrungsmittelproduktion in Deutschland (Breuer 2007). Der Wissenschaftliche Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen (WBGU)

schrrieb 2008 in ihrem Bericht „Zukunftsfähige Bioenergie und nachhaltige Landnutzung“, dass Biogas, Rohgas und Biomethan weiter eingesetzt werden sollen. Vorzugsweise sollen Biogas, Rohgas und Biomethan in allen Regionen eingeführt werden, die einen hohen Kohleanteil in der Stromerzeugung aufweisen, so der WBGU (2008). Weiter empfiehlt der WBGU, dass der Einsatz biogener Abfälle und Reststoffe gefördert werden soll, so dass diese gegenüber der Stromerzeugung aus Energiepflanzen bevorzugt werden, um einer drohenden Flächennutzungskonkurrenz zu entgehen. Wenn die internationale Verbreitung von Kraft-Wärme-Kopplung sowie Gas- und Dampfkraftwerken durch geeignete Klima- und energiepolitische Rahmenbedingungen sowie geeignete Förderansätze deutlich zunimmt, ließen sich Bioenergienutzungspfade mit hohen Effizienzgraden und somit global spürbaren Emissionseinsparungen erzielen, so der WBGU. Für das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie fertigte 2008 das Wuppertal Institut für Klima, Umwelt, Energie GmbH (WI) und das Rheinisch-Westfälische Institut für Wirtschaftsforschung (RWI Essen) eine Studie an, die die Bedenken der Flächennutzungskonkurrenz aufgrund der Mehranpflanzung von Energiepflanzen besonders für Biokraftstoffe bestätigte. Die obligatorische Flächenstilllegung wurde 2007 in der EU zunächst für ein Jahr ausgesetzt und ab 2009 abgeschafft (EU 2008). Das Bundesministerium reagierte 2009 mit der Neuerung des EEG (BMU 2008a). Um den seit 2007 anhaltend hohen Preisen von Agrarprodukten entgegenzuwirken (Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit 2008b), wurde vom Bundesministerium der Bonus für Strom aus nachwachsende Rohstoffen erhöht und eine Anlage 2 erzeugt, in der die Ausschließlichkeit der nachwachsenden Rohstoffe gestrichen wurde (BMU 2008b). Das Bundesministerium erlaubte den Biogasanlagenbetreibern in Anlage 2 Bonus für Strom aus nachwachsenden Rohstoffen, einige nicht den nachwachsenden Rohstoffen zugehörige Substrate in Biogasanlagen einzusetzen (siehe Kapitel 1.1). Der „Gülle-Bonus“ wurde eingeführt, um die Direktausbringung unbehandelter Gülle auf Felder zu reduzieren (Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit 2008a, b). Durch die Einführung eines Landschaftspflege-Bonus sollte nach dem Änderungsantrag der Fraktionen CDU/CSU und der SPD des Ausschusses für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit 2008c) der Flächennutzungskonkurrenz entgegengewirkt werden.

2011 veröffentlichte das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Referat Öffentlichkeitsarbeit, Internet (BMELV 2011) eine Broschüre, die mit einigen Daten und Fakten über den Anbau von Nutzpflanzen in Deutschland im Jahre 2009 informierte. 2012 veröffentlichte die AEE die Daten von 2011.

Tabelle 2: Belegung der landwirtschaftlich genutzten Flächen in Deutschland 2009 (BMELV 2011) und 2011 (AEE 2012)

Verwendung	Anteil in %		Anteil in Mio. ha	
	2009 ¹	2011 ²	2009 ¹	2011 ²
Futtermittel	60,3	57	10,2	9,6
Nahrungsmittel	26,3	28	4,4	4,6
Bioenergie	10,2	12	1,7	2
Stoffliche Nutzung	1,6	2	0,3	0,3
Brachflächen	1,6	2	0,3	0,2
Gesamtfläche	100	101	16,9	16,7

¹ Quelle: BMELV, FNR, eigene Berechnungen des BMELV (2011); ² Quelle: BMELV, FNR, eigene Berechnungen der AEE (2012), Prozentangaben gerundet

Sowohl der Anbau von Nahrungsmitteln als auch von Energiepflanzen sind 2011 im Vergleich zu 2009 gestiegen, wobei der Anbau an Futtermitteln gesunken ist (Tabelle 2).

Zuletzt wurde das EEG im Dezember 2011 (BMU 2011, Kapitel 1.1) mit der Intension geändert, dem Maisanbau und der Flächennutzungskonkurrenz entgegenzuwirken (BMU 2012).

1.5 Energie aus Biomasse

Biomasse kann energetisch zum einen „traditionell“ und zum anderen „modern“ genutzt werden. Der Wissenschaftliche Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen (WBGU) schreibt 2003 in seinem Bericht „Welt im Wandel: Energiewende zur Nachhaltigkeit“, dass nach Angaben der Weltbank zu diesem Zeitpunkt der Anteil traditioneller Biomassenutzung 7,2 % des globalen Primärenergieeinsatzes betrug. Als traditionelle Biomassenutzung bezeichnet der WBGU (2003) unter anderem den Einsatz von Brennholz, Holzkohle und Dung zum Kochen und Heizen in privaten Haushalten, was hauptsächlich in Entwicklungsländern angewendet wird. Die Verwendung traditioneller Biomasse hat einen schlechten Ruf als veraltete Energiequelle aufgrund ihrer Nachteile für Umwelt und Gesundheit.

Unter energetisch nutzbarer moderner Biomasse versteht der WBGU folgende nachwachsende Komponenten:

- zum Zweck der Energiegewinnung angebaute ein- oder mehrjährige Energiepflanzen
- landwirtschaftliche Reststoffe (z. B. Stroh, Dung, Reisspelzen), soweit ohne Nährstoffverluste der Ackerböden verwertbar
- Waldrest- und Schwachholz, soweit es nicht aus ökologischen Gründen im Wald verbleiben muss oder aus ökonomischen Gründen anderweitig verwendet wird
- Industrierestholz und Gebrauchtholz (ebenfalls unter ökonomischen Restriktionen)

Die energetische Nutzung von Biomasse ist von den Eigenschaften der eingesetzten Bioenergieträger abhängig. Verschiedene Technologien zur „modernen“ Erzeugung von Wärme beziehungsweise Strom werden weiter entwickelt. Eine Technologie ist die Stromerzeugung durch Vergasung fester Biomasse sowie eine Kopplung mit der Wasserstoffwirtschaft, so der WBGU 2003. Landwirtschaftliche Biogasanlagen (Kapitel 1.5.1) zählen zu den Technologien, in denen feste aber auch flüssige Biomasse vergast wird und mit dem gebildeten Biogas Wärme und Strom erzeugt werden kann (Kapitel 1.5.1).

1.5.1 landwirtschaftliche Biogasanlagen

Die ersten landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurden nach dem zweiten Weltkrieg in Deutschland gebaut (de Graaf und Fendler 2010). Ab 1950 verbesserte sich jedoch die Versorgung mit Kohle und Öl stetig, welche wesentlich günstiger war, als die Produktion von Energie durch Vergärung von Biomasse. So wurde der Betrieb der Biogasanlagen (50-70 Anlagen in BRD und DDR) wieder eingestellt. Ab der ersten Ölpreiskrise in den 1970er Jahren lebte der Bau von landwirtschaftlichen Biogasanlagen erneut auf. Bis in die 1980er wurden mehrere Hofanlagen mit geringer Energieeffizienz und auf niedrigem technischem Niveau hauptsächlich auf viehwirtschaftlichen Höfen betrieben, bevor erste Forschungsinstitute auf den Forschungsbedarf aufmerksam wurden. Übermäßiges Ausbringen von Gülle ließ die Gewässer unter anderem durch Nitratbelastungen verschmutzen. Daher wurde ab Mitte der 1980er Jahre die Entwicklung der Vergärung von Gülleabfällen verstärkt. Erst 1990 erlangte der Betrieb von Biogasanlagen einen bedeutenden Stellenwert in der Energiegewinnung aus alternativen Ressourcen mit der Einführung des Stromeinspeisungsgesetzes (StrEG, BMU 1990, Kapitel 1.1).

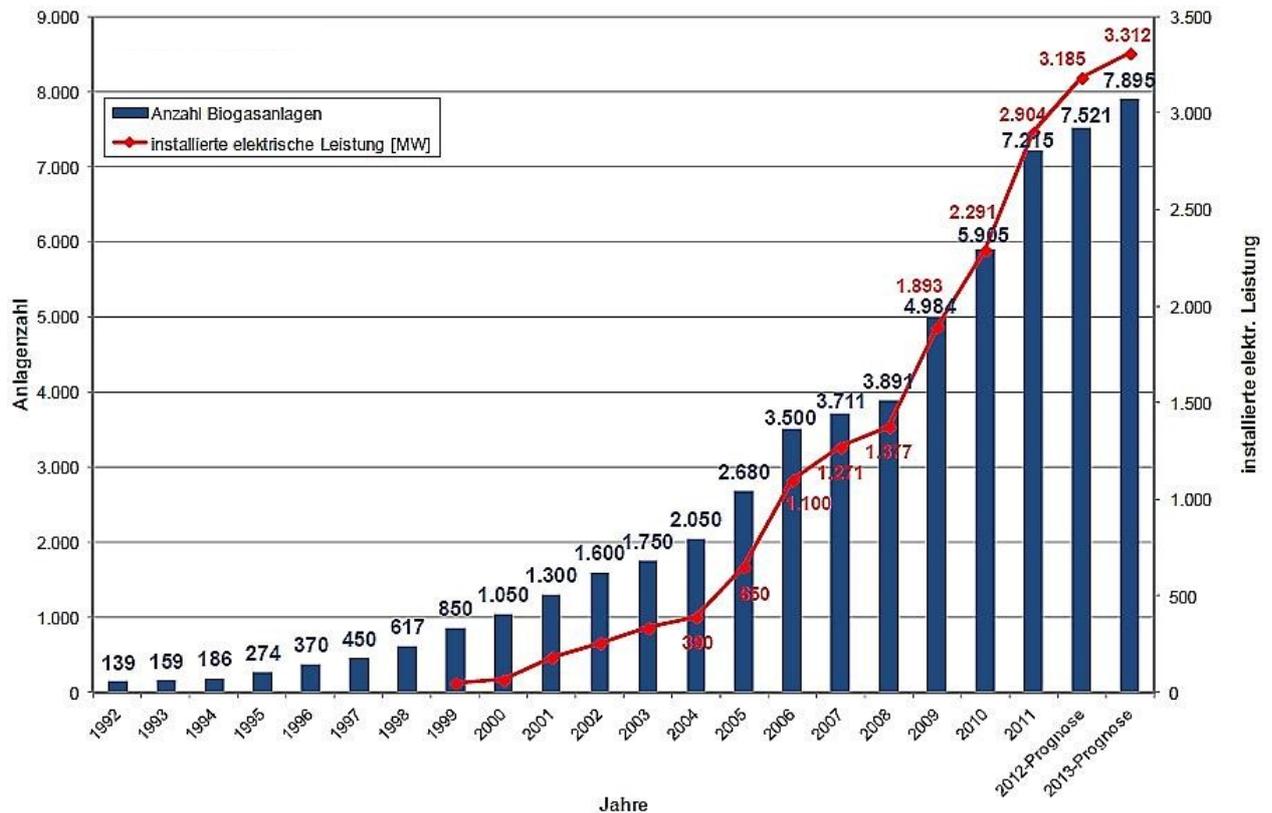


Abbildung 16: Entwicklung der Anzahl Biogasanlagen und der gesamten installierten elektrischen Leistung in Megawatt [MW]; ©Fachverband Biogas e. V., Stand: 06/2013; Druckerlaubnis von Dr. S. Rauh, Referatsleitung Landwirtschaft/ Referatsleitung Mitgliederservice des Fachverband Biogas e. V. vom 24.08.2012.

Seit 1992 stieg die Anzahl an Biogasanlagen in Deutschland kontinuierlich an (Abbildung 16), nachdem 1991 das Stromeinspeisungsgesetz (StrEG, BMU 1990, Kapitel 1.1) in Kraft getreten war. Die Einführung des EEG im Jahr 2000 (BMU 2000, Kapitel 1.1) erhöhte den jährlichen Zuwachs an Biogasanlagen im Verhältnis zu den Vorjahren. Mit der Novellierung des EEG 2004 (BMU 2004, Kapitel 1.1) wurde die Zuwachsrate erneut und seit der Erlassung des neuen EEG 2009 (BMU 2008a, b, Kapitel 1.1) wuchs die Zahl der Biogasanlagen jährlich um etwa 1000 Anlagen. Im Jahr 2011 betrug die Anzahl an Biogasanlagen in Rheinland-Pfalz 114 Anlagen, bei einer installierten elektrischen Leistung von 45 MW (Fachverband Biogas e. V. 2012). Für 2012 und 2013 wird ein weiterer Anstieg der Anzahl an Biogasanlagen in Deutschland mit im Vergleich zu den Vorjahren geringerer Zuwachsrate prognostiziert (Abbildung 16).

In dieser Arbeit wurde mit Proben aus landwirtschaftliche NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) gearbeitet.

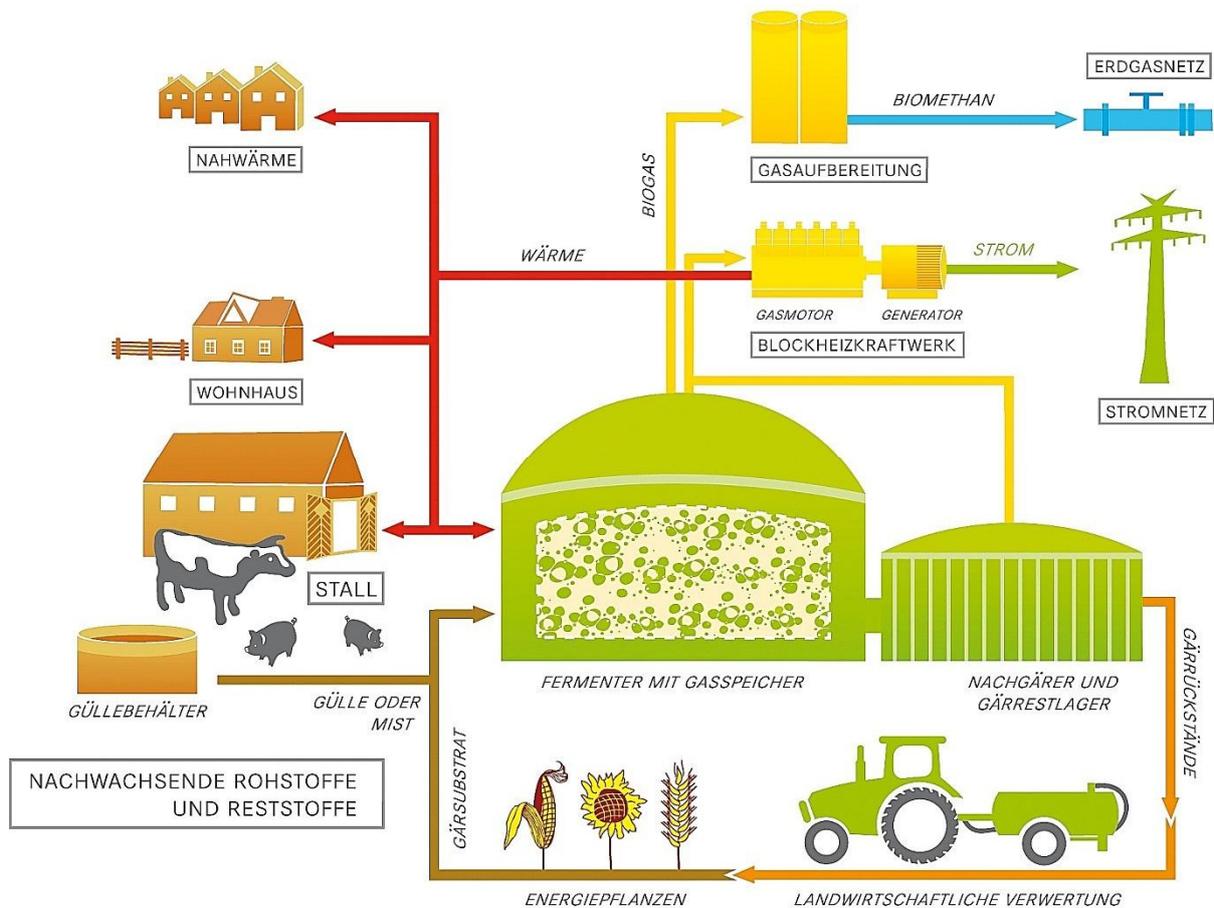


Abbildung 17: Schema einer landwirtschaftlichen Biogasanlage; Quelle: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR 2012a); Druckerlaubnis von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) vom 27.08.2012.

Als Gärsubstrate können in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage nachwachsende Rohstoffe wie Energiepflanzen und Reststoffe (Kapitel 1.5.1.2) mit Gülle beziehungsweise Mist in einem Fermenter mit Gasspeicher zur Biogasherstellung verwendet werden (Abbildung 17, brauner Pfeil). Gebildetes Biogas wird aus dem Gasspeicher abgeleitet (Gelber Pfeil). Die Gärreststoffe (vergorenes organisches Material) werden in einen Nachgärer transportiert, aus dem ebenfalls Biogas abgeleitet wird (Gelber Pfeil). Das Biogas wird entweder aufbereitet und ins Erdgasnetz eingespeist (blauer Pfeil) oder in einem Blockheizkraftwerk zu Strom umgewandelt (grüner Pfeil). Die Abwärme des Blockheizkraftwerkes kann sowohl für die Ställe, Wirtschaftsgebäude oder Wohnhäuser auf dem Hof als auch als Nahwärme genutzt werden (roter Pfeil). Die Gärreststoffe können vom Energiewirt aus einem dem Nachgärer nachgeschalteten Gärrestlager landwirtschaftlich verwertet werden (Pfeil, orange).

Drei Bereiche greifen bei der Herstellung von Biogas ineinander:

1. die Verfahrenstechnik
2. die Auswahl des organischen Materials (Inputstoffe)
3. die mikrobielle Zusammensetzung

Bei Ausfall einer dieser drei Bereiche kann kein Biogas produziert werden.

1.5.1.1 Verfahrenstechnik landwirtschaftlicher Biogasanlagen

Die Verfahrenstechnik, mit der Biogas in Biogasanlagen gebildet wird, kann mit verschiedenen Merkmalen durchgeführt werden. Im Folgenden sind einige grundlegende Merkmale aufgezählt und erläutert (Eder und Schulz 2007). Die kontinuierliche oder diskontinuierliche Beschickung eines Fermenters unterscheidet sich darin, dass das zu vergärende Substrat gleichmäßig oder in zeitlichen Abständen in den Fermenter gebracht wird, je nachdem, ob das Substrat im Durchflussverfahren oder Batchverfahren vergoren werden soll. Im Batchverfahren wird so weit gegangen, dass dem Fermenter kein neues Substrat nach einer Füllung zugegeben wird, bis alles vergoren ist, um den Fermenter komplett zu entleeren, so dass er wiederholt neu gefüllt werden kann. Weiter kann die Mischung des zu vergärenden Substrats variieren zwischen vollaufgemischt, längs durchströmt oder wenn es sich um Feststoff handelt Berieselung bzw. Perkolation. Die Prozessstufen können einstufig, sowie zwei- und auch mehrstufig ablaufen. Die Konsistenz des Substrats reicht von pumpfähig (Trocken Substanz (TS) -Gehalt bis 15 %) beim Nassverfahren bis breiig und stapelbar (TS-Gehalt ab 25 %) im Feststoffverfahren. Die Fermentertemperatur kann sowohl mesophil (30 °C bis 45 °C) als auch thermophil (45 - 55 °C) gewählt werden. Die Bauformen der Fermenter sind entweder liegend, also längs durchströmt oder stehend und voll durchgemischt möglich. Als Baustoffe sind Beton, Stahl, Stahlblechwickel und Plattenbauweise einsetzbar. Die Fermenter Bauweisen der NawaRo-Biogasanlagen sind in Tabelle 18 aufgeführt, die Proben für diese Dissertation zur Verfügung gestellt haben. Die Entwicklungen der Verfahrenstechnik sind weit fortgeschritten. Es wird weiterhin an einer Optimierung gearbeitet.

Der Energiewirt muss nach dem Bau einer Biogasanlage aus verschiedenen Inputstoffen die für die Bauweise seiner Anlage optimale Zusammenstellung wählen, um den größten Methanertrag zu erhalten.

1.5.1.2 Inputstoffe zur Biogasherstellung

In Biogasanlagen wird organisches Material zu Biogas vergoren. Zu organischen Abfällen aus der Landwirtschaft zählen Rinder- und Schweinegülle sowie Geflügelmist (Görisch und Helm 2007). Des Weiteren sind Landwirtschaftliche Abfälle aus der Produktion (z. B. Getreidestroh,

Rübenblatt oder Kartoffelkraut) zu Biogas vergärbar (Scherer *et al.* 2003). Auch agroindustrielle Abfälle (Scherer in Kämpfer und Weißenfels 2001), wie zum Beispiel Obst- und Gemüseschlempen, Obsttrester, Molke oder Ölsaatenrückstände können in einer Biogasanlage verwertet werden. Separat getrennte Bioabfälle aus privaten Haushalten eignen sich ebenfalls zur Biogasherstellung. Einen vom Abfall getrennten Bereich bilden die nachwachsenden Rohstoffe als Inputstoffe für Biogasanlagen. Als nachwachsende Rohstoffe werden, Mais, Zuckerrüben, Getreide, Sonnenblumen, Sudangras, Ackergräser, Wildpflanzen und seit kurzem die durchwachsene Silphie verwendet (FNR 2012b). Gülle zählt im Sinne des EEG (BMU 2008) zu den nachwachsenden Rohstoffen.

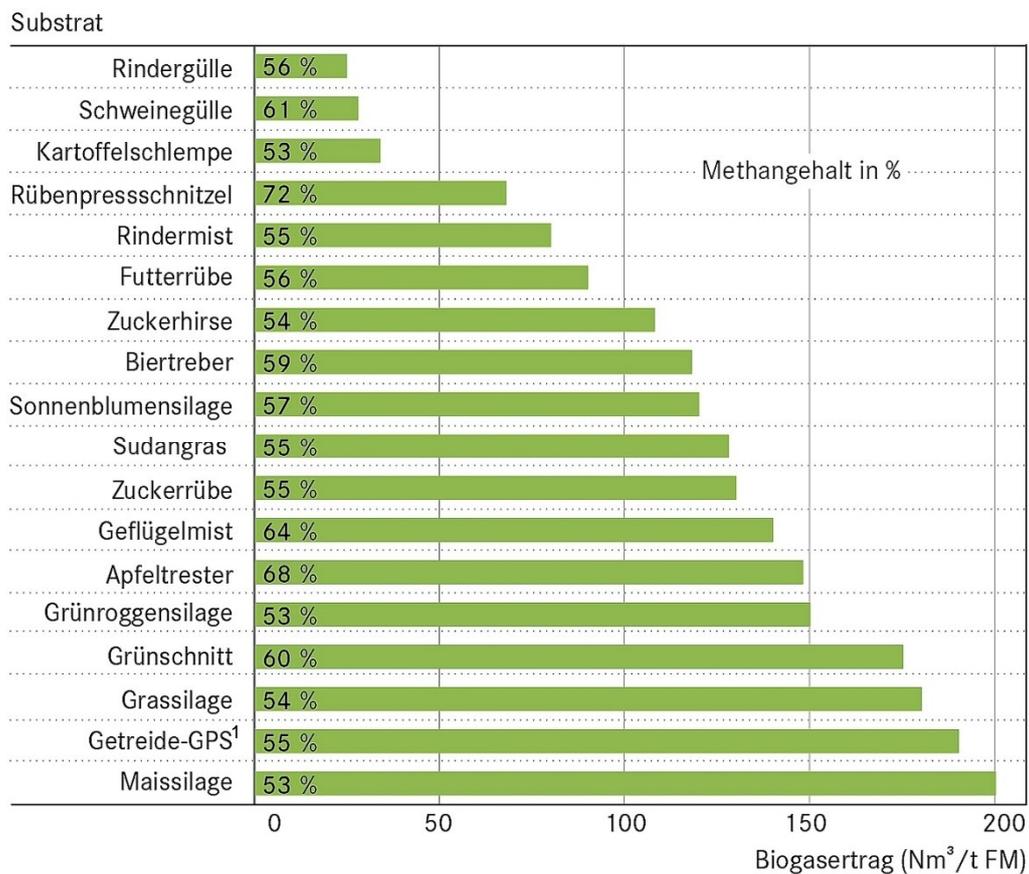


Abbildung 18: Biogasausbeuten unterschiedlicher Substrate. ¹GPS = Ganzpflanzensilage. Quelle: Biogas Leitfaden, FNR (2010), © FNR 2011 (FNR 2012a). Druckerlaubnis von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) vom 27.08.2012.

Von den nachwachsenden Rohstoffen werden vor allem Maispflanzen verwendet (Weiland 2007), da sie den höchsten Biogasertrag liefern (Abbildung 18). Durchschnittliche Gaserträge der durchwachsenen Silphie sind bisher nicht erhältlich, da sich der Anbau dieser Energiepflanze noch in der Entwicklung befindet (Wilken und Benke 2012). Die Inputstoffe der in dieser Arbeit beprobten NawaRo-Biogasanlagen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Die mikrobielle Zusammensetzung im Fermenter spielt bei der Biogasgewinnung eine essentielle Rolle, neben der Optimierung der Technik und der Auswahl der Inputstoffe. Mikroorganismen machen die Herstellung von Biogas erst möglich.

1.5.1.3 Mikrobielle Zusammensetzung in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Unterschiedliche Mikroorganismen aus verschiedenen Phyla werden benötigt, um Biogas herzustellen. Aus einem mesophilen Fermenter einer Biogasanlage (betrieben mit Schweinemist) wurden verschiedene Bakterien und Archaea unterschiedlicher Klassen, Phyla und Gattungen molekularbiologisch identifiziert (Liu. 2009).

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der Mikroorganismen in einem mesophilen Biogasfermenter

	Verteilung der Mikroorganismen [%]
Domäne der Bacteria	
Phylum Firmicutes	47,2
Klasse Bacilli	1,7
Klasse Clostridia	45,5
Phylum Spirochaetes	13,2
Phylum Fibrobacteres	2,1
Phylum Bacteroidetes	35,4
Phylum Proteobacteria	0,5
Phylum Planctomycetes	0,5
Phylum Verrucomicrobia	1,1
Domäne der Archaea	
Phylum Euryarchaeota	
Ordnung Methanomicrobiales	63,3
Genus Methanogenium	9,1
Genus Methanoculleus	29,0
Genus Methanospirillum	17,2
unbekannte Methanomicrobiales	8,0
Ordnung Methanosarcinales	36,7
Genus Methanosarcina	33,0
Genus Methanosaeta	0,5
unbekannte Methanosarcinales	3,2

In der Domäne der Bakterien wurden 7 Phyla identifiziert, mit dem dominierendem Phylum Bacteroidetes und der dominierenden Klasse Clostridia (Tabelle 3). Bei den Archaea wurde 1

Phylum identifiziert, das von der Ordnung Methanomicrobiales dominiert wurde. Die Gattung *Methanoculleus* trat in der Klasse Methanomicrobiales am häufigsten auf. In der Ordnung Methanosarcinales wurden von Liu *et al.* (2009) hauptsächlich Archaea der Gattung *Methanosarcinales* identifiziert. Molekularbiologische Identifizierungen methanogener Archaea aus Fermentern landwirtschaftlicher Biogasanlagen zeigten hauptsächlich Arten der Gattung *Methanoculleus* aus der Ordnung Methanomicrobiales (Klocke *et al.* 2008). Arten aus der Ordnung Methanosarcinales waren nicht in allen Fermentern anwesend (Nettmann *et al.* 2010).

In einem mesophilen Laborfermenter (CSTR) wurden ein molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Diversität durchgeführt (Klocke *et al.* 2007). dieser Laborfermenter fasste 8 L und wurde mit Futterrübensilage betrieben.

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Mikroorganismen in einem *completely stirred tank reactor* (CSTR, Klocke *et al.* 2007, Druckerlaubnis von Elsevier vom 25.08.2012)

	Zahl der OTU (<i>operational taxonomic units</i>)	Zahl der 16S rDNA Klone
Domäne der Bacteria		
Phylum Proteobacteria	8 (13,3 %)	35 (23,8 %)
Phylum Firmicutes		
Klasse Clostridia	21 (35,0 %)	33 (22,4 %)
Klasse Bacilli	11 (18,3 %)	32 (21,8 %)
Phylum Actinobacteria	1 (1,7 %)	5 (3,4 %)
Phylum Spirochaetes	2 (3,3 %)	2 (1,4 %)
Phylum Bacteroidetes	13 (21,7 %)	31 (21,1 %)
Domäne der Archaea		
Phylum Euryarchaeota	4 (6,7 %)	9 (6,1 %)

Während wie im Fermenter (Tabelle 3) bei den Archaea 1 Phylum molekularbiologisch identifiziert wurde, befanden sich Vertreter aus 5 bakteriellen Phyla im CSTR (Tabelle 4). In der Studie von Klocke *et al.* (2007) wurden keine Bakterien der Ordnung Syntrophobacteriales identifiziert, wohingegen im Granulat eines mit Saccharose und kurzkettigen Fettsäuren betriebener Laborfermenter Syntrophobacteriales identifiziert worden sind (Harmsen *et al.* 1996). In einer weiteren Studie wurde ein 200 L Tank mit Gülle abwechselnd mit Casein, Stärke und Rahm betrieben und die bakterielle Diversität molekularbiologisch bestimmt. In dieser Studie wurden, vergleichbar mit den Ergebnissen von Liu *et al.* (2009, Tabelle 3) hauptsächlich Bacteroidetes und Firmicutes molekularbiologisch identifiziert, wobei wenige acetogene Bakterien identifiziert wurden (Kampmann *et al.* 2012a). Bei der molekularbiologischen Identifikation der methanogenen Archaea ermittelten Kampmann *et al.* (2012b)

Methanobrevibacter aus der Ordnung Methanobacteriales und *Methanospirillum* aus der Ordnung Methanomicrobiales als dominierende Gattungen.

Der Vorgang der Biogasherstellung ist sehr komplex (Schattner und Gronauer 2000). Insbesondere, weil verschiedene Mikroorganismen unterschiedliche Generationszeiten haben können. Die Generationszeit g wird berechnet, indem die Teilungsrate v durch 1 geteilt wird (Steinbüchel und Oppermann-Sanio 2003).

$$g = \frac{1}{v}$$

Formel 1: Beziehung der Generationszeit g mit der Teilungsrate v .

Die Teilungsrate v ist definiert als die Anzahl der Zellteilungen pro Stunde einer exponentiell wachsenden Kultur. Eine Zellteilung bedeutet eine Verdopplung. Daraus resultiert, dass eine Zellzahl N berechnet werden kann, indem die ursprüngliche Zellzahl N_0 mit 2 mit der Anzahl der Generationen n als Exponent multipliziert wird (Madigan *et al.* 2000).

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

N = Zellzahl

N_0 = ursprüngliche Zellzahl

n = Anzahl der Generationen

Formel 2: Berechnung einer Zellzahl N .

Wenn die Anzahl der Generationen n unbekannt ist, ergibt sich für die Berechnung der Teilungsrate v folgende Gleichung:

$$v = \frac{n}{t} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2 (t - t_0)}$$

n = Anzahl der Zellteilungen

N_0 = ursprüngliche Zellzahl

N = Zellzahl

t = Zeitpunkt mit Zellzahl N

t_0 = ursprüngliche Zeit

Formel 3: Berechnung der Teilungsrate v .

Die Generationszeiten von Mikroorganismengruppierungen, die theoretisch bei der Bildung von Biogas unter anderem auch in landwirtschaftlichen Biogasanlagen beteiligt sein können, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Generationszeiten der unten aufgeführten Mikroorganismengruppen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen sind bisher nicht bekannt.

Tabelle 5: Generationszeiten [h] verschiedener Mikroorganismengruppen (Weiland 2001)

Mikroorganismengruppe	Generationszeit [h]
Hydrolytische und acidogene Bakterien	
Bacterioides	< 24
Clostridien	24 - 36
Acetogene Bakterien	
Syntrophobacter	40 - 60
Syntrophomonas	72 - 132
Methanogene Archaea	
Methanobacterium	12 - 60
Methanosarcina	120 – 360
Methanococcus/ Methanosaeta	240

Limitierend für die Biogasherstellung können dabei die teilweise langen Generationszeiten der methanogenen Archaea (Tabelle 5) wirken, welche letztendlich Methan aus dem gebildeten CO₂ und H₂ beziehungsweise Acetat herstellen (Görisch und Helm 2007).

Im folgenden Kapitel werden die komplex miteinander verschachtelt interagierenden Mikroorganismen während der Bildung von Biogas in landwirtschaftlichen Biogasanlagen theoretisch und in den Kapiteln 5.2, 5.5 sowie 5.6 mit Ergebnissen aus dieser Arbeit erläutert.

1.5.2 Die Bildung von Biogas aus organischem Material in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Die Biogasbildung wird in vier Stufen unterteilt (Kaltschmitt und Hartmann 2001, Braun 1982, Kloss 1986), welche Hydrolyse, primäre Fermentation, sekundäre Fermentation und Methanogenese genannt werden. Auch die Bildung von Biogas erfolgt in landwirtschaftlichen Biogasanlagen stufenweise nach dem gleichen Schema.

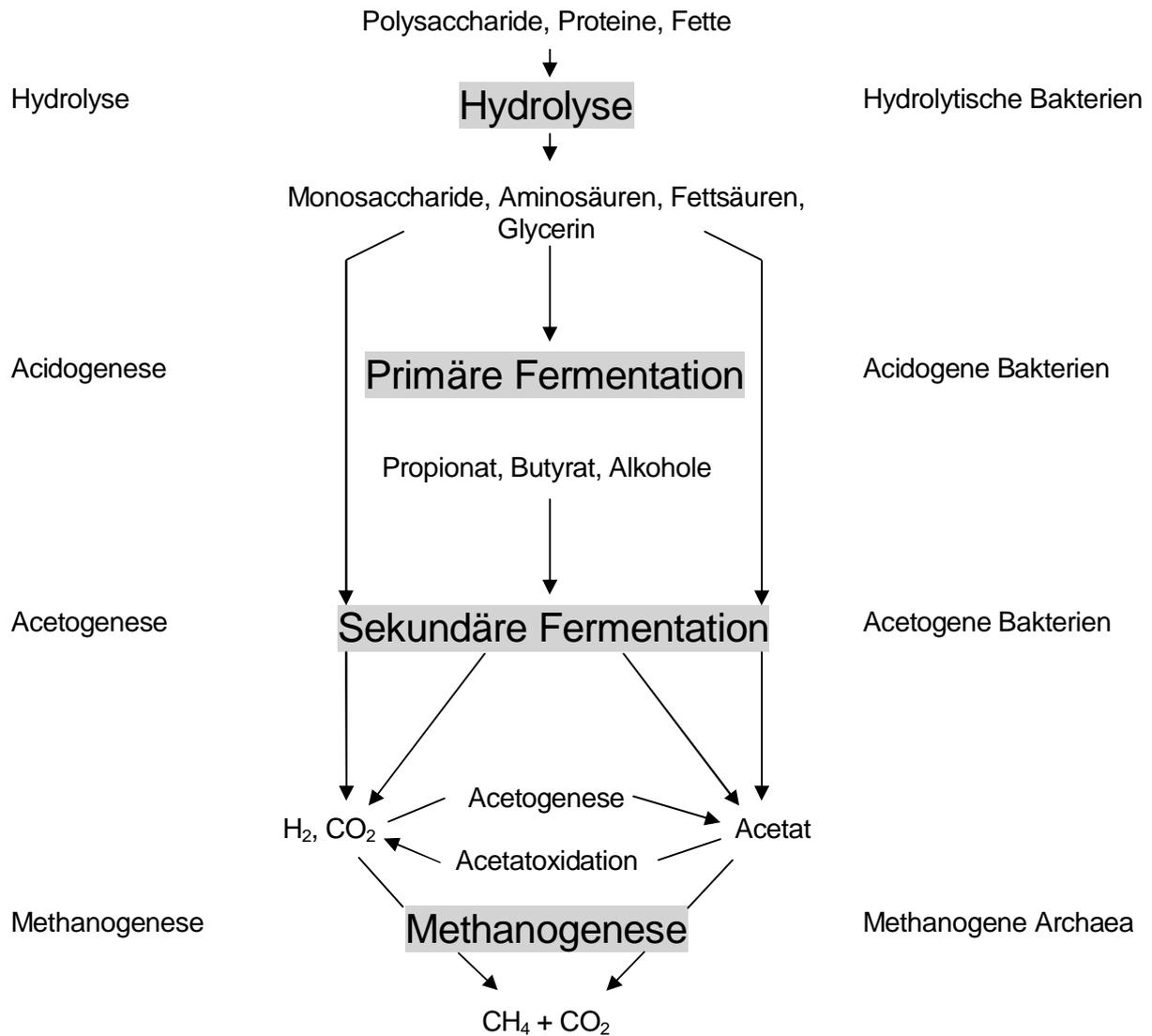


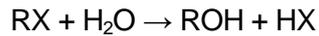
Abbildung 19: Schematische Darstellung der stufenweise ablaufenden Biogasherstellung; links: mikrobielle Stoffwechselbezeichnungen; mittig: der Prozessname (grau unterlegt), ausgewählte Stoffwechselprodukte und mikrobielle Stoffwechselbezeichnungen auf der Stufe der Acetogenese/ sekundären Fermentation; rechts: Verantwortliche Bakteriengruppen.

Die folgenden Kapitel 1.5.2.1 bis 1.5.2.4 behandeln die Stufen der Herstellung von Biogas im Einzelnen.

1.5.2.1 Hydrolyse

Während der enzymatischen Hydrolyse wird polymeres, organisches Material zu dessen Monomeren zersetzt. Dabei werden Wassermoleküle in Hydroxidionen und Wasserstoffionen gespalten und mit den Spaltstücken verbunden. Diese Reaktion katalysieren Hydrolasen.

Hydrolase



Formel 4: allgemeine Reaktionsgleichung für eine enzymatisch katalysierte Hydrolyse.

Von Bakterien werden zum Abbau von Polysacchariden, beispielsweise Cellulose und Stärke, Cellulasen und Amylasen, von Proteinen Proteasen und von Fetten Lipasen gebildet. Diese Enzyme kommen extrazellulär zum Einsatz. Einige anaerob Cellulose abbauende Mikroorganismen besitzen Cellulosome (Flint *et al.* 2008, Ölschläger 2007, Schwarz 2001). Cellulosome sind multienzyme Proteincomplexe, die für effiziente Degradation von Cellulose sorgen (Bayer *et al.* 1994). Ein Cellulosom besteht aus einem Gerüstprotein mit Cohesinen, die mit Dockerinen interagieren. Diese Dockerine sind mit Linkern verbunden, an denen katalytische Domänen zum Abbau von unter anderem Cellulose befestigt sind. Sie bieten den Mikroorganismen den Vorteil, dass die gebildeten Monomere direkt vom Mikroorganismus verwertet werden können, haben allerdings den Nachteil, dass die Mikroorganismen direkt auf den Polysacchariden sitzen müssen. Bei verschiedenen Clostridien wurden Cellulosome identifiziert: *Clostridium cellulovorans* (Kosugi *et al.* 2001, Murashima *et al.* 2002, Park *et al.* 2001), *Clostridium thermocellum* (Arai *et al.* 2001), *Clostridium josui* (Jindou *et al.* 2002), *Clostridium thermocellum* (Prates *et al.* 2001), *Clostridium acetobutylicum* (Nölling *et al.* 2001) und *Clostridium cellobioparum* (Lamed *et al.* 1987). Auch *Butyrivibrio fibrisolvens* ist befähigt, Cellulose mit Hilfe eines Cellulosoms abzubauen (Berger *et al.* 1990). Weitere Kandidaten mit Cellulosome als Adhäsionsapparate sind *Ruminococcus albus* (Miron *et al.* 2001b, Ohara *et al.* 2000) sowie *Ruminococcus flavefaciens* (Ding *et al.* 2001, Martin *et al.* 2001, Miron *et al.* 2001a, Rincón *et al.* 2003, 2004 und 2005). Bei *Fibrobacter succinogenes* wurden Zellfortsätze bei der Adhäsion des Mikroorganismus an Oberflächen beobachtet (Huang und Forsberg 1990), wobei der Nachweis einer Beteiligung eines Cellulosoms noch aussteht (Miron *et al.* 2001b). Unter anaeroben Pilzen existieren Spezies, die Cellulosom-artige Gebilde zur Adhäsion ausbilden (Béguin und Lemaire 1996, Chen *et al.* 1995, Dalrymple *et al.* 1997, Tsai *et al.* 2003). Polysaccharide (insbesondere Cellulose), Proteine und Fette werden in Oligo- bis Monosaccharide, Aminosäuren, Glycerin und langkettige Fettsäuren enzymatisch gespalten. Klocke *et al.* (2009b, 2007) wies in landwirtschaftlichen Biogasanlagen häufig Vertreter der Klassen Bacteroidetes, Clostridia, seltener der Spirochaetes, der Flavobacteria und der ϵ -Proteobacteria molekularbiologisch nach. Zu den Klassen Bacteroidetes und Clostridia zählen bekannte Vertreter des anaeroben Abbaus langkettiger organischer Verbindungen, während ϵ -Proteobacteria nachgeordnete Reaktionen wie die Umwandlung kurzkettiger Polysaccharide vollziehen (Boone *et al.* 2001). Flavobacteria hingegen sind bedeutende Destruenten organischer Biomasse in aquatischen Systemen (Kirchman 2002). Die Hydrolyse läuft gleichzeitig mit der Acidogenese ab (siehe Kapitel 1.5.2.2).

1.5.2.2 Primäre Fermentation

Primäre Fermentation bedeutet, dass die Mikroorganismen Energie erzeugen, die Stoffwechselwege also einen jeweils energetisch exergonen Ablauf haben. Die primäre Fermentation wird oft auch Acidogenese genannt. Beim Vorgang der Acidogenese werden Zucker, Aminosäuren und langkettige Fettsäuren beispielsweise von Bakterien der Gattungen *Clostridium*, *Acetivibrio*, *Bacterioides* und *Butyrivibrio* intrazellulär zu kurzkettigen Carbonsäuren wie Propionsäure (Kapitel 1.7.1), Buttersäure, Valeriansäure und Milchsäure vergoren und dabei Energie gewonnen. Bei der primären Fermentation entstehen auch Alkohole, Aldehyde, Essigsäure, Ameisensäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid können bereits nach dieser Stufe sowohl von hydrogenotrophen methanogenen Archaea zu Methan (Kapitel 1.9.1.1.1) als auch von homoacetogenen Bakterien zu Essigsäure (Kapitel 1.8) umgesetzt werden. Einige hydrogenotrophe methanogene Archaea können auch Ameisensäure zu Methan verwerten (Kapitel 1.9.1.1.1). Die Essigsäure können acetoklastische methanogene Archaea verwenden, um Methan herzustellen (Kapitel 1.9.1.1.2).

1.5.2.3 Sekundäre Fermentation

Die Bezeichnung sekundäre Fermentation bedeutet, dass die ablaufenden Stoffwechsel energetisch endergon sind. Das heißt, dass Energie dem Stoffwechsel zugeführt werden muss, um das Endprodukt zu bilden. Die sekundäre Fermentation wird auch Acetogenese genannt, da syntrophe Bakterien die in der primären Fermentation (Kapitel 1.5.2.2) gebildeten kurzkettigen Carbonsäuren Buttersäure, Propionsäure (Kapitel 1.7.2), Valeriansäure und Ameisensäure, Aminosäuren und Alkohole weiter zu Essigsäure oxidieren. Syntrophe Bakterien unterschiedlicher Gattungen wurden bisher identifiziert: *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora*, *Syntrophus*, *Syntrophobotulus*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Thermoanaerobium*, *Thermosyntropha*, *Thermoacetogenium*, *Pelobacter*, *Desulfovibrio*, *Smithella* und *Clostridium*. Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid sind bei der sekundären Fermentation ebenfalls Produkte. Der gebildete Wasserstoff muss abgebaut werden, da bei zu hohem Wasserstoffpartialdruck die syntrophen Oxidationen endergon sind (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986). Überwiegend hydrogenotrophe methanogene Archaea verbrauchen den gebildeten Wasserstoff (Kapitel 1.9.1.1.1). Die Kombination der syntrophen Oxidation und des Abbaus des Wasserstoffpartialdrucks wird Inter-Spezies-Wasserstoff-Transfer (Schink und Stams 2006) oder reverser Elektronentransport (Abbildung 25, Stams und Plugge 2009) genannt. Der Wasserstoff kann auch von homoacetogenen Bakterien zu Essigsäure (Kapitel 1.8) umgesetzt werden. Homoacetogene Bakterien produzieren auch Essigsäure aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid (Kapitel 1.8). Die Essigsäure wird als Substrat von acetoklastischen methanogenen Archaea der Gattung *Methanosarcina* und *Methanosaeta* verwendet, um Methan

herzustellen (Kapitel 1.9.1.1.2). Gebildeter Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, fungieren hydrogenotrophen methanogenen Archaea (Kapitel 1.9.1.1.1) auch bereits während der sekundären Fermentation als Substrate für die Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1). Einige Archaea der Gattung *Methanobacterium* verwerten auch Ameisensäure zur Methanbildung. Der durch die Methanogenese niedrig gehaltene Wasserstoffpartialdruck während der Methanogenese, wird von sekundär fermentierenden Bakterien benötigt, um den endergonen Abbau von Propionsäure (Kapitel 1.7.2), Valeriansäure, Buttersäure und Ameisensäure zu Essigsäure in großem Maß durchführen zu können. Wird der Wasserstoffpartialdruck nicht unter 9,2 Pa (Gourdon und Vermande 1987) oder 10^{-4} atm (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986) gehalten, kommt es zur Anreicherung der Carbonsäuren beginnend mit Propionsäure, was die Methanogenese durch den absinkenden pH-Wert hemmt ($< \text{pH } 7$). Damit kommt der gesamte Prozess der Methanproduktion zum Erliegen. Man spricht hier von einer „Versäuerung“ des Fermenters (Kapitel 1.7).

1.5.2.4 Methanogenese

Mackie und Bryant veröffentlichten 1981, dass Methan zu 70 % aus Acetat (acetoklastisch) und zu 30 % aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid (hydrogenotroph) bei der Fermentation von verdünnten Milchkuh Fäkalien im Labormaßstab gebildet wird (Mackie und Bryant 1981, Ahring 2003). Diese Werte wurden zur Regel für die Klärschlammvergärung (Lettinga 1995) übernommen. In diesen Fermentern herrschen typischerweise lange Verweilzeiten (bis zu 70 d) der Mikroorganismen und eine vergleichsweise geringe Acetatbelastung (Bauer *et al.* 2009). In landwirtschaftlichen Biogasanlagen siedeln sich ebenfalls einige Arten methanogener Archaea an. In diesen Fermentern wurden zu einem hohen Anteil hydrogenotroph methanbildenden Archaea molekularbiologisch detektiert (Nettmann *et al.* 2010, Zhu *et al.* 2011). Bei noch höheren Raumbelastungen, wurden keine acetoklastischen Methanogenen nachgewiesen (Bauer *et al.* 2008, Lebuhn *et al.* 2008a). Ebenfalls keine acetoklastischen Archaea, sondern nur hydrogenotrophe Archaea wurden in versäuerten Fermentern nachgewiesen (Lebuhn *et al.* 2008b). Eine mögliche Erklärung ist, dass nicht Methan bildende Acetatoxidierer den Abbau des Acetats in Abwesenheit von acetoklastisch methanbildenden Archaea (Karakashev *et al.* 2006, Schnürer *et al.* 1999) beziehungsweise bei hohen Ammoniumkonzentrationen (Schnürer *et al.* 1994) übernehmen. Der biochemische Ablauf der Methanogenese wird in Kapitel 1.9.1.1 ausführlich behandelt. Da Biogas nur im Zusammenspiel unterschiedlicher Mikroorganismen gebildet wird, entstehen neben den Methanogenese-Produkten Methan, Kohlenstoffdioxid und Wasser auch andere Endprodukte, was im folgenden Kapitel 1.5.2.5 erläutert wird.

1.5.2.5 Zusammensetzung des Biogases

Die Bildung von Biogas ist ein anaerober, mikrobieller Prozess, der in der Natur ein weit verbreiteter Mechanismus ist (siehe dazu Kapitel 1.9.1). Dieser Prozess wird sich zur alternativen Energiegewinnung zu Nutzen gemacht. Biogas entsteht bei der mikrobiellen Vergärung organischer Masse. Die Zusammensetzung von Biogas wird in der folgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Durchschnittliche Zusammensetzung von Biogas aus einer Biogasanlage nach Eder und Schulz 2007 (Berechnung nach Boyle 1977 und Buswell 1939):

Bestandteil	Konzentration
Methan (CH ₄)	40-75 %
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	25-55 %
Wasser (H ₂ O)	0-10 %
Schwefelwasserstoff (H ₂ S)	50-5000 ppm
Stickstoff (N ₂)	0-5 %
Sauerstoff (O ₂)	2 %
Wasserstoff (H ₂)	0-1 %

Schwefelverbindungen werden gleichzeitig in der Stufe der Methanogenese mikrobiell zu Schwefelwasserstoff (Dihydrogensulfid) umgesetzt (Polster *et al.* 2006). Dabei werden anorganische sowie organische Sulfatverbindungen zu Schwefelwasserstoff mit Wasserstoff anaerob reduziert. Diese Reduktion von Sulfatverbindungen wird von Sulfatreduzierern zur Energiegewinnung genutzt und wird dissimilatorische Sulfatreduktion genannt (Madigan *et al.* 2000). Oftmals koppeln Sulfatreduzierer die Reduktion von Sulfat an die Oxidation von Aminosäuren (zum Beispiel *Desulfovibrio aminophilus*, Tabelle 33) oder kurzkettigen Fettsäuren (beispielsweise *Desulfovibrio oxamicus*, Tabelle 41). Eine weitere Gruppe von Sulfatreduzierern oxidiert Acetat zu Kohlenstoffdioxid. Am Beispiel eines desulfurierenden Bakteriums *Desulfobacter sp.* ist die Reduktion von Sulfat (SO₄²⁻) mit Acetat (CH₃COO⁻) und Wasserstoff ([H⁺]) als Elektronendonator zu Kohlenstoffdioxid (CO₂), Dihydrogensulfid (H₂S) und Wasser (H₂O) von Madigan *et al.* (2000) beschrieben. Es folgt die Reaktionsgleichung mit der Kinetik (ΔG⁰).



$$\Delta G^0 = -57,5 \text{ kJ} \cdot \text{Reaktion}^{-1}$$

Formel 5: Reduktion von Sulfat durch *Desulfobacter sp.* mit freier Enthalpie ΔG⁰.

Mit dem Verbrauch von Wasserstoff steht die Sulfatreduktion in Konkurrenz zur hydrogenotrophen Methanogenese, wohingegen der gebildete Kohlenstoffdioxid von hydrogenotrophen methanogenen Archaea zur Methanbildung eingesetzt werden kann. Durch die Oxidation von Acetat zu Kohlenstoffdioxid kann Acetat nicht von acetoklastischen

methanogenen Archaea verwendet werden. Jedoch die Bildung von Acetat aus der unvollständigen Oxidation von Aminosäuren oder kurzkettigen Fettsäuren ermöglicht den acetoklastischen methanogenen Archaea die Methanogenese. Ein zu hoher Gehalt von Schwefelwasserstoff in der Flüssigphase der Fermenter kann auf die methanogenen Archaea giftig wirken. In Abwässern wurde ermittelt, dass methanogene Archaea von 50 mg L^{-1} (13.000 ppm, Kroiss und Wabnegg 1982) bis zu 300 mg L^{-1} (60.000 ppm, Verink 1988) Schwefelwasserstoff beeinträchtigt werden. Diese Konzentrationen von Schwefelwasserstoff werden allerdings in NawaRo-Biogasfermentern nicht erreicht, da die Konzentration des löslichen Schwefelwasserstoffs in der Flüssigphase mit steigendem pH und steigender Temperatur sinkt (Polster *et al.* 2006). Ein Problem stellt der Gehalt von Schwefelwasserstoff erst im Biogas dar, wenn das Gas im AKW verbrannt oder ins Erdgasnetz eingespeist werden soll. Bei der Verbrennung von Dihydrogensulfid entsteht Schwefeldioxid, was ebenfalls giftig ist. Außerdem wirken sowohl Schwefelwasserstoff als auch Schwefeldioxid korrosiv, was den Motor beziehungsweise Gasrohre schädigt. Die Bildung von Dihydrogensulfid kann nicht unterdrückt werden, da auch die Methanogenese beeinträchtigt wird (Polster *et al.* 2006). Der Schwefelwasserstoffgehalt wird entweder im Fermenter niedrig gehalten, indem in der Flüssigphase gelöster Schwefelwasserstoff mit Eisensalzen zu elementarem Schwefel beziehungsweise Eisensulfid reagiert und ausgefällt (Urban *et al.* 2009). Dem Fermenter nachgeschaltet kann ein Biowäscher als biologisches Verfahren eingesetzt werden. Dabei wird der Schwefelwasserstoff aus dem Rohgas in leicht alkalischem Wasser gelöst und in einen Bioreaktor überführt, in dem Schwefelbakterien wie *Thiobacillus* und *Sulfolobus* das Dihydrogensulfid zu elementarem Schwefel beziehungsweise Schwefelsäure unter Anwesenheit von Sauerstoff umsetzen. Ebenfalls können dem Waschwasser Eisensalze zugegeben werden und zur Feinentschwefelung Aktivkohlefilter nachgeschaltet werden. Von einer Sauerstoffbelüftung des Rohgases raten Urban *et al.* 2009 ab, da der ebenfalls eingelagerte Stickstoff die Gasaufbereitung verteuere.

Um die in Tabelle 6 aufgelistete Zusammensetzung des mikrobiell gebildeten Biogases zu erhalten, muss polymeres organisches Material zu Acetat, Formiat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut werden. Werden die Zwischenprodukte kurzkettige Fettsäuren und Aminosäuren nicht zu für methanogene Archaea verwertbare Substrate umgewandelt, tritt die Versäuerung ein. Dabei spielt die Propionsäure (Kapitel 1.7) eine wichtige Rolle, da sie anaerob nur endergon von syntrophen Mikroorganismen (Kapitel 1.7.2) abgebaut werden kann. Es folgt eine kurze Vorstellung der Propionsäure mit Erläuterungen über dessen industrielle Verwendung abseits der Herstellung von Biogas.

1.6 Propionsäure und seine Verwendung

Propionsäure (Propansäure) wurde als erstes von Johann Gottlieb (1844) beschrieben und hergestellt. Propionsäure ist eine natürliche Carbonsäure mit der chemischen Formel $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ und eine klare, stark riechende Flüssigkeit. Das Anion $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$, wie auch die Salze und Ester sind bekannt als Propionat.

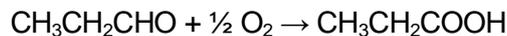
Arpe (2007) schrieb, dass die industrielle Herstellung von Propionsäure ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) hauptsächlich durch eine Nickelcarbonyl-katalysierte Hydrocarboxylierung (Reppe-Carbonylierung) von Ethen ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$) durchgeführt wird, was die folgende Reaktionsgleichung zeigt.



Formel 6: Nickelcarbonyl-katalysierte Hydrocarboxylierung von Ethen (Reppe-Carbonylierung).

Die oben aufgeführte Reaktion (Formel 6) wird bei Drücken von 200 bis 240 bar und Temperaturen von 270 bis 320 °C durchgeführt, weil Kohlenstoffmonoxid nur bei diesen Bedingungen chemisch umgesetzt wird.

Ebenfalls wird Propionsäure durch aerobe Oxidation von Propionaldehyd ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$) chemisch hergestellt. In Anwesenheit von Cobalt- oder Manganionen, läuft die folgende Reaktion bei 40-50 °C ab.



Formel 7: aerobe Oxidation von Propionaldehyd.

Propionsäure entsteht außerdem als Nebenprodukt bei der industriellen Herstellung von Essigsäure. Propionsäure wird ebenfalls als Intermediat zur Produktion verschiedener Polymere verwendet, wie zum Beispiel Cellulosepropionat oder Vinyl-Propionat (Arpe 2007). Propionsäureester haben einen blumigen Geruch und werden daher als Zusätze in Riechstoffen, Aromastoffen und Lösungsmitteln verwendet.

Propionsäure wird biologisch als Coenzym A-Ester, Propionyl-CoA, beim Abbau von Zuckern und Aminosäuren gebildet. Beispielsweise produzieren Bakterien des Genus *Propionibacterium* oder einige des Genus *Clostridium* Propionat als Endprodukt ihres anaeroben Stoffwechsels (siehe Kapitel 1.7.1). Diese Bakterien sind hauptsächlich im Verdauungstrakt zu finden. Aber auch auf der Haut siedeln sich diese Bakterien an und sind maßgeblich für den sogenannten „Schweißgeruch“ verantwortlich. Propionsäure bildende Bakterien werden bei der Käseherstellung eingesetzt (Lück und Jager 1995). Propionsäure inhibiert das Wachstum verschiedener Pilz und einiger Bakterien ab 0,1 % (w/v). Daher wird Propionsäure oft als vorbeugender Futterzusatz gegen Ketoazidose bei Milchvieh eingesetzt und Propionat wird als

Konservierungsstoff in Backwaren verwendet (Lück und Jager 1995). In Biogasfermentern ist übermäßig angereicherte Propionsäure unerwünscht, aufgrund des energetisch ungünstigen Abbaus im anaeroben Umfeld.

1.7 Propionsäure in Biogasfermentern

Propionsäure ist mit anderen kurzkettigen organischen/flüchtigen (Fett)Säuren ein Zwischenprodukt während der Biogasherstellung in Biogasfermentern (Kapitel 1.5.2.5). Bei dem Start eines Biogasfermenters zum Beispiel mit Biomüll findet kurzfristig eine starke Akkumulation von Propionsäure statt, was den Neustart einer Anlage zu einem kritischen Vorgang werden lässt (Gallert und Winter 2008). Ebenfalls Überfütterung des Fermenters mit zum Beispiel Glukose hat eine inhibierende Wirkung auf die Biogasproduktion aufgrund der Akkumulation von flüchtigen Fettsäuren wie Propionsäure (Marchaim und Krause 1993). Ist der Säuregehalt in den Fermentern zu hoch, also der pH-Wert unter 5, kommt es zu einer Störung in der Biogasherstellung, da methanogene Archaea unter diesem pH-Wert kein Methan bilden. Die Problematik an einem zu hohen Gehalt von Propionsäure ist, dass der anaerobe Abbau von Propionsäure endergon ist. Daher kann diese Reaktion nur bei einem Wasserstoffpartialdruck unter 9,2 Pa (Gourdon und Vermande 1987) beziehungsweise circa 10^{-4} atm (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986) ablaufen (siehe auch Kapitel 1.7.2).

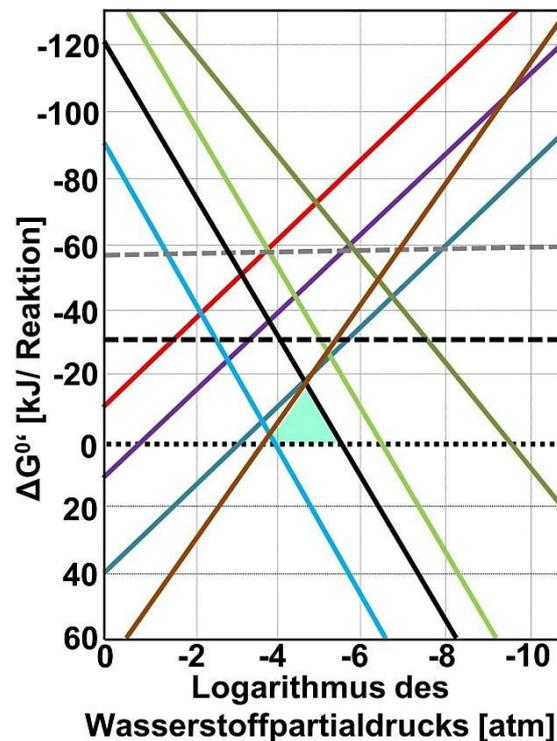


Abbildung 20: Energetisches Fenster des anaeroben Abbaus von Propionsäure durch syntrophe Bakterien (türkises Dreieck); braun, Oxidation von Propionsäure zu Acetat; graugrün, Oxidation von Buttersäure zu Acetat; violett, Ethanol zu Acetat; rot, Lactat zu Acetat; hellblau, acetogene Respiration von Kohlenstoffdioxid (CO_2); schwarz, methanogene Respiration von CO_2 ; hellgrün, Respiration von Sulfat zu Sulfid; grün, Respiration von Sulfit zu Sulfid; schwarze Striche, methanogene Spaltung von Acetat; graue Striche, Spaltung von Acetat durch sulfatreduzierende Bakterien; Konzentrationen: Acetat, 25 mmol L^{-1} ; Propionsäure, Buttersäure, Lactat und Ethanol, 10 mmol L^{-1} ; Sulfat und Sulfit, 5 mmol L^{-1} ; CO_2 , 20 mmol L^{-1} ; Methan, $0,7 \text{ atm}$; nach Harper und Pohland (1986); Druckerlaubnis von John Wiley and Sons vom 24.08.2012.

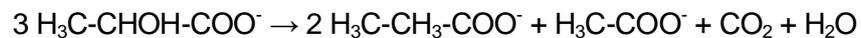
Die Werte des Wasserstoffpartialdrucks zwischen circa 10^{-4} bis knapp über 10^{-6} atm (Abbildung 20) bestätigt den von Gourdon und Vermande (1987) ermittelte Höchstwert des Wasserstoffpartialdrucks von $9,2 \text{ Pa}$, bei dem Propionsäure syntroph abgebaut werden kann. Daher ist es wichtig die flüchtigen Fettsäuren, insbesondere Propionsäure permanent zu kontrollieren (Nielsen *et al.* 2007), um für eine maximale Biogasproduktion im Rahmen der optimalen Konzentration von flüchtigen Fettsäuren zu bleiben (Amani *et al.* 2011) und möglichst schnell gegen eine drohende Akkumulation wirken zu können (Nielsen *et al.* 2007).

Die anaerobe Bildung von Propionsäure durch Bakterien mit Erläuterung der Stoffwechselwege wird im folgenden Kapitel 1.7.1 beschrieben, bevor Wege des syntrophen Abbaus von Propionsäure in Kapitel 1.7.2 besprochen werden.

1.7.1 Mikrobielle anaerobe Bildung von Propionsäure

Je nach Bakterienart wird Propionsäure ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) anaerob aus Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Lactat ($\text{H}_3\text{C-CHOH-COO}^-$), Glycerin ($\text{H}_5\text{C}_3\text{-O}_3\text{-H}_3$), Succinat ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) und verschiedenen Aminosäuren, wie Methionin, Cystein, Glutamat, Serin, Alanin und Threonin gebildet. Die anaerobe Bildung von Propionsäure ist ein Teil der primären Fermentation (Abbildung 19). Es sind drei verschiedene mikrobielle anaerobe Stoffwechselwege bekannt: Der Methylmalonyl-CoA-Weg (Rosner und Schink 1990), der Acrylyl-CoA-Weg (Johns 1952) und die Succinat-Decarboxylierung (Hilpert *et al.* 1984).

Die folgende Reaktionsgleichung (Seeliger *et al.* 2002) zeigt den anaeroben Umsatz anhand des Lactats zu Propionat und Acetat der beiden erst genannten Stoffwechselwege.



$$\Delta G^\circ = -170 \text{ kJ} \cdot 3 \text{ mol}^{-1} \text{ Lactat}$$

Formel 8: Stöchiometrische Reaktionsgleichung des Methylmalonyl-CoA- und des Acryloyl-CoA-Wegs mit freier Enthalpie ΔG° des Methylmalonyl-CoA-Wegs aus Lactat.

Die Succinat-Decarboxylierung läuft mit der folgenden Gesamtgleichung ab (Janssen *et al.* 1996), wobei Succinat zu Acetat decarboxyliert wird:



$$\Delta G^\circ = -20,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ Succinat}$$

Formel 9: Stöchiometrische Reaktionsgleichung mit freier Enthalpie ΔG° der Succinat-Decarboxylierung.

Selenomonas ruminantium (Bryant 1956, Paynter und Elsdon 1970) und *Selenomonas acidaminovorans* bilden ebenfalls Propionat aus Monosacchariden oder Aminosäuren, wobei *Selenomonas acidaminovorans* (Guangsheng *et al.* 1992) Succinat zu Propionat über α -Ketoglutarat decarboxyliert.

In den folgenden Kapiteln 1.7.1.1 bis 1.7.1.3 werden die drei oben genannten Stoffwechselwege der Bildung von Propionsäure erläutert.

1.7.1.1 Methylmalonyl-CoA-Weg

Propionibacterium spp. (Allen *et al.* 1964, Leaver *et al.* 1955), *Propionispira arboris* (Schink *et al.* 1982, Thompson *et al.* 1984), *Veillonella atypica*, (Galivan und Allen 1968) und *Veillonella parvula* (Prévot 1933, Ng und Hamilton 1971, Veillon und Zuber 1898, Gronow *et al.* 2010) bilden aus Lactat über den Methylmalonyl-CoA-Weg Propionsäure, wobei *Veillonella* eine membrangebundene Methylmalonyl Coenzym A Decarboxylase besitzen und bei der Decarboxylierung einen Natriumgradienten aufbauen (Hoffmann *et al.* 1989). Durch den Aufbau des Gradienten wird keine Energiekonservierung in Form von ATP benötigt (Denger und Schink 1992). *Anaerovibrio lipolyticus* fermentiert Glycerol (Hobson 1965, Hungate 1966) und *Arachnia propionica* Glukose zu Propionsäure (Allen und Linehan 1977, Pine und George 1969). *Bacteroides fragilis* (Macy *et al.* 1978) bildet Propionsäure aus Ethanol und CO₂. *Pelotomaculum thermopropionicum* (Imachi *et al.* 2002) bildet in Reinkultur Acetat und Propionsäure aus Pyruvat und Ethanol über den Methylmalonyl-CoA-Weg und oxidiert Propionsäure in Co-Kultur mit methanogenen Archaea über die in Abbildung 21 gezeigten Zwischenprodukte zu Acetat und Kohlenstoffdioxid (Kosaka *et al.* 2006). *Pelobacter propionicus* (Schink 1984) bildet Propionsäure aus Ethanol über den Methylmalonyl-CoA Weg (Schink *et al.* 1987). *Desulfobulbus propionicus* bildet und oxidiert Propionsäure ebenfalls über diesen Weg. (Stams *et al.* 1984).

Durch Propionibakterien werden Glukose oder drei Lactat zu zwei Teilen Propionat und zu einem Teil Acetat über den Methylmalonyl-CoA-Weg (Succinyl-Propionyl-CoA-Weg, Allen *et al.* 1964) umgesetzt. Das folgende Schema zeigt den Stoffwechselweg, was darauffolgend erläutert wird.

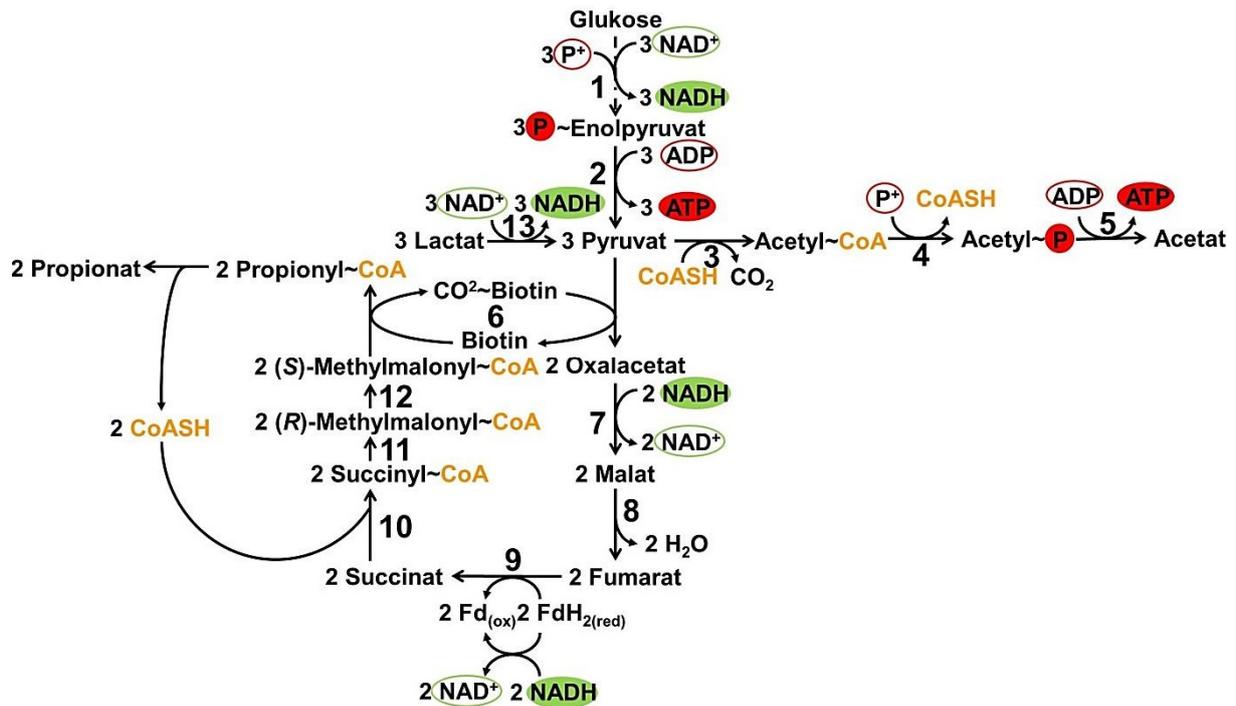


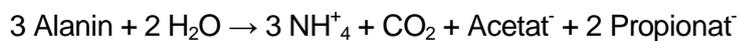
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Methylmalonyl-CoA-Wegs mit Glukose in Propionibakterien; 1 Glykolyse; 2 Pyruvat Kinase; 3 Pyruvat Dehydrogenase; 4 Phosphotransacetylase; 5 Acetyl Kinase; 6 Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase; 7 Malat Dehydrogenase; 8 Fumarase/ (S)-Malat Hydrolyase; 9 Fumarat Reduktase; 10 Propionyl-CoA-Transferase; 11; (R)-Methylmalonyl-CoA Isomerase; 12 (R)-Methylmalonyl-CoA Racemase; 13 Lactat Dehydrogenase; CoASH = freies Coenzym A; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; P = Phosphat; NAD^+ = oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; NADH = reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; aus Allen *et al.* (1964, generelle Druckerlaubnis in Dissertationen von der American Society for Microbiology).

Über die Glykolyse wird in Propionibakterien Pyruvat aus Glukose gebildet (1 und 2 in Abbildung 21, Allen *et al.* 1964). Alternativ wird Lactat durch eine NAD-abhängige Lactat-Dehydrogenase (13 in Abbildung 21, Coquelle *et al.* 2007) zu Pyruvat oxidiert. Im oxidativen Zweig (Abbildung 21, rechts) wird ein Pyruvat durch eine Pyruvat:ferredoxin-Oxidoreduktase (Astashkin *et al.* 2006), Phospho-Transacetylase (Rado und Hoch 1973) und Acetat Kinase (Schauppund Ljungdahl 1974) über die Zwischenstufen Acetyl-CoA und Acetyl-P zu Acetat decarboxyliert (3-5 in Abbildung 21). Dabei wird pro gebildetes Acetat ein ATP gewonnen. Im reductiven Zweig (Abbildung 21, unten) werden zwei Pyruvat durch eine Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase (Wood und Barden 1977) zu Oxalacetat carboxyliert (6 in Abbildung 21). Die Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase enthält Biotin als C1-übertragendes Coenzym, welches den Kohlenstoff der Carboxylgruppe von (S)-Methylmalonyl-CoA übernimmt. (S)-Methylmalonyl-CoA wird durch die Decarboxylierung der Carboxylgruppe zu Propionyl-CoA umgewandelt. Oxalacetat wird reductiv als ein Teil des Tricarbonsäurekreislaufes zunächst zu

Malat durch eine NADH-abhängige Malatdehydrogenase (7 in Abbildung 21, Goward und Nicholls 1994) reduziert. Eine Fumarase (Fumarat Hydratase, Ayres und Lara 1962)/ (S)-Malat Hydrolyase (Dreyer 1985) dehydratiert Malat zu Fumarat unter Abspaltung von Wasser (8 in Abbildung 21). Fumarat wird durch eine Menachinon(MQ)-abhängige Fumarat-Reduktase (9 in Abbildung 21, Lancaster *et al.* 1999) zu Succinat reduziert. Succinat wird weiter durch eine Propionyl-CoA-Transferase (10 in Abbildung 21, Stjernholm und Wood 1961) zu Succinyl-CoA aktiviert, wobei HSCoA aus Propionyl-CoA freigesetzt und der HSCoA-Donor dadurch zu Propionat umgewandelt wird. Eine Coenzym-B12- abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase (Mancia *et al.* 1996) wandelt Succinyl-CoA in (R)-Methylmalonyl-CoA um (11 in Abbildung 21), das durch eine Methylmalonyl-CoA-Epimerase (Bobik und Rasche 2004, McCarthy *et al.* 2001a, b, Leadlay 1981) zu (S)-Methylmalonyl-CoA regeneriert wird (12 in Abbildung 21), dem C1-Donor für die Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase (10 in Abbildung 21).

1.7.1.2 Acryloyl-CoA-Weg

Megasphaera elsdenii (Elsden *et al.* 1956, Rogosa 1971) bildet Propionat, Acetat und Butyrat aus Lactat und bei einer Lactatkonzentration von 1-2 mmol L⁻¹ Acetat und Butyrat aus Glukose (Hino *et al.* 1994). *Clostridium propionicum* (Cardon und Barker 1946) bildet Propionat und Acetat aus Aminosäuren (Hetzl *et al.* 2003) ebenfalls über den Acryloyl-CoA-Weg (Baldwin *et al.* 1965, Johns 1952, Kuchta und Abeles 1985).



$$\Delta G^\circ = -138 \text{ kJ (mol Acetat)}^{-1}$$

Formel 10: Stöchiometrische Reaktionsgleichung mit freier Enthalpie ΔG° des Acryloyl-CoA-Wegs in *Clostridium propionicum* (Hetzl *et al.* 2003).

Anhand der folgenden Abbildung wird der Stoffwechselweg schematisch beschrieben, bei dem Alanin zu Propionat, Acetat, Ammoniak und Kohlenstoffdioxid (Formel 10) umgesetzt wird.

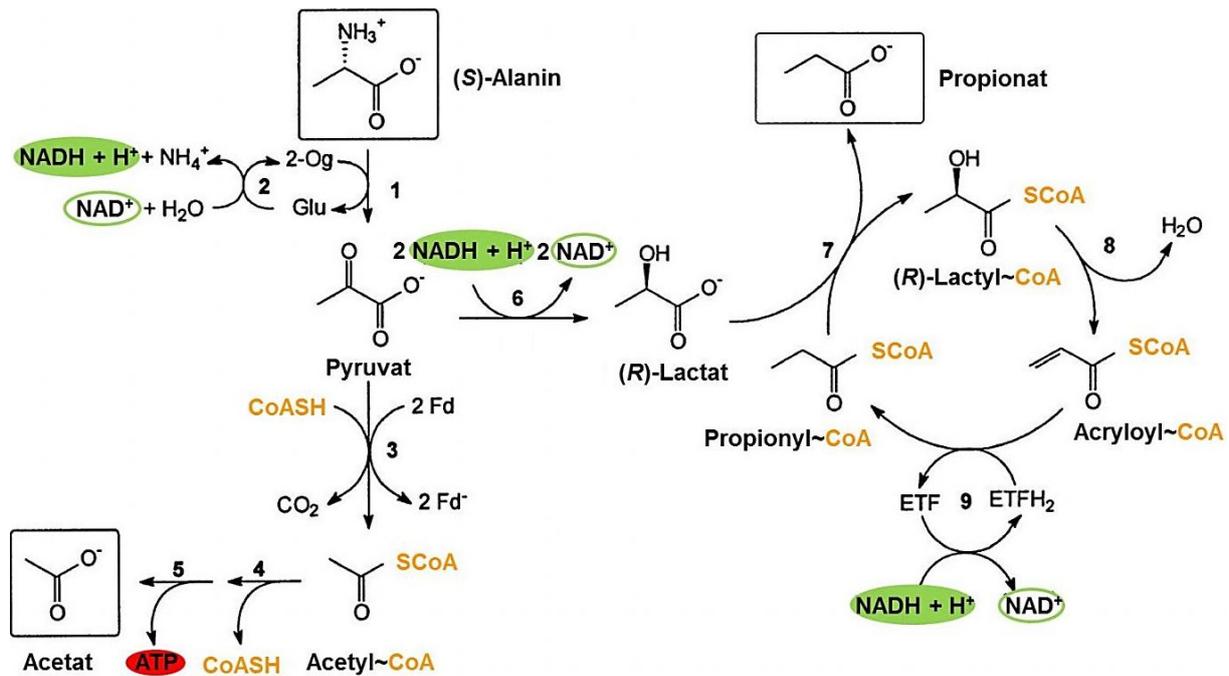


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Acryloyl-CoA-Wegs mit Alanin in *Clostridium propionicum*. 1 Alanin-Aminotransferase (2-Og = 2-Oxoglutarat; Glu = (S)-Glutamat); 2 Glutamat-Dehydrogenase; 3 Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreductase; 4 Phosphatacetyltransferase; 5 Acetat Kinase; CoA = Coenzym A; 6 (R)-Lactat Dehydrogenase; 7 Propionat-CoA Transferase; 8 Lactyl-CoA Dehydratase; 9 Acryloyl-CoA reductase; NAD^+ = oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; ATP = Adenosintriphosphat; $\text{NADH} + \text{H}^+$ = reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; Fd = Ferredoxin; Fd^- = reduziertes Ferredoxin; ETF = Elektronen transportierendes Flavoprotein; aus Hetzel *et al.* (2003); Druckerlaubnis durch John Wiley and Sons vom 14.09.2012.

Eine Alanin: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (1 in Abbildung 22, Dumitru *et al.* 1970, Schweiger und Buckel 1984) transferiert die Aminogruppe des (S)-Alanins auf 2-Oxoglutarat. Das aus dem 2-Oxoglutarat entstandene (S)-Glutamat wird durch eine NADH^+ abhängige Glutamat-Dehydrogenase (2 in Abbildung 22, Schweiger und Buckel 1984) wieder zu 2-Oxoglutarat regeneriert. Alanin wird dabei zu Pyruvat. Im oxidierenden Zweig des Stoffwechsels wird Pyruvat durch eine Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreductase (3 in Abbildung 22, Selmer *et al.* 2002) zu Acetyl~CoA oxidiert. Dabei wird Ferredoxin reduziert und CO_2 abgespalten. Coenzym A wird daraufhin durch ADP+P (nicht gezeigt) ersetzt, katalysiert durch eine Phosphatacetyltransferase (4 in Abbildung 22, Schweiger und Buckel 1984). Eine Acetat Kinase (5 in Abbildung 22, Schweiger und Buckel 1984) spaltet daraufhin Acetyl~P zu Acetat und dem energiereichen ATP. Im reduzierenden Zweig wird Pyruvat durch eine (R)-Lactat Dehydrogenase (6 in Abbildung 22, Schweiger und Buckel 1984, 1985) zu (R)-Lactat umgesetzt. Die Propionat-CoA Transferase (7 in Abbildung 22, Schweiger und Buckel 1984) überträgt Coenzym A von Propionyl~CoA auf das (R)-Lactat, wobei Propionat aus dem Zyklus ausscheidet. Das entstandene (R)-Lactyl~CoA wird

von der Lactyl-CoA Dehydratase (8 in Abbildung 22, Kuchta und Abeles 1985, Schweiger und Buckel 1984) unter Wasserabspaltung zu Acryloyl~CoA dehydriert, das wieder den Kreislauf schließend zu Propionyl~CoA reduziert wird. Eine Acryloyl-CoA reductase (9 in Abbildung 22, Hetzel *et al.* 2003) katalysiert diesen Schritt, das über ein Elektronen transportierendes Flavoprotein (ETF) in einer Untereinheit Elektronen von NADH⁺ bezieht.

1.7.1.3 Succinat-Decarboxylierung

Ein weiterer Weg zur Bildung von Propionat ist die Succinat-Decarboxylierung, ausgehend von in die Zelle eingeschleustem Succinat. Dieser Weg wird zum Beispiel von *Propionigenium modestum* (Schink und Pfennig 1982) oder *Propionigenium maris* (Janssen und Liesack 1995) zur Energiegewinnung in Form von ATP angewendet (Abbildung 23, Dimroth und Schink 1998). Es folgt ein Schema der Succinat-Decarboxylierung mit anschließenden Erläuterungen.

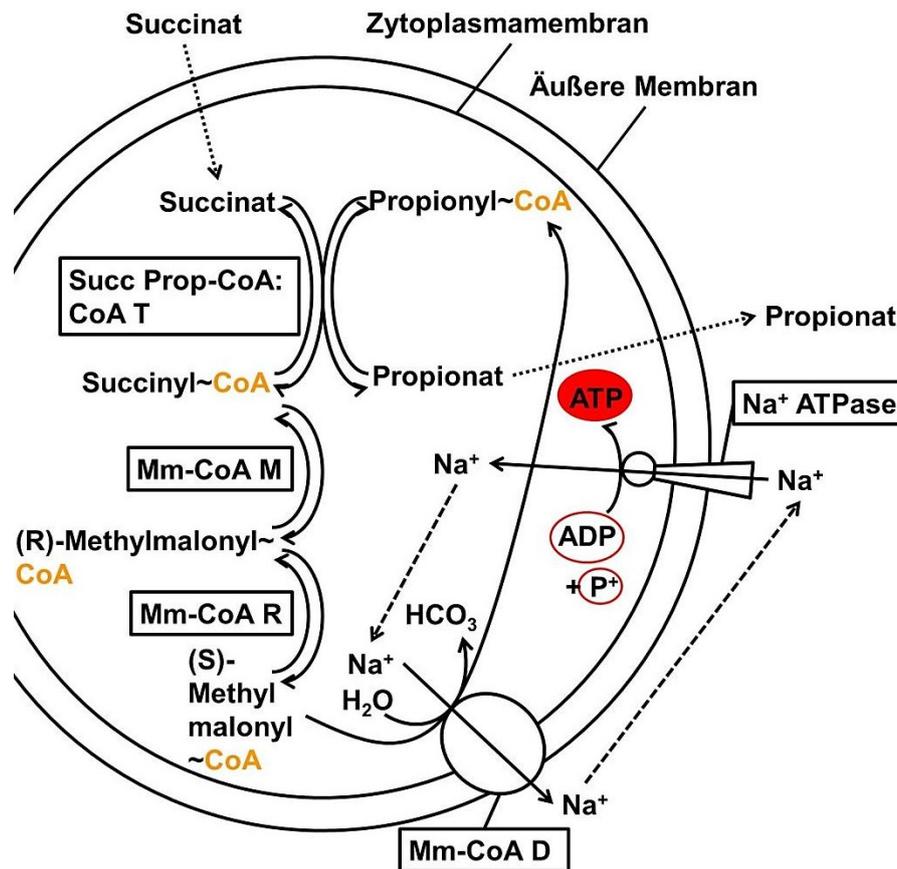


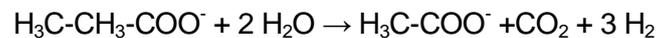
Abbildung 23: Succinat-Decarboxylierung durch *Propionigenium modestum*; Succ Prop-CoA:CoA T = Succinat Propionyl-CoA: CoA Transferase; Mm-CoA M = Methylmalonyl-CoA Mutase; Mm-CoA R = Methylmalonyl-CoA Racemase; Mm-CoA D = Methylmalonyl-CoA Decarboxylase; Na^+ ATPase = Natriumionenabhängige Adenosintri-phosphatase; ADP + P = Adenosindiphosphat und Phosphat; ATP = Adenosintri-phosphat; CoA = Coenzym A; gestrichelte Pfeile = Natriumionentransport; gepunktete Pfeile = Durchtritt von Succinat- und Propionat durch die Zellmembran; aus Dimroth und Schink (1998); Druckerlaubnis durch Springer vom 15.09.2012.

Succinat wird von einer Succinat Propionyl-CoA: CoA Transferase (Hilpert *et al.* 1984) zu Succinyl~CoA aktiviert, wobei Propionat aus dem Zyklus ausscheidet (Abbildung 23, Dimroth und Schink 1998). Der Durchtritt von Succinat und Propionat ist noch unbekannt (Dimroth und Schink 1998). Aus einem Succinat entsteht ein Propionat (Formel 9). Succinyl~CoA wird zu (R)-Methylmalonyl~CoA von einer Methylmalonyl-CoA Mutase (Hilpert *et al.* 1984, Galivan und Allen 1968) umgewandelt. Durch eine Methylmalonyl-CoA Racemase (Hilpert *et al.* 1984, Methylmalonyl-CoA Epimerase, Bobik und Rasche 2004, McCarthy *et al.* 2001a, b, Leadlay 1981) wird (R)-Methylmalonyl~CoA zu (S)-Methylmalonyl~CoA umgesetzt. Aus (S)-Methylmalonyl~CoA wird Propionyl~CoA durch eine Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (Huder und Dimroth 1993, Galivan und Allen 1968, Hoffmann *et al.* 1989) unter Abspaltung von CO_2 umgewandelt. Gleichzeitig wird ein Natriumionen (Na^+)-Gradient durch eine membranständige

Na⁺-transportierende Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (Janssen *et al.* 1996) aufgebaut, was eine ebenfalls membranständige Adenosinetriphosphatase (ATPase, Hilpert *et al.* 1984, Laubinger und Dimroth 1988) durch den Einstrom von Na⁺-Ionen ATP herstellen lässt.

1.7.2 Mikrobieller anaerober Abbau von Propionsäure

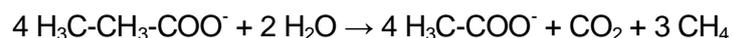
Mithilfe radioaktiv markierter Kohlenstoffe (C¹³) und Enzymaktivitätsnachweisen wurde von Houwen *et al.* (1987, 1990) ermittelt, dass Propionsäure von *Syntrophobacter wolinii* (Boone und Bryant 1980) anaerob mit einigen Enzymen des Methylmalonyl-CoA-Wegs (Abbildung 21) oxidiert wird. Auch andere Studien deuteten auf den Einsatz von Enzymen des Methylmalonyl-CoA-Wegs in propionsäureabbauenden Mischkulturen mit methanogenen Archaea hin (Robbins 1988, Schink 1985, Buswell *et al.* 1951, Koch *et al.* 1983, Tholozan *et al.* 1988). Es folgt die Umsatzgleichung nach Wallrabenstein *et al.* (1994).



$$\Delta G^\circ = +76,0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Propionat}$$

Formel 11: Stöchiometrische Gesamtgleichung der Oxidation von Propionsäure durch *Syntrophobacter wolinii* unter Standardbedingungen mit der freien Enthalpie ΔG° .

Dem positiven Wert der freien Enthalpie ΔG° (Formel 11) ist zu entnehmen, dass dieser Prozess strikt endergon ist. Bei diesem Prozess entsteht zudem Wasserstoff. Um die Propionsäureoxidation energetisch günstig für die Mikroorganismen zu machen und den Partialdruck des Wasserstoffs gering zu halten, werden Wasserstoffabbauende Mikroorganismen wie zum Beispiel hydrogenotrophe methanogene Archaea benötigt, die den durch anaerobe Propionsäureoxidierer gebildeten Wasserstoff zu Methan umwandeln (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986). Ab einem Wasserstoffpartialdruck von 9,2 Pa (Gourdon und Vermande 1987) beziehungsweise circa 10⁻⁴ atm (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986) kommt die Propionsäureoxidation zum Erliegen, da die Reaktion im energetisch ungünstigen positiven Bereich liegt (Abbildung 20). Von Wallrabenstein *et al.* 1994 wurde *Syntrophobacter wolinii* mit *Methanospirillum hungatei* (Ferry *et al.* 1974) co-kultiviert, woraus folgende Gesamtgleichung resultierte.



$$\Delta G^\circ = -26,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ Propionat}$$

Formel 12: Stöchiometrische Gesamtgleichung der syntrophen Umsetzung von Propionat in Acetat durch *Syntrophobacter wolinii* und Methan durch *Methanospirillum hungatei* mit der freien Enthalpie ΔG° .

Durch diese syntrophe Reaktion wird gewährleistet, dass bei der Propionsäureoxidation das Energieminimum von 20 kJ frei wird, um 1 ATP herstellen zu können.

In der folgenden Abbildung ist der Stoffwechselweg von *Syntrophobacter* und *Syntrophomonas* spp. mit der Standardenthalpie ΔG° und $\Delta G'$ bei 1 Pa (10^{-5} atm) Wasserstoffpartialdruck nach Thauer *et al.* (1977) für den gesamten Stoffwechselweg sowie für die einzelnen Schritte der anaeroben Propionsäureoxidation (Propionatoxidation) gezeigt.

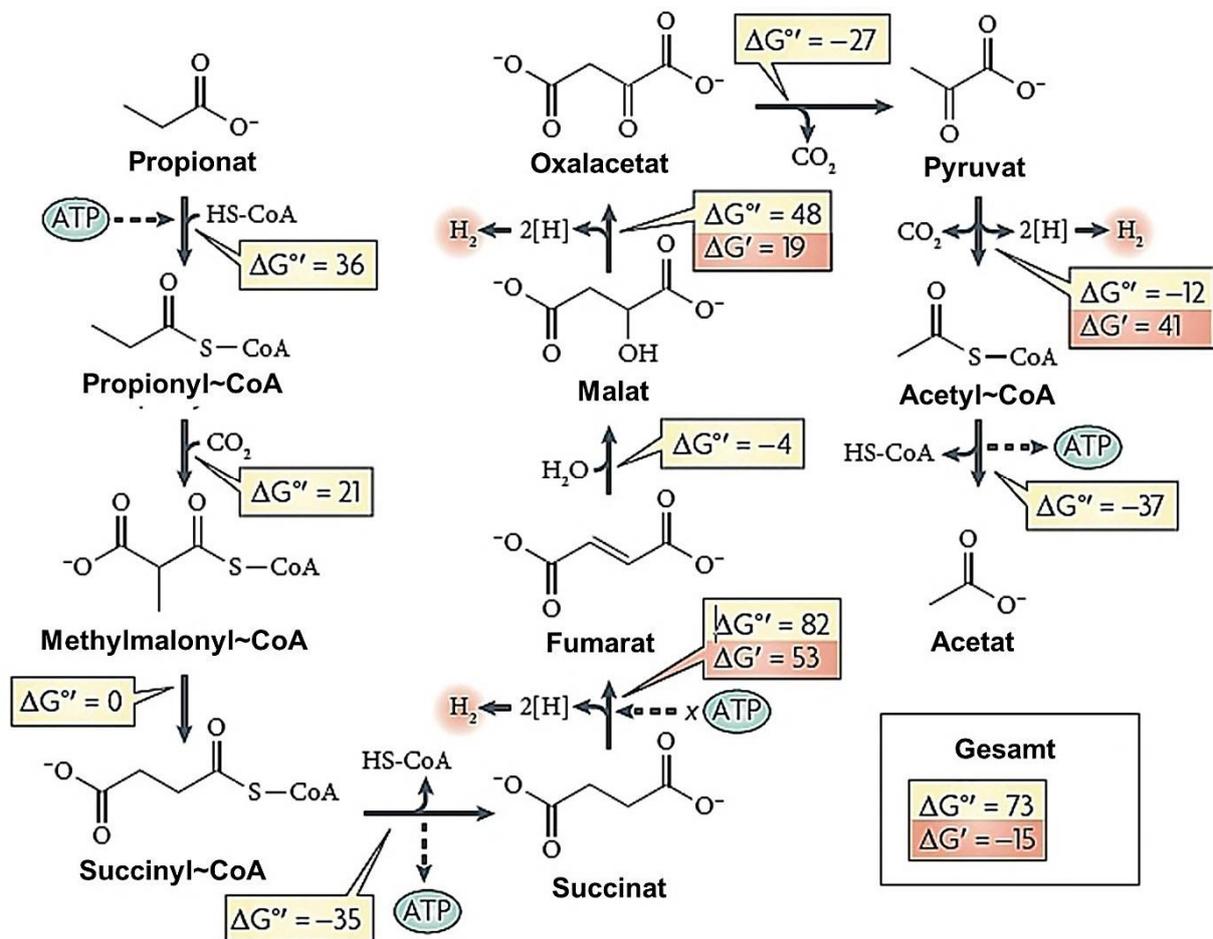


Abbildung 24: Oxidation von Propionat zu Acetat durch *Syntrophobacter* und *Syntrophomonas* spp.; [H] = reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH); ΔG° und $\Delta G'$ (bei 1 Pa Wasserstoffpartialdruck) in $[\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$; aus Stams und Plugge (2009), Druckerlaubnis von der Nature Publishing Group vom 24.08.2012.

Die initiale Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA verbraucht ATP (Abbildung 24). *Syntrophobacter fumaroxidans* (Harmsen *et al.* 1998) und *Pelotomaculum thermopropionicum* (Kosaka *et al.* 2006, 2008) beispielsweise aktivieren Propionat mit einer HS-CoA Transferase (Plugge *et al.* 1993). Dies ist ein von syntrophen Bakterien spezifisch verwendetes Enzym zur Aktivierung von Propionat. In anderen Mikroorganismen werden Carboxylsäuren häufig mit Kinasen oder Thiokinasen unter Verbrauch von ATP aktiviert, die bei den oben genannten Propionsäureoxidierern nicht gefunden wurden (Stams und Plugge 2009). Die endergone

Carboxylierung von Propionyl~CoA zu Methylmalonyl~CoA wird von der exergonen Decarboxylierung des Oxalacetats zu Pyruvat energetisch aufgehoben (Abbildung 24, Harmsen *et al.* 1998, Stams *et al.* 1993). Die Hydrolyse des Succinyl~CoA zu Succinat bildet ATP, was die ATP verbrauchende Initialaktivierung von Propionat energetisch ausgleicht (Abbildung 24; Thauer *et al.* 1977). Malat wird zu Oxalacetat in einer NADH-abhängigen Reaktion umgewandelt. NADH wird gewöhnlich über Ferredoxin von einer Wasserstoff bildenden Hydrogenase oxidiert. Jedoch wurden in syntrophen Bakterien bisher keine NADH-abhängigen Hydrogenasen gefunden, so Stams und Plugge (2009). Der Schritt der Oxidation des Succinats in Fumarat (Abbildung 24) ist auch bei einem Wasserstoffpartialdruck von 1 Pa (10^{-5} atm) endergon. $\frac{2}{3}$ ATP werden für diese Reaktion benötigt (Van Kuijk *et al.* 1998). Um der Reaktion Energie zuzuführen, muss ein Mechanismus existieren, der von außerhalb der Zelle Energie zuführt (reverser Elektronentransfer, rEt). Stams und Plugge (2009) schrieben in ihrem Review, dass Genom- und biochemische Analysen von *Syntrophobacter fumaroxidans* die Anwesenheit eines membranintegrierten Succinat Dehydrogenase Clusters mit Menaquinon und verschiedenen periplasmatischen Hydrogenasen und Formiat Dehydrogenasen zeigten. In *Pelotomaculum thermopropionicum* wurde ein Gencluster einer phylogenetisch verwandten Succinat Dehydrogenase gefunden. Möglich ist nach Stams und Plugge (2009), dass die Oxidation von Succinat zu Fumarat einen Protonengradienten über die Membran aufbaut.

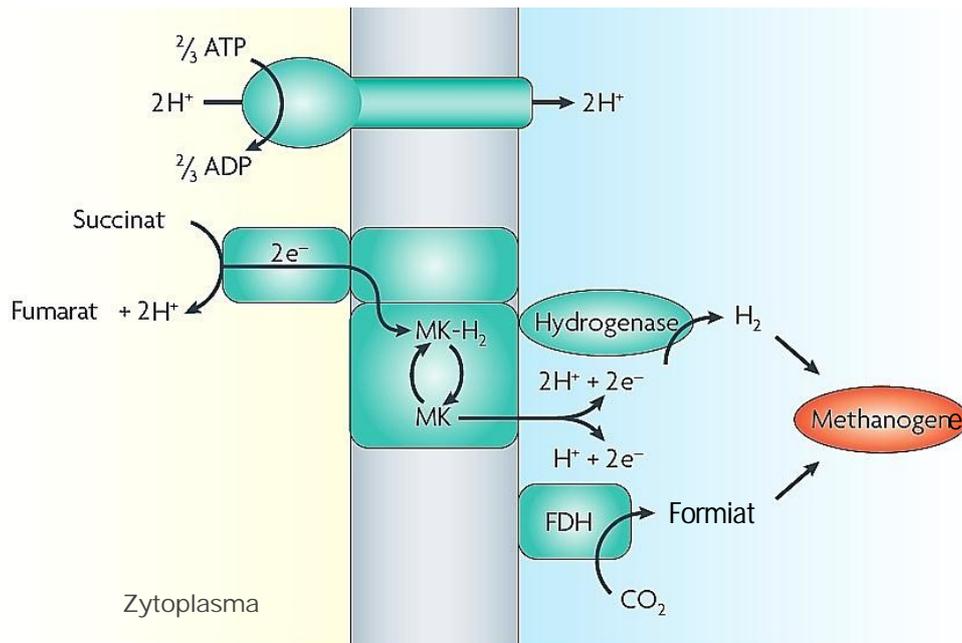


Abbildung 25: Theoretischer biochemischer Mechanismus eines reversen Elektromententransfers (rEt), um Energie in Form von ATP für die endergone Oxidation von Succinat zu Fumarat zuzuführen; FDH = Formiat Dehydrogenase; MK = Menaquinone; übersetzt aus Stams und Plugge (2009), Druckerlaubnis von der Nature Publishing Group vom 24.08.2012.

Mit Einsatz von $\frac{2}{3}$ ATP werden Protonen ausgeschleust (Abbildung 25). Mit den über Menaquinone nach außen transportierten Elektronen werden Formiat und Wasserstoff außerhalb der cytoplasmatischen Membran gebildet. Formiat und Wasserstoff können von einigen hydrogenotrophen methanogenen Archaea zur Methanbildung (Kapitel 1.5.2.4 und 1.9.1.1.1) verwendet werden.

Ein weiterer Mechanismus der syntrophen Oxidation von Propionsäure in Acetat wurde in *Smithella propionica* (Liu *et al.* 1999) rekonstruiert (De Bok *et al.* 2001). In Abbildung 26 ist die von De Bok *et al.* (2001) postulierte Umsetzung von Propionat zu Acetat durch *Smithella propionica* gezeigt, was ebenfalls durch radioaktive Markierung der ersten beiden Methylgruppen des Propionats ermittelt wurde.

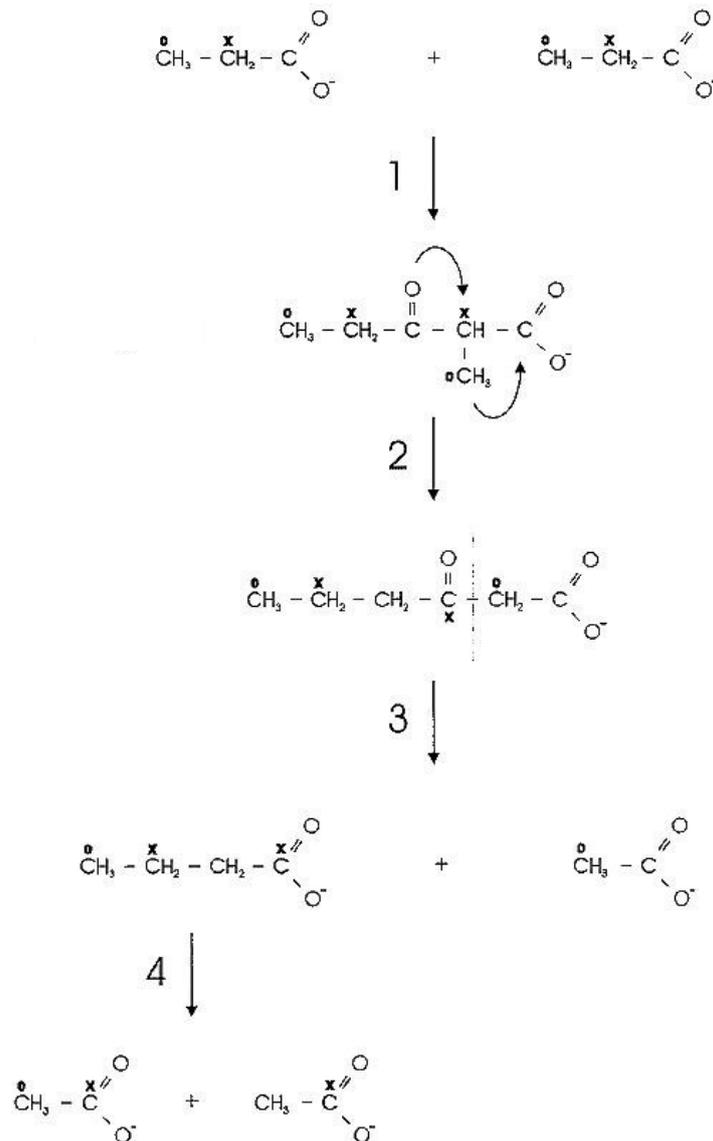
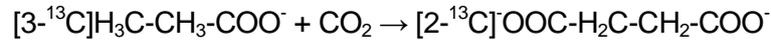


Abbildung 26: Ablauf des Propionatabbaus durch *Smithella propionica*; 1 Verbindung der Carboxylgruppe eines Propionsäure Moleküls mit der zweiten Methylgruppe eines weiteren Propionsäure Moleküls unter Abspaltung des einen Sauerstoffs der Carboxylgruppe des ersten Propionsäure Moleküls; 2 Umstrukturierung der ersten Methylgruppe des zweiten Propionsäure Moleküls zwischen dessen zweite Methylgruppe und dessen Carboxygruppe und Umlagerung des verbliebenen Sauerstoffs auf die erste Methylgruppe des zweiten Propionsäure Moleküls; 3 Spaltung der 3-Ketohexansäure in Butyrat und Acetat; 4 syntrophische β -Oxidation von Butyrat zu zwei Acetatmolekülen; \circ und \times = radioaktive Markierung des C1 und C2 von Propionat; aus De Bok *et al.* (2001, generelle Druckerlaubnis von der American Society for Microbiology).

Die für die in Abbildung 26 gezeigten Reaktionen verantwortlichen Enzyme sind bisher nicht bekannt (Stams und Plugge 2009).

Stams *et al.* und Plugge *et al.* (1993) veröffentlichten, dass das eine aus einem Laborfermenter angereicherte Propionsäureoxidierende Mischkultur durch Zugabe von Fumarsäure ($\text{OOC-HC}=\text{CH-COO}^-$) ins Kulturmedium $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ markierte Propionsäure ($[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-COO}^-$)

zu [2-¹³C] markierte Bernsteinsäure (Succinat, [2-¹³C]OOC-H₂C-CH₂-COO⁻) carboxyliert. Dabei wurde die Methanogenese durch Bromoethansulfonsäure (BrES) inhibiert (Scholten *et al.* 2000, Zinder *et al.* 1984). BrES ist ein strukturell analoges Molekül zu 2-Mercaptoethansulfonsäure (Coenzym M, Smith und Mah 1981). BrES inhibiert die Reduktion von Methyl-S-CoM zu Methan (Kapitel 1.9.1.1) durch Bindung an HS-CoB.



$$\Delta G^\circ = +20,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 13: Carboxylierung von Propionsäure mit CO₂ mit ΔG°.

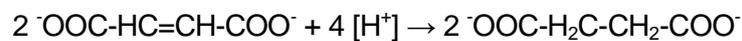
Die Carboxylierung von Propionsäure zu Succinat ist eine endergone Reaktion (Formel 13). Stams *et al.* (1993) schlossen aus den radioaktiv markierten Produkten, dass Fumarat gleichzeitig zu Acetat, Kohlenstoffdioxid und Protonen umgesetzt wird, was die Carboxylierung der Propionsäure zu Succinat energetisch ausgleicht.



$$\Delta G^\circ = -30,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 14: Fumarsäureumsetzung zu Acetat und CO₂.

In Abwesenheit von Propionsäure und mit Inhibierung der Bildung von Methan (Kapitel 1.9.1.1) durch BrES wandelte die angereicherte Mischkultur Fumarat mit Protonen zu Succinat um.



$$\Delta G^\circ = -86,02 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta G' = -88,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ bei } 1 \text{ Pa } (10^{-5} \text{ atm}) \text{ Wasserstoffpartialdruck}$$

Formel 15: Fumaratumsetzung mit Protonen zu Succinat mit ΔG° und ΔG' bei 1 Pa (10⁻⁵ atm) Wasserstoffpartialdruck.

Das syntroph Propionsäureoxidierende Bakterium *Syntrophobacter wolinii* bildete in Cokultur mit *Methanospirillum hungatei* mit Propionsäure und Fumarat hauptsächlich Acetat, währenddessen *M. hungatei* Methan bildete (Stams *et al.* 1993). Mit *M. hungatei* und Fumarat in Abwesenheit von Propionsäure wurde ebenfalls hauptsächlich Acetat gebildet. Von der Cokultur *Syntrophobacter wolinii* in Cokultur Mit *Desulfovibrio* sp. wurde mit Fumarat sowie in An- und Abwesenheit von Propionsäure hauptsächlich Succinat gebildet. Die Cokultur *Syntrophobacter wolinii* und *Desulfovibrio* sp. mit Propionsäure setzte ohne Fumarat wenig Propionsäure in Acetat um. In Einzelkultur bildete *Syntrophobacter wolinii* Succinat aus Fumarat. Dieser Stoffwechselweg wird zum Beispiel auch von *Propionibacterium freudenreichii* angewendet (Rosner und Schink 1990). *Desulfovibrio* sp. in Cokultur mit *M. hungatei* bildete aus Fumarat

mehr Acetat als Succinat, wohingegen *Desulfovibrio* sp. in Einzelkultur etwas mehr Succinat als Acetat bildete (Stams *et al.* 1993).

Bei der anaeroben Oxidation von Propionsäure entstehen unter anderem Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff. Acetat kann anaerob auch aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet werden.

1.8 Die anaerobe Bildung von Acetat aus CO₂ und H₂

Die Bildung von Acetat aus CO₂ und H₂ kann in einem Biogasfermenter eine Rolle während der anaeroben Phase der Biogasbildung spielen (Abbildung 19) und somit in Konkurrenz zur hydrogenotrophen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.1) stehen. Acetoklastische methanogene Archaea der Gattung *Methanosarcina* verwenden hingegen selbst teilweise den Stoffwechselweg in entgegengesetzter Richtung (Abbildung 27), um Acetyl-CoA aus Acetat für die acetoklastische Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2) zu erhalten (Ferry 1992, Gorrell *et al.* 2005, Ingram-Smith *et al.* 2005, Iyer *et al.* 2004). Acetat aus CO₂ und H₂ bildende Bakterien stammen aus 22 Gattungen (Drake *et al.* 2008). Die meisten Bakterien gehören zu dem Phylum Firmicutes. Sie werden auch homoacetogene Bakterien genannt.

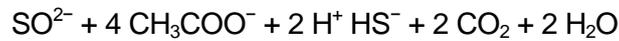


$$\Delta G^\circ = -95 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 16: Umsetzung von CO₂ und H₂ in Acetat mit ΔG° (Ragsdale und Pierce 2008).

Sie bilden Acetat mit dem Wood-Ljungdahl Weg (oder Acetyl CoA Weg). Isoliert wurden sie aus den unterschiedlichsten anaeroben Habitaten: Der Intestinaltrakt von Menschen, Tieren und Termiten (Breznak und Brune 1994, Chassard und Bernalier-Donadille 2006, Rieu-Lesme *et al.* 1995), Reisfelder (Rosencrantz *et al.* 1999), hypersalines Wasser (Ollivier *et al.* 1994), verschiedenen Böden (Peters und Conrad 1995) wie Tiefseeböden (Liu und Suflita 1993), Kläranlagen (Adrian und Arnett 2004) und Grundwasser (MacBeth *et al.* 2004). Der Acetyl-CoA-Weg wird von homoacetogenen Bakterien in reduktiver Richtung zur Energieerhaltung und autotropher Kohlstoffassimilation verwendet (Abbildung 27). Die Bildung von Acetat durch homoacetogene Bakterien im Intestinaltrakt von Menschen, Tieren oder Termiten (Chassard und Bernalier-Donadille 2006, Greening und Leedale 1989, Tholen und Brune 1999) nützen dem Wirt sowie anderen Mikroorganismen in der direkten Umgebung als Nährstoff. In Termiten beispielsweise dominieren homoacetogene Bakterien (Pester und Brune 2007). Acetat dient den Termiten als Hauptnährstoff (Odelson und Breznak 1983). Befinden sich methanogene Archaea in der direkten Umgebung zu homoacetogenen Bakterien, sind methanogenen Archaea die dominierenden Mikroorganismen, da sie im Gegensatz zu homoacetogenen Bakterien eine höhere Affinität zu CO₂ und H₂ haben (siehe auch Abbildung 20, Le Van *et al.* 1998). außerdem

ist der Energieertrag aus der Bildung von Methan (Formel 18) höher als der Energieertrag aus der Bildung von Acetat mit der Acetyl CoA Weg (Formel 16, Schink 1997, Schink und Stams 2006, Thauer *et al.* 1977). Sulfatreduzierer wurden ebenfalls neben acetogenen Bakterien und methanogenen Archaea aus Termitendärmen isoliert (Dröge *et al.* 2005).



$$\Delta G^\circ = -57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 17: Sulfatreduktion mit Oxidation von Acetat mit ΔG° (Ragsdale und Pierce 2008)

Manche dieser Sulfatreduzierer verwenden den Acetyl CoA Weg in entgegengesetzter Richtung und kombinieren die endergone Spaltung von Acetat in CO_2 und H_2 an die exergone Sulfatreduktion (Schauder *et al.* 1988, Spormann und Thauer 1998).

1.8.1 Acetyl CoA Weg (Wood-Ljungdahl Weg)

Beim Acetyl CoA Weg ist der Kohlenstoffmonoxid Dehydrogenase/ Acetyl Coenzym A Synthase-Komplex (CODH/ACS, Ragsdale 2006, 2007, 2008, Volbeda und Fontecilla-Camps 2005, Darnault *et al.* 2003) das Schlüsselenzym. Im Folgenden ist der Acetyl CoA Weg (Wood-Ljungdahl Weg, Ljungdahl 2009, Menon und Ragsdale 1996, Wood und Ljungdahl 1991) nach Erläuterungen von Ragsdale und Pierce (2008) sowie Bramlett *et al.* (2006) abgebildet und beschrieben.

Clostridium formicoaceticum (Andreesen *et al.* 1970, Clark und Ljungdahl 1982) und *Acetobacterium woodii* (Ragsdale und Ljungdahl 1984, Skerman *et al.* 1980) ermittelt wurden (Ragsdale und Pierce 2008). In acetogenen Bakterien wird der letzte Schritt des reduzierenden Methylzweigs mit dem sauerstoffsensitiven Enzym 5,10-Methylen-H₄Folat-Reduktase (5 in Abbildung 27, Clark und Ljungdahl 1984) katalysiert, das reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator verwendet. Wenn Wasserstoff als Elektronendonator verwendet wird, ergibt sich eine freie Enthalpie ΔG° von $57,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Ragsdale und Pierce 2008). Die Methylgruppe des gebildeten Methyl-H₄Folat wird durch eine Methyl-H₄Folat:CFeSP Methyl-Transferase (6 in Abbildung 27) von H₄Folat auf ein corronoides Eisen-Schwefel Protein (CFeSP, Lu *et al.* 1993) übertragen. Diese Transferierung der Methylgruppe von H₄Folat auf CFeSP verbindet den reduzierenden Methylzweig mit dem oxidierenden Carbonylzweig der Acetyl CoA Wegs. CFeSP enthält Cobalamin (Zhao *et al.* 1995). Das im Zentrum des Cobalamins liegende Cobalt (Co) mit der Oxidationsstufe I initiiert den Transfer der Methylgruppe von H₄Folat zu Methyl-Co³⁺-CFeSP. Das dabei gebildete H₄Folat steht somit erneut zur Verfügung, Formiat im zweiten Schritt des reduzierenden Methylzweig zu binden. Das corronoide Eisen-Schwefel Protein wird durch die Übergabe der Methylgruppe auf ein mit einer Carbonylgruppe beladenes Nickel-Zentrum der Acetyl Coenzym A Synthase (7, A-Cluster in, Hegg 2004, Drennan und Peters 2003, Ito *et al.* 2009, Tan, X. *et al.* 2007) zu Co¹⁺-CFeSP regeneriert. Dabei wird von einem paramagnetischen Ni_P¹⁺-CO Intermediat (Ni_P, proximales Nickel) ausgegangen (Abbildung 27, Ragsdale 2004, Seravalli und Ragsdale 2008a, Doukov *et al.* 2002, Seravalli *et al.* 2002). Das proximale Nickel erhält durch die Bindung mit der Methylgruppe ein Elektron und ist somit zwei-fach positiv geladen. Die Carbonylgruppe und die Methylgruppe kondensieren daraufhin zu einer Acetylgruppe. Die Acetylgruppe wird mit Coenzym A vom proximalen Nickel abgespalten, wobei das Eisen-Schwefel-Nickel-Cluster ein Elektron abgibt. Das regenerierte Ni_P⁺¹-Intermediat nimmt erneut ein Kohlenstoffmonoxyd auf, dass durch einen Verbindungstunnel (Doukov *et al.* 2008, Volbeda und Fontecilla-Camps 2004) aus der Bindetasche der Kohlenmonoxyd Dehydrogenase (CODH) stammt. Das aktive Zentrum der CODH enthält ein Nickel und ein Eisen, die mit Schwefelbrücken miteinander verbunden sind (7, C-Cluster in Abbildung 27, Kim *et al.* 2004, Kung *et al.* 2009, Shin *et al.* 1997). Nach der Abspaltung eines Kohlenmonoxyds sind beide Metalle zweiwertig positiv geladen. Die Ladung des Nickels wird über mehrere Schritte ausgeglichen, so dass an das Nickel das Kohlenstoff-Atom eines Kohlenstoffdioxids und an das Eisen ein Sauerstoffatom des selben Kohlenstoffdioxids gebunden werden kann (Abbildung 27, oben rechts). Bei der Regenerierung des Nickels wird ebenfalls über Zwischenschritte Ferredoxin reduziert. Der an das Eisen gebundene Sauerstoff wird von dem aktiven Zentrum benachbarten Aminosäuren (B₁, B₂, Abbildung 27) mit zwei Wasserstoffatomen versorgt, so dass Wasser und Kohlenstoffmonoxyd abgespalten werden können (Seravalli und Ragsdale 2008b). Das Kohlenstoffmonoxyd wird durch den Verbindungstunnel vom C-Cluster der CODH zum A-

Cluster der ACS überführt, so dass die ACS erneut Acetyl~CoA bilden kann. Das von der ACS gebildete Acetyl~CoA wird durch eine Phospho-Transacetylase (8 in Abbildung 27, Drake *et al.* 1981) mit einer anorganischen Phosphatgruppe beladen. Der Finale Schritt des oxidierenden Carbonylzweigs wird durch eine Acetat Kinase (9 in Abbildung 27, Ingram-Smith *et al.* 2005, Gorrell *et al.* 2005) durchgeführt, die die Phosphatgruppe des Acetyl~P auf ADP überträgt und damit energiereiches ATP und Acetat als Endprodukt gebildet wird.

Andere Studien schließen auf ein diamagnetisches Ni_p^0 -Intermediat im aktiven Zentrum der ACS, bei dem das Eisen-Schwefel-Cluster während der Bildung von Acetyl~CoA nicht direkt an der Katalyse teilnimmt (Lindahl 2002 und 2004, Barondeau und Lindahl 1997, Volbeda und Fontecilla-Camps 2005, Wilson und Lindahl 1999, Bramlett *et al.* 2006, Darnault *et al.* 2003, Russell *et al.* 1998, Tan, X. *et al.* 2006, Tan, X. S. *et al.* 2002).

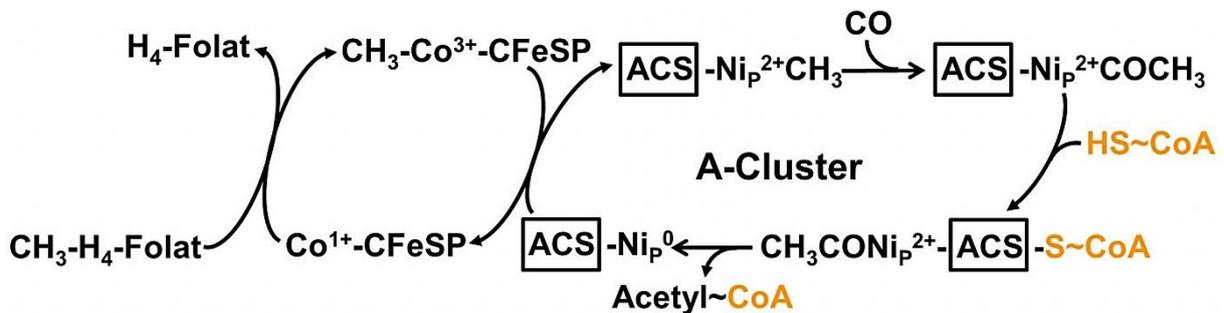


Abbildung 28: Bildung von Acetyl~CoA durch das A-Cluster der CODH/ACS ausgehend von einem diamagnetischen Ni_p^0 -Intermediat.

Ausgehend von der Methylgruppenübertragung auf CFeSP wird die Methylgruppe als erste Gruppe an das ungeladene proximale Nickelatom (diamagnetisches Ni_p^0 -Intermediat) des A-Clusters der Acetyl-CoA Synthase (ACS) transferiert (Abbildung 28), das daraufhin zwei-fach positiv geladen ist. Als zweite Gruppe wird Kohlenstoffmonoxyd an das Ni_p^{2+} gebunden, das durch den Tunnel aus der Kohlenstoffmonoxyd Dehydrogenase (CODH) befördert wurde. Dabei erfährt das aktive Zentrum keinen weiteren Ladungswechsel. Durch eine Kondensation wird auch in diesem Weg Acetyl-Metall gebildet. Die Acetyl Gruppe wird ebenfalls mit Coenzym A verbunden und Acetyl~CoA verlässt das aktive Zentrum der ACS. Über die bereits in Abbildung 27 gezeigten Schritte wird Energie in Form von ATP und Acetat als Endprodukt gebildet. Die beiden Mechanismen werden kontrovers diskutiert (Evans 2005, Riordan 2004) und sind bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Wie bereits oben erwähnt, ist Acetat nicht das bevorzugte Produkt aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff. Aus diesen beiden Molekülen wird Methan und Wasser gebildet, sobald hydrogenotrophe methanogene Archaea anwesend sind. Das Vorkommen und die Bildung von Methan auf der Erde werden im nächsten Kapitel beschrieben.

1.9 Ursprung und Kreislauf von Methan auf der Erde

Erste wissenschaftliche Beschreibungen (Volta 1776) eines brennbaren Gases, welches in beachtlichen Mengen aus Seen, Teichen und Flüssen entweicht, brachte die Wissenschaftler des 18. Jahrhunderts auf die Spur der einfachsten aller Kohlenwasserstoffverbindungen. Eine erste chemische Charakterisierung dieser Verbindung, welche aus einem Kohlenstoffatom und vier Wasserstoffatomen (CH_4 = Methan) besteht, erfolgte im frühen 19. Jahrhundert durch William Henry. Béchamp wies 1868 den biogenen Ursprung von Methan nach (Lawrie und Pickett 1961).

Methan (CH_4 , Ferry 1997) ist der einfachste Kohlenwasserstoff Verbindung. Die vier Wasserstoffatome umgeben das sp^3 -hybridisierte Kohlenstoffatom tetraedrisch. Aufgrund dieses Aufbaus und der apolaren C-H Bindungen ist Methan sehr stabil und reaktionsträge. Das einfachste Alkan ist farb- und geruchlos und aufgrund seines niedrigen Siedepunktes ($-161,5\text{ °C}$) bei Raumtemperatur gasförmig. Neben einigen anderen kurzkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen (Ethan, Propan, Butan u.a.) ist Methan mit mindestens 75 % der Hauptbestandteil von Erdgas. In der frühen Erdgeschichte (vor etwa 2,7 Milliarden Jahren) war Methan vermutlich auch ein wesentlicher Bestandteil der Atmosphäre (Chang *et al.* 1983, Khalil und Rasmussen 1987, Harriss 1989). Mit der Zunahme der Sauerstoffkonzentration infolge der Photosynthese nahm der Methangehalt jedoch stark ab. In den letzten 3000 Jahren betrug die Methankonzentration in der Atmosphäre nur etwa 0,8 ppmv (Volumenmischungsverhältnis), bevor sie seit 250 bis 300 Jahren kontinuierlich um ca. 1 % pro Jahr auf den heutigen Wert von etwa 1,7 ppmv Anstieg (Blake und Rowland 1988; zitiert in Cicerone und Oremland 1988). Dies wird hauptsächlich auf menschlichen Einfluss zurückgeführt, unter anderem auf Methanemissionen aus der Industrie, der Viehhaltung und vor allem aus dem Reisanbau (Ehhalt 1974). Dieser kontinuierliche Anstieg scheint sich jedoch langsam wieder zu verringern (Etiope und Klusman 2002).

Methan absorbiert die von der Erdoberfläche zurückstrahlende Infrarotstrahlung und trägt so zur globalen Erwärmung der Atmosphäre bei (Bolin *et al.* 1989). Aufgrund seiner Absorptionscharakteristik ist Methan ein 26-mal effektiveres Treibhausgas als CO₂ (Lieleveld *et al.* 1992) und hat eine Verweilzeit von 12 Jahren (Solomon *et al.* 2007).

Tabelle 7: Quellen von emittiertem Methan (aus Liu und Withman 2008; Druckerlaubnis von John Wiley and Sons vom 24.08.2012)

Methanquellen	Methanentstehung [Tg CH₄ a⁻¹]	Prozentual [%]
Natürliches Vorkommen		
Feuchtbiootope	92-237	15-40
Termiten	20	3
Ozeane	10-15	2-3
Methanhydrate	5-10	1-2
Zwischensumme	127-282	21-47
Anthropogenes Vorkommen		
Wiederkäuer	80-115	13-19
Energieherstellung	75-110	13-18
Reiskultivierung	25-100	7-17
Deponien	35-73	6-12
Verbrennung von Biomasse	23-55	4-9
Müllentsorgung	14-25	2-4
Zwischensumme	267-478	45-80
Summe	500-600	-

Zurzeit werden jährlich schätzungsweise 600 Tg Methan auf der Erde produziert (Tabelle 7, Liu und Withman 2008). Mehr als 60 % davon gelangen nicht in die Atmosphäre, sondern werden vorher von Mikroorganismen oxidiert (Reeburgh 1996, Reeburgh *et al.* 1993). In der Atmosphäre werden wiederum 90 % des dort angelangten Methans durch Hydroxylradikale (•OH) chemisch oxidiert (Ehhalt 1974, Lieleveld *et al.* 1992).

1.9.1 Die natürliche Bildung von Methan

Nur ein geringer Teil des weltweit vorkommenden Methans entsteht aus Kohlenstoffquellen nicht biologischer Herkunft (Kapitel 1.9) als Folge geothermischer (thermogener) Prozesse (Parkes *et al.* 2000, Nikolskaya *et al.* 2001). Vorwiegend wird Methan aus organischem Material biologischen Ursprungs gebildet: zu etwa 20 % durch geochemische und zu 80 % durch mikrobielle Prozesse (Schoell 1988, Bréas *et al.* 2001). Die dafür verantwortlichen Mikroorganismen gehören zum Reich der Archaea (Fox *et al.* 1977, Woese und Fox 1977, Woese *et al.* 1990). Methanogene Archaea sind die einzige bekannte Organismengruppe, die Methan als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels produziert (Balch *et al.* 1979). Bekannt sind

derzeit fünf verschiedene Ordnungen: Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanococcales und Methanopyrales (Woese 1977).

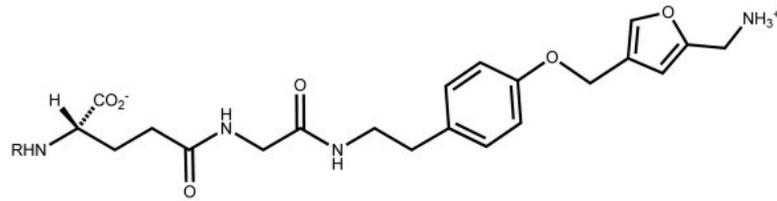
Typische Habitate für Methanogene sind Sumpfgebiete (Zellner *et al.* 1989), Reisfelder (Sakai *et al.* 2007) und Mägen von Wiederkäuern (Paynter und Hungate 1968). Hier werden mehr als 70 % des mikrobiologisch produzierten Methans gebildet (Ehnhalt 1974; Bréas *et al.* 2001). Auch in Termitendärmen (Tokura *et al.* 2000), heißen Quellen (Pagaling *et al.* 2012) und Kläranlagen (Bryant und Boone 1987b) leben methanogene Archaea und tragen zur Methanemission bei. Ein geringerer Anteil von Methan wird mikrobiologisch in Mülldeponien produziert und entsteht durch die Verbrennung von Biomasse. Neben diesen Quellen der rezenten Methanbildung wird zusätzlich in Kohleminen und durch Erdgasaustritte eingelagertes Methan freigesetzt (Reeburgh 1996).

Aufschluss über die Entstehung des Methans kann das Verhältnis der stabilen Isotope des Kohlenstoffs ^{12}C und ^{13}C geben, welches als $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Vergleich zu dem Pee Dee Belemnit-Standard (Schramm 1999) angegeben wird. Mikrobiologische Prozesse diskriminieren aufgrund des kinetischen Isotopeneffekts gegen das schwerere Isotop. Die daraus resultierende Anreicherung an ^{12}C führt zu sehr negativen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (-110 ‰ bis -50 ‰). Thermogen entstandenes Methan liegt dagegen bei -50 ‰ bis -20 ‰ (Whiticar 1999). Die Bestimmung des Anteils von Deuterium (Whiticar *et al.* 1986) im Wasserstoff des Methans (δD -Wert) kann weiteren Aufschluss über den Entstehungsprozess des Methans durch Methanogenese (Baptiste *et al.* 2005) vorzugweise aus H_2/CO_2 oder Acetat geben. Anhand des Anteils des instabilen ^{14}C -Isotops lässt sich auch das Alter des Methans bestimmen (Cicerone und Oremland 1988).

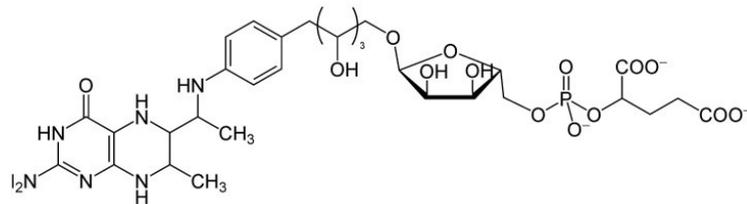
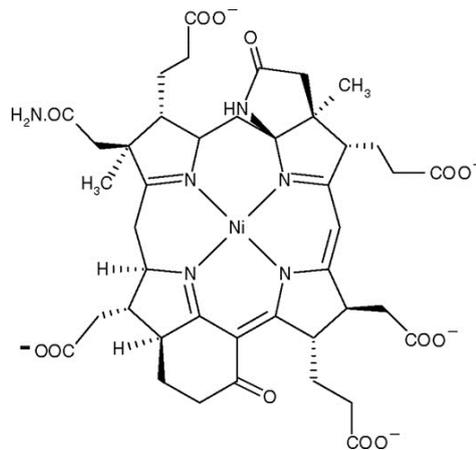
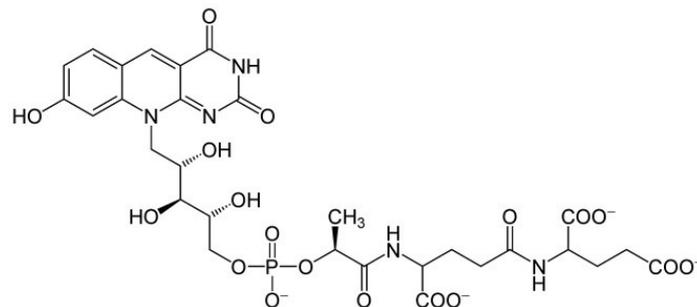
1.9.1.1 Methanogenese

Bei der Methanogenese fungieren Carbonate, wie Kohlenstoffdioxid (CO_2) oder Acetat (CO_2 , CH_3COO^-) und in selteneren Fällen Methanol (CH_3OH), Methylamine und Methylsulfide als Elektronenakzeptor, H_2 als Elektronendonator. Während der Methanogenese sind neben spezifischen Enzymen einige ungewöhnliche und speziell in der Methanogenese verwendete Cofaktoren (Abbildung 29) beteiligt.

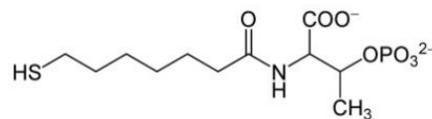
Methanofuran



Tetrahydromethanopterin

F₄₃₀F₄₂₀

Coenzym B (CoB)



Coenzym M (CoM)

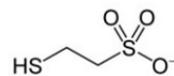
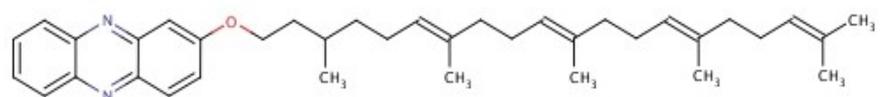
Methanophenazin
(Elektronencarrier,
Tietze 2000)

Abbildung 29: Bei der Methanogenese beteiligte Cofaktoren.

Es wird zwischen hydrogenotropher, methylotropher und acetoklastischer Methanogenese unterschieden. Die folgende Abbildung 30 zeigt eine schematische Darstellung der

Methanogenese mit verschiedenen Substraten, direkt beteiligten Enzymen und Cofaktoren (Bapteste *et al.* 2005).

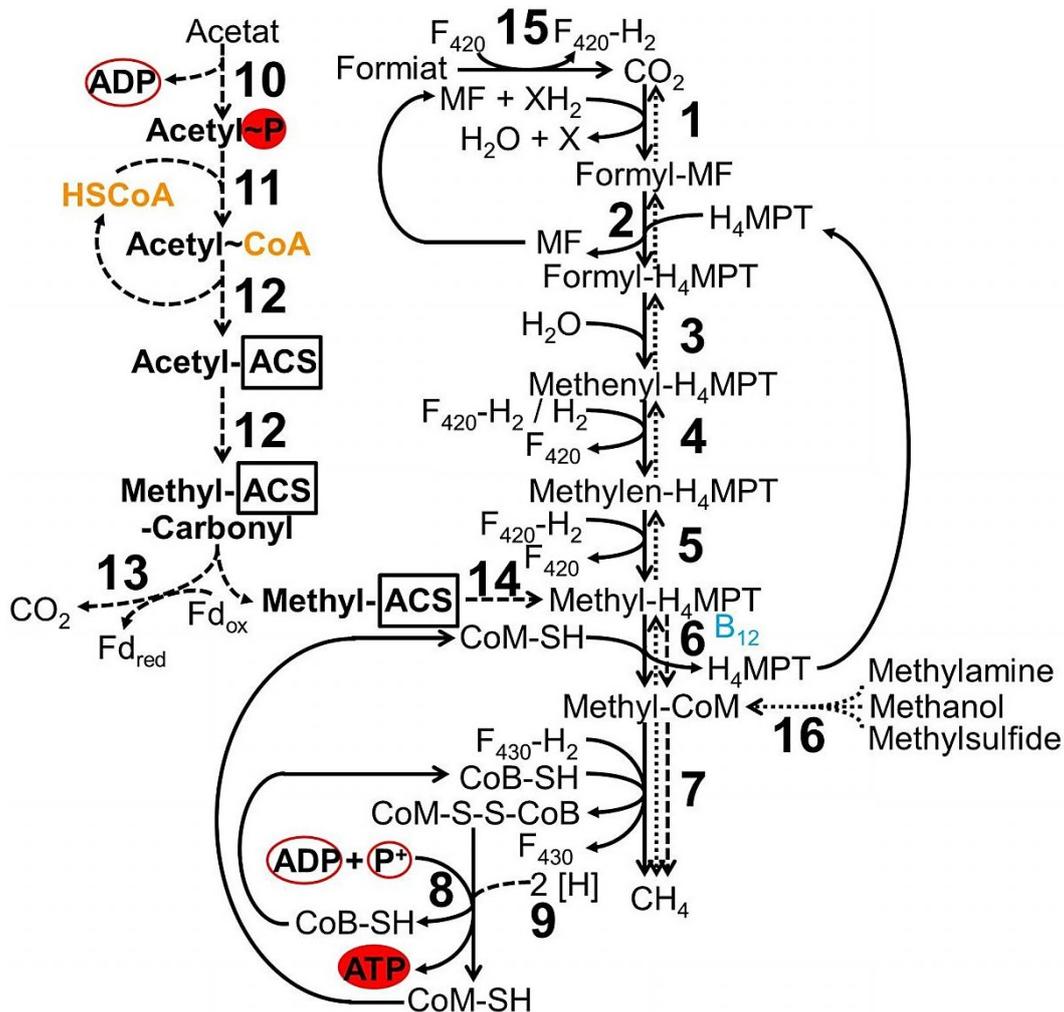


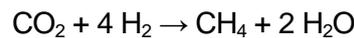
Abbildung 30: Methanogenese (Schema); Pfeile = hydrogenotroph; unterbrochene Pfeile = acetoklastisch; gepunktete Pfeile = methylotroph; 1 Formyl-MF Dehydrogenase; 2 Formyl-MF:H₄MPT Formyltransferase; 3 Methenyl-H₄MPT Cyclohydrolase; 4 F₄₂₀ oder H₂ reduzierende Methylen-H₄MPT Dehydrogenase; 5 Methylen-H₄MPT Reduktase; 6 Methyl-H₄MPT Methyltransferase; 7 Methyl-Coenzym M Reduktase I oder II; 8 H₂:CoB-S-S-CoM-Oxidoreduktase; 9 Heterodisulfidreduktase; 10 Acetatkinase; 11 Phospho Transacetylase; 12 Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (CODH/ACS); 13 Carboxyldehydrogenase; 14 Methyltransferase; 15 F₄₂₀-abhängige Formiat Dehydrogenase; 16 Methyl-H₄MPT-CoM-Methyltransferase MF = Methanofuran; H₄MPT = Methanopterin; F₄₂₀ und F₄₃₀ = Elektronen-überträger Faktor ₄₂₀ und ₄₃₀; CoM = Coenzym M, CoB = Coenzym B; Fd_{red} = reduziertes Ferredoxin; Fd_{ox} = oxidiertes Ferredoxin; B₁₂ = Cofaktor B₁₂; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; nach Bapteste *et al.* (2005, Druckerlaubnis von Creative Commons).

Die Bildung von ATP erfolgt durch Aufbau eines Protonen- beziehungsweise Natriumgradienten. Während endergonen Prozessen erfolgt ein Einstrom von Natriumionen oder Protonen und bei exergonen Reaktionen strömen Natriumionen oder Protonen ein. Die hydrogenotrophe Methanogenese kann als anaerobe Atmung gesehen werden, die sich Carbonatatmung nennt. Die acetoklastische Methanogenese kann auch als Gärung betrachtet werden, denn das Substrat ist sowohl Elektronendonator wie auch -akzeptor. Der Stoffwechsel der Methanogenese ist komplexer als bei den meisten anderen anaeroben Atmungen z. B. durch die hohe Zahl komplexer Cofaktoren.

Folgend werden die hydrogenotrophe, acetoklastische sowie die methylotrophe Methanogenese unter anderem anhand des in Abbildung 29 gezeigten Schemas beschrieben.

1.9.1.1.1 Hydrogenotrophe Methanogenese

Zu hydrogenotrophen methanogenen Archaea zählen die Familien *Methanobacteriaceae*, *Methanococcaceae* und *Methanomicrobieae*. Die folgende Gleichung gilt für die Bildung von Methan aus Wasserstoff (H₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂).

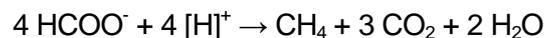


$$\Delta G^{\circ} = -135 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}_4$$

$$\Delta G' = -17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ bei } 10^{-5} \text{ bar Wasserstoffpartialdruck}$$

Formel 18: Bildung von Methan aus Wasserstoff (H₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008) und $\Delta G'$ bei 10⁻⁵ bar Wasserstoffpartialdruck (Schlegel und Fuchs 2007).

Einige Arten der Gattungen *Methanobacterium* und *Methanospirillum* sind befähigt, Methan aus Formiat (HCOO⁻) zu bilden.

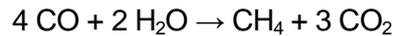


$$\Delta G^{\circ} = -130 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}_4$$

Formel 19: Bildung von Methan, Kohlenstoffdioxid und Wasser aus Formiat und Wasserstoffionen mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).

Formiat wird durch eine Cofaktor F₄₂₀-abhängige Formiat Dehydrogenase zu Kohlenstoffdioxid oxidiert (Ferry und Wolfe 1976, Schauer und Ferry 1982). Dieses Kohlenstoffdioxid durchläuft den Stoffwechselweg der hydrogenotrophen Methanogenese (schwarze Pfeile, Abbildung 30).

Methanothermobacter thermautotrophicus (Zeikus und Wolfe 1972), *Methanosarcina barkeri* (Bryant und Boone 1987a, Daniels *et al.* 1977, Krzycki *et al.* 1982) und *Methanosarcina acetivorans* (Rother und Metcalf 2004, Galagan *et al.* 2002) wachsen auf Kohlenstoffmonoxid (CO) und bilden daraus Methan (Oelgeschläger und Rother 2008).



$$\Delta G^\circ = -130 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$$

Formel 20: Bildung von Methan und Kohlenstoffdioxid aus Kohlenstoffmonoxid und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).

Methanoculleus thermophilum (Maestrojuán *et al.* 1990, Rivard und Smith 1982), *Methanogenium organophilum* (Widdel 1986), *Methanobacterium palustre* (Berk und Thauer 1997, Bleicher und Winter 1991, Zellner *et al.* 1989), *Methanogenium liminatans* (Berk und Thauer 1997, Bleicher und Winter 1991, Zellner *et al.* 1990), *Methanobacterium bryantii* M. o. H. G. (Bleicher *et al.* 1989) *Methanospirillum hungatei* (Ferry *et al.* 1974) und *Methanobacterium bryantii* (Balch *et al.* 1979) verwerten auch zweiwertige Alkohole als Wasserstoffdonoren. Beispielsweise wird 2-Propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) durch eine Co-Faktor F_{420} -abhängige sekundäre Alkohol Dehydrogenase zu Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) oxidiert, wobei der gebildete Wasserstoff auf den Co-Faktor F_{420} übertragen wird. Bei Standardbedingungen ist die Umsetzung von 2-Propanol zu Aceton und Wasserstoff endergon ($\Delta G^\circ = + 24,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, Widdel 1986). Diese Reaktion ist exergon, wenn sie an die Methanbildung aus Kohlenstoffdioxid gekoppelt ist (Widdel und Wolfe 1989).



$$\Delta G^\circ = -37 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$$

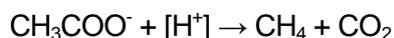
Formel 21: Bildung von Methan, Aceton und Wasser aus Kohlenstoffdioxid und 2-Propanol mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).

Methanogenium organophilum (Widdel 1986, Frimmer und Widdel 1989, Widdel *et al.* 1988), *Methanobacterium palustre* (Bleicher *et al.* 1989) wachsen zudem mit Ethanol als Wasserstoffdonor. Beide methanogenen Archaea besitzen eine dafür NADP^+ -abhängige sekundäre Alkohol Dehydrogenase und eine F_{420} -abhängige NADP Reductase (Berk und Thauer 1997). Die NADP^+ -abhängige sekundäre Alkohol Dehydrogenase oxidiert Ethanol über Acetaldehyd zu Acetat. Das oxidierte NADP^+ wird durch die F_{420} -abhängige NADP Reductase mit dem Co-Faktor F_{420} reduziert. Der reduzierte Co-Faktor F_{420} stammt aus dem Schritt der Dehydrierung des Methenyl- H_4MPT zu Methylen- H_4MPT (Abbildung 30, Hendrickson und Leigh 2008, Hartzell *et al.* 1985) und wird somit wieder oxidiert, so dass er in einem weiteren Durchgang der Methanogenese eingesetzt werden kann.

Eingeleitet wird die hydrogenotrophe Methanogenese (siehe schwarze Pfeile, Abbildung 30), indem Kohlenstoffdioxid in Form von Formaldehyd an Methanofuran (MF, Jones *et al.* 1985) fixiert und enzymatisch von der membranständigen Formylmethanofuran-Dehydrogenase (1 in Abbildung 30, Jablonski *et al.* 1990) unterstützt, reduktiv als Formyl-Methanofuran (Formyl-MF) gebunden wird. In der Formylmethanofuran-Dehydrogenase ist ein Molybdän-Cofaktor (beziehungsweise Wolfram bei beispielsweise *Methanothermobacter thermoautotrophicus*)

enthalten. Die Aktivität der Formylmethanofuran-Dehydrogenase bewirkt einen Natriumioneneinstrom in die Zelle, der mit einem Natriumionenausstrom aus der Zelle durch den Cofaktor B12 der Methyl-H₄MPT-Transferase (6 in Abbildung 30) gekoppelt ist. Eine Formyl-Methanofuran-Tetrahydromethanopterin-Formyltransferase (2 in Abbildung 30, Jablonski *et al.* 1990) überträgt die Formylgruppe vom Formyl-Methanofuran auf Tetrahydromethanopterin (H₄MPT, Jones, *et al.* 1985). Die Formylgruppe des 5-Formyl-H₄MPT wird schrittweise zum Methylrest reduziert. Eine Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase (3 in Abbildung 30, Jablonski *et al.* 1990) bindet ein Wassermolekül an die Formylgruppe des Formyl-H₄MPT's. Das entstandene Methenyl-H₄MPT wird von einem Cofaktor F₄₂₀-H₂ zu Methylen-H₄MPT reduziert. Der Cofaktor F₄₂₀-H₂ (Eirich *et al.* 1979) wird von einer F₄₂₀-reduzierenden-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (4 in Abbildung 30, Hendrickson und Leigh 2008) bereitgestellt. Eine Methylen-H₄MPT-Reduktase (5 in Abbildung 30, Jablonski *et al.* 1990) katalysiert den zweiten Reduktionsschritt mithilfe des Cofaktors F₄₂₀-H₂ zu Methyl-H₄MPT. Die Methylgruppe des Methyl-H₄MPT wird mithilfe des oben erwähnten Natriumionenausstroms über den Cofaktor B12 auf CoM-SH übertragen. Die Methyl-H₄MPT-Methyltransferase (6 in Abbildung 30, Becher *et al.* 1992) katalysiert diesen Schritt. Die Methyl-CoM-Reduktase (7 in Abbildung 30, Thauer und Shima 2007, Ellermann *et al.* 1988, Ermler *et al.* 1997) ermöglicht die HS-CoB-abhängige Reduktion des Methyl-S-CoM zu Methan und CoM-S-S-CoB mithilfe des Nickel enthaltenden Cofaktors F₄₃₀. Methan wird aus der Zelle entlassen und CoM-S-S-CoB dient der H₂:CoB-S-S-CoM-Oxidoreduktase (8 in Abbildung 30, Deppenmeier *et al.* 1990) als terminaler Elektronenakzeptor. Die exergone Reaktion der H₂:CoB-S-S-CoM-Oxidoreduktase regeneriert die Cofaktoren HS-CoB und HS-CoM, welche an die Reduktion von Ferredoxin gekoppelt ist (Thauer *et al.* 2008). Bei *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* und *Methanomicrobiales* wird eine ATP-Synthase von einem Natriumioneneinstrom betrieben, die ATP aus ADP und P_i bildet.

1.9.1.1.2 Acetoklastische Methanogenese



$$\Delta G^\circ = -33 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Acetat}$$

Formel 22: Bildung von Methan aus Acetat und Wasserstoff (acetoklastische Methanogenese) mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).

Acetoklastische methanogene Archaea gehören ausschließlich der Familie *Methanosarcinaceae* an. *Methanosarcina* sind befähigt 0,2-1,2 mmol L⁻¹ und *Methanosaeta* 7-70 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Acetat zu verwenden (Jetten *et al.* 1990). Acetat gelangt in die Zelle und wird zunächst über den umgekehrten Acetyl-CoA-Weg (Kapitel 1.8) zu Acetyl-CoA umgesetzt (Ragsdale 2008). Acetat wird als Erstes unter ATP-Hydrolyse von einer Acetatkinase (10 in Abbildung 30, Ding *et al.* 2005, Ingram-Smith *et al.* 2005; Gorrell *et al.* 2005) zu Acetyl-P aktiviert. Eine

Phosphotransacetylase (11 in Abbildung 30, Iyer *et al.* 2004) katalysiert die Übertragung der aktivierten Acetylgruppe auf den Cofaktor HSCoA. Eine bifunktionale Carboxyl-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (12 in Abbildung 30, *M. barkeri*, Gong *et al.* 2008, *M. thermophila*, Grahame *et al.* 2005) ist das Schlüsselenzym des Wood-Ljungdahl-Wegs, welches insgesamt fünf aktive Zentren mit jeweils Nickel und Eisen-Schwefel-Clustern enthält. Die Acetyl-CoA-Synthase in *Methanosarcina* spaltet schrittweise Acetyl-CoA zu CoA, wobei eine Carboxylgruppe übergangsweise am Nickel des A-Clusters und eine Methylgruppe gebunden werden. Die gebundene Carboxylgruppe wird auf eine Carboxyl-Dehydrogenase (13 in Abbildung 30) übertragen und dort unter Beteiligung von Wasser und Ferredoxin zu CO₂ oxidiert. Die freigesetzten Elektronen werden vom Ferredoxin auf ein membranständiges Methanophenazin (Beifuss *et al.* 2000) übertragen. Die an der Acetyl-CoA-Synthase gebundene Methylgruppe wird durch membranständige Methyltransferasen (14 in Abbildung 30) zunächst auf Tetrahydromethanopterin und weiter durch eine weitere Methyltransferase (6 in Abbildung 30) auf CoM übertragen. Beim Methyltransfer wird Energie in Form eines Protonenbeziehungsweise Na⁺-Gradienten konserviert. Die weiterführenden Schritte der acetoklastischen Methanogenese (gestrichelte Pfeile, Abbildung 30) sind identisch zu den Reaktionen der Methanbildung aus H₂ und CO₂. Die Heterodisulfidreduktase (9 in Abbildung 30) bei *Methanosarcina* ist im Gegensatz bei *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* und *Methanomicrobiales* membranständig und mit dem Aufbau eines transmembranen Protonengradienten mithilfe von Methanophenazin verbunden, welcher eine ATP-Synthase zur Herstellung von ATP bewegt.

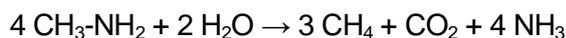
1.9.1.1.3 Methylotrophe Methanogenese

Manche der zu den Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosphaera* zähligen disproportionieren Methanol, Methylamide beziehungsweise Methylsulfid zu Methan. Im Folgenden sind die Reaktionsgleichungen mit freier Enthalpie ΔG°' (Liu und Whitman 2008) aufgeführt.



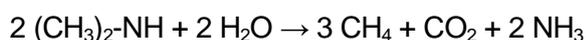
$$\Delta G^{\circ'} = -105 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 23: Bildung von Methan aus Methanol mit der freien Enthalpie ΔG°'



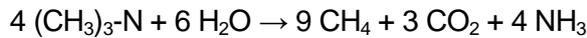
$$\Delta G^{\circ'} = -75 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 24: Bildung von Methan aus Methylamin und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG°'



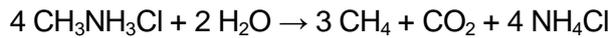
$$\Delta G^{\circ} = -73 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 25: Bildung von Methan, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak aus Dimethylamin und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG°



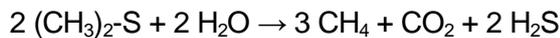
$$\Delta G^{\circ} = -74 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 26: Bildung von Methan, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak aus Trimethylamin und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG° .



$$\Delta G^{\circ} = -74 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

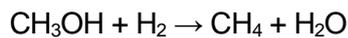
Formel 27: Bildung von Methan, Kohlenstoffdioxid und Ammoniumchlorid aus Methylammoniumchlorid und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).



$$\Delta G^{\circ} = -49 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 28: Bildung von Methan aus Dimethylsulfid und Wasser mit der freien Enthalpie ΔG° .

Methanosphaera cuniculi (Biavati *et al.* 1988), *Methanosphaera stadtmaniae* (Miller und Wolin 1985, Fricke *et al.* 2006) und *Methanimicrococcus blatticola* (Sprenger *et al.* 2000) bilden Methan aus Methanol mit Wasserstoff als Elektronendonator, wobei *Methanimicrococcus blatticola* auch Methan aus Methylaminen bilden kann (Formel 24 bis Formel 27).



$$\Delta G^{\circ} = -113 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Formel 29: Bildung von Methan aus Methanol und Wasserstoff mit der freien Enthalpie ΔG° (Liu und Whitman 2008).

Der Ablauf der methylotrophen Methanogenese wird am Beispiel des Methanols erklärt (siehe gestrichelte Pfeile in Abbildung 30). Eine membranständige Methyl- $\text{H}_4\text{MPT-CoM}$ -Methyltransferase (16 in Abbildung 30) überträgt als Erstes die Methylgruppe eines Methanols auf HS-CoM. Der Stoffwechsel spaltet sich an dieser Stelle in einen reduktiven und einen oxidativen Zweig auf.

Methyl-S-CoM wird analog zur hydrogenotrophen Methanogenese Methyl-CoM-Reduktase-katalysiert (7 in Abbildung 30) auf HS-CoB übertragen und Methan aus dem Stoffwechsel entlassen. Die folgende Reduktion des Heterodisulfids erfolgt ebenfalls mit einer Heterodisulfid-Reduktase (9 in Abbildung 30).

Der zweite Teil beginnt mit einem Methyltransfer auf Tetrahydromethanopterin durch die membranintegrale Methyl-H₄MPT-CoM-Methyltransferase (6 in Abbildung 30). Darauf folgt die Oxidation entlang des umgekehrten Wegs der Methanogenese bis zum Kohlenstoffdioxid. Die bei der Oxidation des Methylrests anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf das Coenzym F₄₂₀ übertragen. Die Oxidation von F₄₂₀H₂ mithilfe der membranständigen F₄₂₀H₂-Dehydrogenase ist über Elektronenüberträger innerhalb der Membran mit der Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-Co-B gekoppelt. Diese exergone Reaktion ist wiederum mit dem Aufbau eines Protonengradienten verbunden, der zur ATP-Synthese genutzt wird.

1.10 Ziele der vorgelegten Arbeit

In dieser vorliegenden Dissertation sollten anaerobe Bakterien identifiziert und isoliert werden, die bei der syntrophen Oxidation von Propionsäure beteiligt sein können. Zu einem Teil sollte gezeigt werden, inwieweit Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen und propionsäureoxidierender Anreicherungskulturen kultivierbar sind und zum anderen Teil mögliche syntrophe Beziehungen zwischen diesen Mikroorganismen ermittelt werden. Für Co-Kultivierungen mit möglicherweise an dem anaeroben Abbau von Propionsäure beteiligten Bakterien sollten aus NawaRo-Biogasanlagen methanogene Archaea isoliert werden. Auf einer im Rahmen des vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über den Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) geförderten Forschungsvorhabens mit dem Thema ‚Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozesssicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung‘ wurden Propionsäure abbauende Mischkulturen vom Forschungsprojektspartner angereichert basierend auf einem theoretisch Propionsäure versäuerten System. Diese Anreicherungskulturen sollten in dieser Arbeit analysiert werden, um Anhaltspunkte für definierte Co-Kulturen zur Regulierung von mit Propionsäure versäuerten Biogasanlagen zu erhalten. Durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie sollten die Zellmorphologie und die Zellzahl mit mikrobiologischen Methoden bestimmt werden. Die Physiologie von Mischkulturen und methanogener Reinkulturen sollten mithilfe des Angebots unterschiedlicher Substrate chemisch mit HPLC und GC Messungen analysiert werden. Syntrophe Beziehungen zwischen einzelnen Mikroorganismen sollten durch chemische Analysen gezielter Mischkulturen ermittelt werden. Bakterielle und archaeale chromosomale 16S rDNA aus NawaRo-Biogasanlagen sowie eigenisolierter Kulturen sollten mithilfe molekularbiologischer Methoden mit PCR-Methoden mit bakteriellen- als auch *td*-PCR-Methoden mit archaealen Oligonukleotiden vervielfältigt werden. Daraus erhaltene 16S rDNA Fragmente sollten über gelchromatographische Methoden wie DGGE/TGGE und RFLP aufgetrennt respektive eingruppiert und die Arten durch Sequenzierung identifiziert werden. Im Zuge der molekularbiologischen Analyse sollte außerdem gezeigt werden, ob die DNA-Fingerprintmethode SAPD-PCR (Fröhlich und Pfannebecker, 2006, 2007) geeignet ist, um Stämme methanogener Archaea voneinander zu unterscheiden.

2 Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Agarose-Gelelektrophorese-Einheit Gelkammer, Sub Cell Model 96	Bio-Rad, München
Spannungsgeräte Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Power Source	VWR International GmbH, Darmstadt
E122	Consort, Parklaan, Belgien
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia, Berlin
Agarplattendruckbehälter IMW Eigenbau	IMW, Mainz
Anaerobenkulturröhrchen mit Butylstopfen und Loschschraubdeckeln	Ochs, Bovenden/ Lenglem
AnaerobenzeltCoy	Laboratory Products Inc., USA
Autoklaven Tecnomara	Tecnomara, Fernwald
BildbearbeitungssoftwareIrfanView	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Begasungsanlage	Drägerwerk AG und Co. KGaA, Lübeck
Cellulosefilter, 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Dauerkultursystem IMW Eigenbau	IMW, Mainz
Schutzhaube mit Wanne IMW Eigenbau	
Gasdichte Schläuche	Ochs, Bovenden/ Lenglem
Verbindungsstücke, Rückschlagventile	Roth, Karlsruhe
DGGE-Elektrophorese-Einheit (D Gene™ System)	Bio-Rad, München
Gel-Gießstand	
Elektrophoreseapparatur	
Gradientenmischer IMW Eigenbau	IMW, Mainz
Einmalimpfösen	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalkanülen, 0,65 x 30 mm (blau)	Ochs, Bovenden/ Lenglem

Fluoreszenzmikroskopie	
Carl Zeiss Lichtfilter 01	Carl Zeiss, Oberkochen
Keyence BIOZERO BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg
Lichtfilter 435 nm	
Software BZ Viewer	
Gaschromatograph GC-2014	Shimadzu, Duisburg
Injektor DINJ (manuell)	Shimadzu, Duisburg
Säule CarboSieve SII: 3 mm, 100/120 µm, 250 °C	Sigma, München
Wärmeleitfähigkeitsdetektor	Shimadzu, Duisburg
Trärgas Helium [He]	Shimadzu, Duisburg
Software Lab Solution GC	Shimadzu, Duisburg
HPLC-System (organische Säuren)	Shimadzu, Duisburg
Automatischer Probengeber, SIL-20A HT	Shimadzu, Duisburg
Entgaser, DGU-20A3	Shimadzu, Duisburg
Pumpen A und B, LC-20AD	Shimadzu, Duisburg
Controller, CBM-20A	Shimadzu, Duisburg
Vorsäule (in Ofen), Prontosil C18SH	Sigma, München
Ionentauscher-Säule (in Ofen), Prontosil C8SH	Sigma, München
UV-VIS Detektor, SPD-10A VP	Shimadzu, Duisburg
RI-Detektor, ERC-7515B	Shimadzu, Duisburg
Rechner, DELL Optiplex X620	Dell, Frankfurt
Software, LC-Solution	Shimadzu, Duisburg
HPLC-System (Aminosäuren)	Shimadzu, Duisburg
Automatischer Probengeber, SIL-20AC HT	Shimadzu, Duisburg
Entgaser, DGU-20A ₃	Shimadzu, Duisburg
Pumpen A und B, LC-20AD	Shimadzu, Duisburg
Controller, CBM-20A	Shimadzu, Duisburg
Säule (in Ofen), Prontosil NC (250x4,6 mm), Spheribond ODS 1 5,0 µm	Sigma, München
Fluoreszenzdetektor, RF-535	Shimadzu, Duisburg
Rechner, DELL Optiplex X620	Dell, Frankfurt
Software, LC-Solution	Shimadzu, Duisburg

HPLC-System (Zucker)	Shimadzu, Duisburg
Automatischer Probengeber, SIL-10ADVP	Shimadzu, Duisburg
PumpeCC-10ADVP	Shimadzu, Duisburg
Säule (in Ofen), Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm	Bio-Rad Laboratories, München
RI-Detektor, 156	Beckmann
DruckerC-R8A	Shimadzu, Duisburg
Inkubatoren 2736	Köttermann, Uetze/ Hänigsen
Modell 400	Memmert GmbH+Co KG, Schwabach
Innova 4360	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Modell G25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Excella E24	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Insulinspritzen 1 mL, 10 mL	Ochs, Bovenden/ Lenglern
Phasenkontrastmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Phylogenetische Analysen arb	Technische Universität München
blastn (<i>online tool</i>)	National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Bethesda USA
ClustalW (<i>online tool</i>)	European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK
GeneDoc	Nicholas und Nicholas, 1997
Mega 4.1 (beta)	Tamura <i>et al.</i> , 2007, Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, USA
Tree View 1.6.6	Roderic, D. M. Page, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Glasgow, UK
WU-BLAST (<i>online</i>)	European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK
Polycarbonat-Membranrundfilter (25 mm Durchmesser, 0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
PräsentationsbearbeitungssoftwarePowerpoint	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Serumfischen 1 L, 0,5 L, 0,1 L	Ochs, Bovenden/ Lenglern
TabellenkalkulationssoftwareExcel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

TGGE System	Biometra, Göttingen
Gelgießstand	
Elektrophorese Apparatur	
Thermocycler	
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Wirbelmixer Vibrofix VF1 Electronic	Ika Labortechnik, Staufen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Typ 1083	
Typ1003	
Vakuumisiergeräte	Eppendorf, Hamburg
Speedvac	
Membranpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin, Berlin
Zentrifugen	
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Cryofuge 5000	Heraeus, Hanau
Rotor 5260	
Zentrifugationsfilter PES-Membran, Porengröße: 3K	VWR International GmbH, Darmstadt

2.2 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (40 %)	Roth, Karlsruhe
Agar	Hartge, Hamburg
Agarose: peqGold Standard-Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Butanol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, München
Cysteinhydrochlorid Monohydrat	Roth, Karlsruhe
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)Oktan)	Sigma, München
Dansylchlorid (1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfonylchlorid)	Sigma, München
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Fluka, Neu-Ulm

DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe
Di-Ammoniumhydrogencitrat	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Sigma, München
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidumbromid ≥ 98 %	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, München
Formiergas 95/5	Westfalen AG, Münster
Fumarat (<i>rans</i> -Ethyldicarbonsäure)	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt (Typ 900)	Hartge, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kohlenstoffdioxid	Westfalen AG, Münster
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Mangansulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumdisulfid Nonahydrat	Sigma, München
Natronwasserglas 35 %	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 80 %	Merck, Darmstadt
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Hartge, Hamburg
Resazurin (7-Hydroxy-3 <i>H</i> -phenoxazin-3-on-10-oxid)	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Stickstoff	Westfalen AG, Münster
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	Roth, Karlsruhe

TritonX®-100 (Polyethylenglycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-Phenylether)	Merck, Darmstadt
Tween 80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat)	Merck, Darmstadt
Wasser (deion.): Milli RO Plus 30	Millipore, Eschborn
Wasser (doppelt deion.): Milli-Q Plus 185	Millipore, Eschborn
Wasserstoff (80 %), Kohlenstoffdioxid (20 %)	Westfalen AG, Münster

2.3 Biochemikalien, Enzyme und Kits

2.3.1 Biochemikalien

Ampicillin	Sigma, München
Bacitracin	Serva, Heidelberg
Colistinsulfat	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard (0,5 µg µL ⁻¹)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ <i>DNA Ladder Mix</i> SM0331	
dNTP-Mix (je 10 mmol L ⁻¹)	Peqlab, Erlangen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	
Gentamycin	Sigma, München
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mmol L ⁻¹)	Peqlab, Erlangen
MassRuler™ (6 x) <i>Loading Dye Solution</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Oligonukleotide (100 µM):	Eurofins-MWG, Ebersberg
PCR-Primer (100 pmol)	MWG-Operon, Köln
PCR-Puffer (10 x)	Peqlab, Erlangen
Rifampicin	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Valinomycin	Roth, Karlsruhe
Vancomycin	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Roth, Karlsruhe

2.3.2 Enzyme

Lysozym aus Hühnereiweis (75,579 U)	Sigma, München
Proteinase K (>600 mAU mL ⁻¹)	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase (5 U µL ⁻¹)	Peqlab, Erlangen
HaeII/ BsuRI (20000 U)	New England Biolabs, Massachusetts
HaeIII (10000 U)	New England Biolabs, Massachusetts

2.3.3 Kits

DNA-Isolierung

DNeasy [®] Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
GeneMATRIX Soil Purification Kit	Roboklon GmbH, Berlin
GeneMATRIX Stool Purification Kit	Roboklon GmbH, Berlin
QIAamp [®] DNA Stool Mini Kit	Qiagen, Hilden

Klonierung

TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
---	----------------------------

PCR-Produktaufreinigung

QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
--	----------------

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Zur Berechnung der mittleren Schmelztemperatur (T_m) der synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurde die Anzahl (n) an Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) berücksichtigt. Dabei ist s die Menge aller Nucleoside der Sequenz. Formeln zur T_m -Berechnung (Eurofins MWG Operon, Köln).

Oligonukleotid kleiner als 15 Basen:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 2(n_A + n_T) + 4(n_G + n_C)$$

Oligonukleotid größer als 15 Basen:

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69.3 + \left[\frac{41(n_G + n_C)}{s - \left(\frac{650}{s}\right)} \right]$$

Tabelle 8: Zur Sequenzierung bakterieller 16S rDNA verwendete synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid 100 pmol	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C] ^a
BSF8 ¹ (forward)	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	50	57,3
BSR1541 ¹ (reverse)	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	20	60	61,4
Eubac5 (forward)	AGA GTT TGA TCM TGG CT	16	50	54,1
Eubac3 (reverse)	AGA AAG GAG GTG ATC C	17	44	53,5
Eub519fGC (forward)	[CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CC] CAG CAG CCG CGG TAA TA	55	78	88,5
Eub519f (forward)	CAG CAG CCG CGG TAA TA	17	59	50
Eub1070r (reverse)	AGC TGA CGA CAG CCA T	16	56	46

¹ Coton und Coton 2005, Wilmotte *et al.* 1993

^a Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tabelle 9: Zur Sequenzierung der 16S rDNA methanogener Archaea verwendete synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid 100 pmol	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C] ^a
Ar1000f ¹ (forward)	AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	19	57,9	62,32
GCAr1000f (forward)	[CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CC] AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	57	40,4	91,37
Ar1500r ¹ (reverse)	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	19	42,1	55,85
Met86f ² (forward)	GCT CAG TAA CAC GTG G	16	56,25	56,71
Met1340r ² (reverse)	CGG TGT GTG CAA GGA G	16	62,5	59,28

^a Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers, ¹ Yanagita *et al.* 2000, Tatsuoka *et al.* 2007, ² Wright und Pimm 2003

Tabelle 10: Zur SAPD-PCR verwendete synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid 100 pmol	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [° C] ^a
SAPD-PCR Primer				
A-Not	AGC GGC CGC A	10	80	47,6
C-Not	AGC GGC CGC C	10	90	51,8
G-Not	AGC GGC CGC G	10	90	51,8
T-Not	AGC GGC CGC T	10	80	47,6

a: Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers (Fröhlich und Pfannebecker 2006, Pfannebecker und Fröhlich 2008).

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Klassische DNA-Isolierung

Tabelle 11: Zur klassischen DNA-Isolierung benötigte Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Lagerung
Phenol	Phenol	Lagerung bei 4 °C
Phenol/ Chloroform	1:1	Lagerung bei 4 °C, die Lösung ist für 4 Wochen stabil
Chloroform/ Isoamylalkohol	24:1	Lagerung bei 4 °C, die Lösung ist für 4 Wochen stabil
3 M Natriumacetat	3 M Natriumacetat, pH 5,2	Lagerung bei 4 °C nach 30 minütigem Autoklavieren
TE-Puffer	10 mmol L ⁻¹ Tris - HCl (pH 7,4) 1 mmol L ⁻¹ EDTA (pH 8,0)	Lagerung bei 4 °C nach 30 minütigem autoklavieren

Zellyse-Puffer

TRIS, pH 8,0	20 mmol L ⁻¹
EDTA	2 mmol L ⁻¹
Triton X [®] -100	1,2 %
Deion. Wasser	ad 50 mL
Lysozym (kurz vor Gebrauch lösen)	20 mg mL ⁻¹

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	1,0 %, 1,5 %, 2,5 % (w/v)
Natronwasserglas 35 %	0,1 % (v/v)
1 x TBE-Puffer (pH 8,3)	

APS-Lösung (1 M)

Ammoniumpersulfat	0,228 g
deion. Wasser	ad 1 mL

DNA-Färbelösung

Ethidiumbromid (10 mg mL ⁻¹)	35 µL
deion. Wasser	500 mL

TAE-Elektrophoresepuffer (50 x, pH 7,4)

TRIS	121,00 g
Essigsäure	28,55 g
EDTA 2 H ₂ O	9,30 g
Deion. Wasser	ad 500,00 mL

TBE-Elektrophoresepuffer (10 x, pH 8,3)

TRIS	890 g
Borsäure	890 g
EDTA 2 H ₂ O	20 g
Natriumhydroxid	0,1 %
Deion. Wasser	ad 1000 mL

2.5.3 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese

Tabelle 12: Zusammensetzung eines denaturierenden Gels für eine Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Agenzien	Lösung A 30 % denaturierend	Lösung B 70 % denaturierend	Lösung A 40 % denaturierend	Lösung B 60 % denaturierend
Harnstoff [g]	2,14	5,00	2,85	4,29
Formamid [mL]	2,04	4,76	2,72	4,08
TAE 50fach pH 7,4 [mL]	0,34	0,34	0,34	0,34
Acrylamid/ Bisacrylamid [mL]	2,77	2,77	2,77	2,77
Doppelt deion. W asser [mL]	10,15	5,17	9,6	6,9
1 M APS [μ L]	11	100	100	100
TEMED [μ L]	4	4	4	4
Summe [mL]	15	15	15	15

2.5.4 Temperatur Gradienten Elektrophorese

Tabelle 13: Zusammensetzung eines Maxi-Gels für eine Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)

Agenzien	50 mL
Harnstoff [g]	24,32
TAE (1 x) [mL]	5,00
Polyacrylamid [mL]	7,50
Glycerol [mL]	2,50
Formamid [mL]	10,00
1 M APS [μ L]	0,04
TEMED [μ L]	0,045

2.5.5 DAPI-Färbung

1 mg mL⁻¹ DAPI-Stammlösung Lagerung bei -20 °C, lichtempfindlich

DABCO-Lösung Antibleichmittel, Lagerung bei -20 °C

2.5.6 HPLC-Puffer

Messung organischer Säuren

Puffer A 50 mmol L⁻¹ Phosphorsäure

Puffer B 100 % Methanol

Messung von Zuckern

Puffer 0,013 N H₂SO₄

Messung von Aminosäuren

Puffer A 50 mmol L⁻¹ Natriumacetat, pH 6,3

Puffer B 25 % Methanol

2.5.7 DC-Puffer

	Verhältnis
Butanol, reinst	4
100 % Essigsäure (Eisessig)	1
doppelt deionisiertes Wasser	1

2.6 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten komplexen Nährmedien wurden den digital archivierten Angaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ 2012, Braunschweig) entnommen und teilweise den Bedürfnissen der Mikroorganismen angepasst, außer die Zusammensetzung der Media PI und PIII. Diese Medien wurden von Herrn Dr. Dröge übernommen. Ohne Modifikationen wurden DSMZ Medium 157 für *Wolinella succinogenes*^T DSM1740, DSMZ Medium 846 für *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 und DSMZ Medium 520, sowie DSMZ Medium 1264 zur Kultivierung der propionsäureabbauenden Mischkulturen mit alternativen Substraten verwendet. 1 L des DSMZ Mediums 110 *Clostridium*

sartariforme^T DSM1292 für wurde mit 175 g Fleischextrakt statt 500 g basisch angelöstem Pferde-Hackfleisch, ohne Haeminlösung, sowie ohne K₁- beziehungsweise K₃-Lösung hergestellt. DSMZ Medium 63 wurde mit 2 g Acetat statt Lactat und mit einer Atmosphäre aus 80 % H₂/ 20 % CO₂ hergestellt. Für den Plattenguss wurde jedem Nährmedium 15 g L⁻¹ Bacto-Agar zugegeben. Alle Nährmedien wurden 30 min im Ultraschallbad entgast. Darauf wurden die Medien in eine Anaerobenkammer eingeschleußt und eine kleine Spatelspitze Dithionit eingerührt. Im Zelt wurden die Medien in anaerobe Kulturgefäße aliquotiert und mit Butylstopfen verschlossen, welche mit Schraubdeckeln beziehungsweise Aluminiumkappen fixiert wurden. Aus dem Zelt ausgeschleußt, wurden die Medien mit dem dafür vorgesehenen Gasgemisch (N₂, 80 % N₂/ 20 % CO₂ oder 80 % H₂/ 20 % CO₂) 15 min bei 121 °C autoklaviert. Einigen Medien wurden Spurenelement- und Vitaminlösung zugesetzt. Diese Spurenelement- und Vitaminlösung wurden durch sterile 0,2 µm Cellulosefilter steril filtriert und sind folgend aufgelistet.

1 L Vitaminlösung (DSMZ 2012)

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-Hydrochlorid	10,0 mg
Thiamin-Hydrochlorid x 2 H ₂ O	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nikotinsäure (Vitamin B3)	5,0 mg
Panhotensäure (Vitamin B5)	5,0 mg
Cobalamin (Vitamin B12)	0,1 mg
p-Aminobenzoensäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
deion. Wasser	1000,0 mL

1 L Spurenelementlösung (DSMZ 2012)

Nitrilotriessigsäure (NTA)	12,80 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	1,35 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,10 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g
ZnCl ₂	0,10 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	25,00 mg
H ₃ BO ₃	10,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	24,00 mg
NaCl	1,00 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,12 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	26,00 mg
deion. Wasser	1000,00 mL

Zuerst wurde NTA in 200 mL deionisiertem H₂O gelöst und mit 1 N KOH auf pH 6,5 eingestellt, danach alle Mineralien dazugegeben.

Oben aufgeführte Spurenelement- und Vitaminlösungen wurden für alle Medien außer dem *lysogeny broth*-Medium (unten) und dem DSMZ Medium 334 (Seite) verwendet. Auf den nächsten Seiten sind die modifizierten Medien aufgeführt.

1 L modifiziertes *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium, Bertani 1951)

Hefeextrakt	5,0 g
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10,0 g
NaCl	10,0 g
deion. Wasser	1000,0 mL

Für selektive Agarplatten wurden 100 µg L⁻¹ Ampicillin und 40 µg L⁻¹ x-Gal (40 mg mL⁻¹ in Dimethylformamid) steril filtriert zugegeben.

1 L Medium PI zur Kultivierung anaerober Propionsäureabbauer (pH 6,8 vor Autoklavieren, Dr. Dröge)

KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 g
NaCl	0,4 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	50,0 mg
NH ₄ Cl	0,3 g
NaHCO ₃	4,0 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2,0 mg
Propionsäure	1,5 g (w/v)
Reaktorfiltrat ¹	100,0 mL
Resazurin	1,0 mg
Cystein	0,5 g
Spurenelementlösung (siehe Seite 82)	2,5 mL
Vitaminlösung (siehe Seite 81)	2,5 mL
deion. Wasser	900,0 mL

¹ Gewonnen durch Zentrifugation (Cryofuge 5000, Rotor 5260, 1500 min⁻¹ (500 g)) Filtration von Fermenterinhalt aus Praxisbiogasanlagen durch sterile 0,2 µm Cellulosefilter.

Für das Anreicherungsmedium PIII wurde zusätzlich 0,5 g L⁻¹ Hefeextrakt und 1 g L⁻¹ Formiat zugegeben.

Während ständigem Rühren wurden Medien PI und PIII im Anaerobenzelt 9 mL beziehungsweise 4,5 mL in 15 mL Anaerobenkultivierungsröhrchen und 18 mL in 100 mL Serumflaschen portioniert. Die Atmosphäre wurde vor dem Autoklavieren mit 80 % N₂ + 20 % CO₂ (0,5 bar Überdruck) ausgetauscht.

Für Untersuchungen des Substratverhaltens der propionsäureabbauenden Mischkulturen, wurden dem Medium 40 mmol L⁻¹ Fumarsäure und 5 mmol L⁻¹ Bromoethansulfonsäure zugesetzt.

1 L Medium 287 modifiziert (pH 6,8 vor Autoklavieren, DSMZ 2012)

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂ x H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
Spurenelementlösung (siehe Seite 82)	10,0 mL
Vitaminlösung (siehe Seite 81)	10,0 mL
Reaktorfiltrat ¹	50,0 mL
NH ₄ Cl	2,0 g
Natriumacetat	2,0 g
Resazurin	1,0 mg
NaHCO ₃	4,0 g
L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat	0,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g
deion. Wasser	930,0 mL

¹ Gewonnen durch Zentrifugation (Cryofuge 5000, Rotor 5260, 1500 min⁻¹ (500 g)) Filtration von Fermenterinhalt aus Praxisbiogasanlagen durch sterile 0,2 µm Cellulosefilter.

Während ständigem Rühren wurde Medium 287 im Anaerobenzelt 4,5 mL beziehungsweise 9 mL in 15 mL Anaerobenkultivierungsröhrchen und 18 mL in 100 mL Serumflaschen aliquotiert. Die Atmosphäre wurde vor dem Autoklavieren mit 80 % H₂ + 20 % CO₂ (1 bar Überdruck) ausgetauscht.

Für Substrattests wurden dem modifizierten Nährmedium 287 2,0 g L⁻¹ Formiat (287F), 10 mL L⁻¹ 2-Propanol (287I), 10 mL L⁻¹ Ethanol (287Et) oder 10 mL L⁻¹ Essigsäure (287E) statt 2,0 g L⁻¹ Acetat zugegeben. Für gaschromatographische Messungen wurde dieses Medium ohne Acetat hergestellt. Außerdem wurde ein Minimalmedium (287P) ohne Reaktorfiltrat hergestellt.

1 L Medium 318 modifiziert (pH 6,8 vor Autoklavieren, DSMZ 2012)

KH ₂ PO ₄	0,30 g
NaCl	0,60 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,08 g
NH ₄ Cl	1,00 g
Reaktorfiltrat ¹	50,00 mL
Methanol	5,00 mL
Spurenelementlösung (siehe Seite 82)	10,00 mL
Vitaminlösung (siehe Seite 81)	10,00 mL
KHCO ₃	2,00 g
L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat	0,30 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,30 g
Resazurin	1,00 mg
deion. Wasser	930,00 mL

¹ Gewonnen durch Zentrifugation (Cryofuge 5000, Rotor 5260, 1500 min⁻¹ (500 g)) Filtration von Fermenterinhalt aus Praxisbiogasanlagen durch sterile 0,2 µm Cellulosefilter.

Während ständigem Rühren wurde das Medium 318 im Anaerobenzelt 9 mL beziehungsweise 4,5 mL in 15 mL Anaerobenkultivierungsröhrchen und 18 mL in 100 mL Serumflaschen portioniert. Die Atmosphäre wurde vor dem Autoklavieren mit 80 % N₂ + 20 % CO₂ (0,5 bar Überdruck) ausgetauscht.

1 L Medium 334 modifiziert (pH 6,8 vor Autoklavieren, DSMZ 2012)

KH ₂ PO ₄	0,30 g
NaCl	0,60 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,08 g
NH ₄ Cl	1,00 g
Reaktorfiltrat ¹	50,00 mL
Natriumacetat	6,80 g
Spurenelementlösung (siehe unten)	10,00 mL
Vitaminlösung (siehe unten)	10,00 mL
KHCO ₃	2,00 g
L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat	0,30 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,30 g
Resazurin	1,00 mg
Deion. Wasser	930,00 mL

¹ Gewonnen durch Zentrifugation (Cryofuge 5000, Rotor 5260, 1500 min⁻¹ (500 g)) Filtration von Fermenterinhalt aus Praxisbiogasanlagen durch sterile 0,2 µm Cellulosefilter.

Während ständigem Rühren wurde Medium 334 im Anaerobenzelt 9 mL beziehungsweise 4,5 mL in 15 mL Anaerobenkultuvierungsröhrchen und 18 mL respektive 45 mL in 100 mL Serumflaschen aliquotiert. Die Atmosphäre wurde vor dem Autoklavieren mit 80 % N₂ (0,5 bar Überdruck) ausgetauscht.

1 L Vitaminlösung für Medium 334 (DSMZ 2012)

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-Hydrochlorid	10,0 mg
Thiamin-Hydrochlorid x 2 H ₂ O	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nikotinsäure (Vit. B3)	5,0 mg
Panhotensäure (Vit. B5)	5,0 mg
Cobalamin (Vit. B12)	0,1 mg
p-Aminobenzoensäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
Deion. Wasser	1000,0 mL

1 L Spurenelementlösung für DSMZ Medium 334 (DSMZ 2012)

Nitrilotriessigsäure (NTA)	12,80 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	1,35 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,10 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g
ZnCl ₂	0,10 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	25,00 mg
H ₃ BO ₃	10,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	24,00 mg
NaCl	1,00 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,12 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	26,00 mg
deion. Wasser	1000,00 mL

Zuerst wurde NTA in 200 mL deionisiertem H₂O gelöst und mit 1 N KOH auf pH 6,5 eingestellt, danach wurden alle Mineralien dazugegeben.

2.7 Organismen

In dieser vorliegenden Arbeit wurden eigenisierte Bakterien (Tabelle 16) aus von Herrn Dr. Dröge (PFI, Pirmasens) zur Verfügung gestellten syntroph propionsäureoxidierenden Anreicherungskulturen (Tabelle 14) aus laufenden NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18), eigenisierten methanogenen Archaea (Tabelle 16) aus laufenden NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) und Anreicherungskulturen (Tabelle 15) aus Laborfermentern (Klocke *et al.* 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie und Stämmen von der Stammsammlung der DSMZ (Tabelle 17) verwendet.

Tabelle 14: anaerobe Anreicherungs- und Mischkulturen aus NawaRo-Biogasanlagen (BGA)

Kultur	Herkunft, Betreiber (Ort)
Ap1 ^a	Fermenter, Biogasanlage Arenrath GmbH & Co KG (Arenrath)
Ap1P	Ap1, IMW (Mainz)
Ap1F	Ap1, IMW (Mainz)
Ap1FB	Ap1, IMW (Mainz)
Ap1a ^a	Ap1F, IMW (Mainz)
Ap1b	Ap1FB, IMW (Mainz)
Ap1a63-L	Ap1a, IMW (Mainz)
Ap1a520	Ap1a, IMW (Mainz)
Ap1a1264	Ap1a, IMW (Mainz)
Ap3 ^a	Fermenter, Biogasanlage Arenrath GmbH & Co KG (Arenrath)
Ap3P	Ap3, IMW (Mainz)
Ap3F	Ap3, IMW (Mainz)
Ap3FB	Ap3, IMW (Mainz)
Ap3a	Ap3F, IMW (Mainz)
Ap3b	Ap3FB, IMW (Mainz)
Fp1 ^a	Fermenter, Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (Hochdorf-Assenheim)
Fp1P	Fp1, IMW (Mainz)
Fp1F	Fp1, IMW (Mainz)
Fp1FB	Fp1, IMW (Mainz)
Fp1a ^a	Fp1F, IMW (Mainz)
Fp1b	Fp1FB, IMW (Mainz)
Fp1a63-L	Fp1a, IMW (Mainz)
Fp1a520	Fp1a, IMW (Mainz)
Fp1a1264	Fp1a, IMW (Mainz)
Gp1 ^a	Fermenter, BioEnergie Glahn (Zweibrücken)
Gp1	Gp1, IMW (Mainz)
Gp1F	Gp1, IMW (Mainz)
Gp1FB	Gp1, IMW (Mainz)
Gp1a	Gp1F, IMW (Mainz)
Gp1b ^a	Gp1FB, IMW (Mainz)
Gp1b63-L	Gp1b, IMW (Mainz)
Gp1b520	Gp1b, IMW (Mainz)
Gp1b1264	Gp1b, IMW (Mainz)

^a Kulturen wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

Fortsetzung Tabelle 14

Kultur	Herkunft, Betreiber (Ort)
Wp1 ^a	Fermenter, Hubert Wagner und Sohn GbR (Steinweiler)
Wp1P	Wp1, IMW (Mainz)
Wp1F	Wp1, IMW (Mainz)
Wp1FB	Wp1, IMW (Mainz)
Wp1a	Wp1F, IMW (Mainz)
Wp1b	Wp1FB, IMW (Mainz)
Wp2a63-L	Wp2a, IMW (Mainz)
Wp2a 520	Wp2a, IMW (Mainz)
Wp2a 1264	Wp2a, IMW (Mainz)
Wp2 ^a	Fermenter, Hubert Wagner und Sohn GbR (Steinweiler)
Wp2	Wp2, IMW (Mainz)
Wp2F	Wp2, IMW (Mainz)
Wp2FB	Wp2, IMW (Mainz)
Wp2a ^a	Wp2F, IMW (Mainz)
Wp2b	Wp2FB, IMW (Mainz)

^a Kulturen wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

Tabelle 15: anaerobe Anreicherungskulturen aus Laborfermentern

Kultur	Herkunft, Betreiber (Ort)
LFP1 ^a	mesophiler Laborfermenter, ATB Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Potsdam)
LFP2 ^a	mesophiler Laborfermenter, ATB Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Potsdam)
LFP3 ^a	thermophiler Laborfermenter, ATB Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Potsdam)
LFP4 ^a	thermophiler Laborfermenter, ATB Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Potsdam)

^a Kulturen wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

Tabelle 16: Eigenisolierte Bakterien und methanogene Archaea aus Biogasanlagen (BGA) und Laborfermentern

Spezies^a	Herkunft (Ort)	Isoliert aus
<i>Clostridium sartagoforme</i> Stamm Ap1a520	Arenrath ¹	Fermenter
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BEG1	Zweibrücken ²	Fermenter
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm HWS1	Steinweiler ³	Fermenter
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1	Potsdam ⁴	Laborfermenter
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1	Hochdorf-Assenheim ⁵	Fermenter
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1	Hochdorf-Assenheim ⁵	Fermenter
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm BEGN	Zweibrücken ²	Nachgärer
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm HWS1.1	Steinweiler ³	Fermenter
<i>Methanomethylovorans sp.</i> Stamm LFP3.1	Potsdam ⁴	Laborfermenter
<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm BEG4	Zweibrücken ²	Fermenter
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1	Steinweiler ³	Fermenter
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3	Zweibrücken ²	Fermenter
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm LFP2.1	Potsdam ⁴	Laborfermenter
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm TAF1.2	Hochdorf-Assenheim ⁵	Fermenter
<i>Methanosarcina siciliae</i> Stamm BEGN2	Zweibrücken ²	Nachgärer
<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> Stamm Fp1a520	Hochdorf-Assenheim ⁵	Fermenter

^a Eigenisolate wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben. ¹ Biogasanlage Arenrath GmbH & Co KG = A, ² BioEnergie Glahn = BEG, ³ Hubert Wagner und Sohn GbR = HWS, ⁴ Laborfermenter (Klocke *et al.*, 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e. V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie = LFP, ⁵ Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR = TAF

Tabelle 17: Verwendete Stämme aus der Stammsammlung der DSMZ (Braunschweig)

Stamm^a	Spezies	Herkunft	Medium (DSMZ 2012)
DSM12261 ^T	<i>Aminobacterium colombiense</i>	DSMZ	DSMZ 846
DSM1292 ^T	<i>Clostridium sartagoforme</i>	DSMZ	DSMZ 110, modifiziert
DSM11263 ^T	<i>Geovibrio thiophilus</i>	DSMZ	DSMZ 63, modifiziert
DSM1535 ^T	<i>Methanobacterium formicicum</i>	DSMZ	DSMZ 287, modifiziert
DSM3045 ^T	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	DSMZ	DSMZ 287, modifiziert
DSM15978 ^T	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	DSMZ	DSMZ 318, modifiziert
DSM17232 ^T	<i>Methanomethylovorans thermophila</i>	DSMZ	DSMZ 318, modifiziert
DSM2139	<i>Methanosaeta concilii</i> Opficon	DSMZ	DSMZ 344, modifiziert
DSM800 ^T	<i>Methanosarcina barkeri</i>	DSMZ	DSMZ 318, modifiziert
DSM2053 ^T	<i>Methanosarcina mazei</i>	DSMZ	DSMZ 318, modifiziert
DSM1740 ^T	<i>Wolinella succinogenes</i>	DSMZ	DSMZ 157

^T = Typstamm; ^a Stämme wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

3 Methoden

In Biogasanlagen stellt Propionsäure ein besonderes Problem dar, weil diese kurzkettige Fettsäure anaerob nur endergon und mit einem Wasserstoffpartialdruck unter 9,2 Pa (Gourdon und Vermande 1987) oder 10^{-4} atm (Abbildung 20, Harper und Pohland 1986) abgebaut wird (Kapitel 1.7.2). In den folgenden Kapiteln des Methodenteils werden die Durchführungen der in dieser Dissertation angewendeten Methoden zur Kultivierung, Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen beschrieben, die bei dem Abbau von Propionsäure beteiligt sein können.

3.1 Probenmaterial aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern

propionsäureoxidierende Anreicherungskulturen (Tabelle 14) wurden aus den vier verschiedenen NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) von Herrn Dröge in komplexe Medien PI und PIII (Kapitel 2.6) angereichert und für diese Dissertation bereitgestellt. Diese Anreicherungskulturen wurden nach Überimpfung bei 4 °C gelagert. Proben mit einem Volumen von 0,5 - 1 L aus NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) wurden dauerkultiviert (Kapitel 3.3), um aus den Dauerkulturen methanogene Archaea zu isolieren (Kapitel 3.3.2). Des Weiteren wurden Proben in 5 mL DSMZ-Medium 287 (circa 2 % Inokulum, Tabelle 15) aus Laborfermentern des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Klocke *et al.*, 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) bereitgestellt, um die kultivierbare Diversität methanogener Archaea aus Laborfermentern mit der aus NawaRo-Biogasanlagen zu vergleichen. Die Laborfermenterproben wurden nach Überimpfung (10 % Inokulum) in die DSMZ-Medien (DSMZ 2012) 287 für *Methanobacterium* (Inkubationstemperatur 39 °C) sowie *Methanoculleus* (Inkubationstemperatur 30 °C), Medium 318 mit Methanol für *Methanosarcina* (Inkubationstemperatur 39 °C) sowie Medium 334 für *Methanosaeta* (Inkubationstemperatur 39 °C) überimpft (Kapitel 3.3.2) und die restlichen Laborfermenterproben bei 4 °C gelagert.

Das folgende Pfeildiagramm stellt Durchführung der Anreicherung, Kultivierung und Isolierung sowie morphologische und physiologische Charakterisierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen Laborfermentern und Anreicherungskulturen in chronologischer Reihenfolge dar.

Tabelle 18: Anlagenparameter der untersuchten Biogasanlagen (BGA) zur Zeit der Beprobung

	BGA TAF¹	BGA HWS²	BGA BEG³	BGA Arenrath⁴
Fermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	LARW ⁵ /TMRW ⁶	Zentralrührwerk	LARW ⁵ /TMRW ⁶	LARW ⁵ /TMRW ⁶
V_{brutto} [m³]	2 x 1260	2 x 1000	1 x 1260	1 x 1.400
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	TMRW ⁶	LARW ⁵	TMRW ⁶	TMRW ⁶
V_{brutto} [m³]	1 x 1260	1000	1 x 1260	1 x 1400
Leistung	550 P _{el} [kW]	380 P _{el} [kW]	370 P _{el} [kW]	345 P _{el} [kW]
Inputstoffe¹²				
Fest [t d ⁻¹]	MS ⁷ [33]	MS ⁷ /GPS ¹¹ [20/2]	MS ⁷ [18]	MS ⁷ /GS ⁸ [12/8]
Flüssig [m ³ d ⁻¹]	SG ¹⁰ [6]	SG ¹⁰ [5]	SG ¹⁰ [5]	RG ⁹ [10]
pH-Wert¹²	7,2-7,5	7,2-7,6	7,5-7,7	7,3-7,5
Temperatur	40 °C	39 °C	41 °C	40 °C
NH₄-N¹² [mg kg⁻¹]	1400-1500	2000-2500	1800-2000	1500-1700
Gesamtsäure [mg kg⁻¹]	1000-2500	1000-4500	500-2000	< 250

¹ TAF = Theo & Alexander Friedrich ² GbR, HWS = Hubert Wagner und Sohn GbR,

³ BEG = BioEnergie Glahn, ⁴ Arenrath = Biogasanlage Arenrath GmbH & Co KG

⁵ LARW = Langachsührwerk, ⁶ TMRW = Tauchmotorrührwerk, ⁷ MS = Maissilage,

⁸ GS = Grassilage, ⁹ RG = Rindergülle, ¹⁰ SG = Schweinegülle, ¹¹ GPS = Ganzpflanzensilage;

¹² Spektrum im Betrachtungszeitraum

Die Probennahme erfolgte aus Ablassrohren am unteren Teil der Fermenter in 1 L bis 2 L Plastikflaschen mit weitem Hals, die zur Hälfte befüllt wurden. Nach direktem Transport ins Labor wurden die Fermenterproben umgefüllt und als Dauerkultur (Abbildung 32) kultiviert.

3.3 Anaerobe Kultivierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen

Direkt nach Überführung der Proben aus NawaRo-Biogasanlagen im Labor wurden 0,5-1 L Serumflaschen bis zur Hälfte mit Fermenterinhalt befüllt und mit einem Metallröhrchen durchstochenen Stopfen verschlossen. Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau der Dauerkulturen aus Fermentern und Nachgärern.

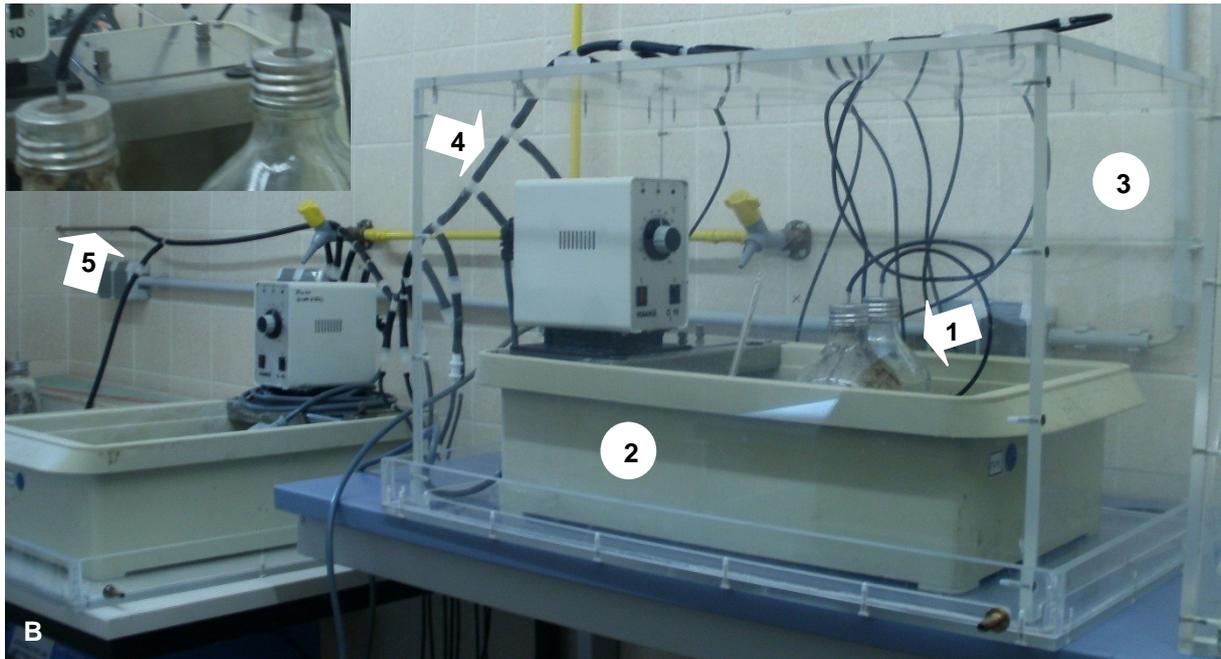


Abbildung 32: Aufbau der temperierten Dauerkulturen mit Schlauchsystem (Eigenbau) zur Abführung des gebildeten Gases; A 1 L Serumflasken mit einem Stahlröhrchen durchstoßenem (Eigenbau) und mit einem Schraubdeckel fixiertem Gummistopfen B 1 Dauerkulturen aus Fermentern und Nachgären in Serumflasken; 2 temperierbares Wasserbad (39 °C Lagertemperatur); 3 Schutzhaube mit Wanne aus Acrylglas (IMW-Eigenbau); 4 Schlauchsystem (Eigenbau) mit Rückschlagventilen (Roth, Karlsruhe) zur Abführung des gebildeten Gases; 5 Gasabführungsrohr aus Stahl.

Metallröhrchen im Stopfen von Serumflaschen fungierten als Auslass für Gas, das von in Serumflaschen befindlichen Dauerkulturen gebildet wurde (Abbildung 32 A). Die Stopfen wurden mit Lochdeckeln fixiert. Diese Kulturen wurden bei 39 °C in Wasserbädern (2 in Abbildung 32 B) dauerkultiviert. Die Röhrchen der Serumflaschendeckel wurden mit je einem gasdichten Schlauch mit einem Schlauchsystem (4 in Abbildung 32 B) verbunden. Der Schlauch war mit einem Einwegventil unterbrochen. Das Einwegventil war gerichtet eingebaut, so dass entstandenes Gas in einen dickeren Schlauch ausströmte und sich nicht über der Dauerkultur sammelte. Der Schlauch endete an einem Stahl-Rohr (5 in Abbildung 32 B). Dieses Rohr ragte durch die Außenwand des Gebäudes, so dass gebildetes Gas ausströmte.

Aus den Dauerkulturen aus Biogasanlagen wurden zur Anreicherung methanogener Archaea verschiedene Volumina entnommen und geeignete Medien (Kapitel 2.6) in Anaerobenkulturröhrchen (Balch *et al.* 1979) mit 5 % und 10 % Inokulum beimpft. Dabei wurden die Gefäße der Dauerkulturen immer in einem Anaerobenzelt mit einer Gasmischung 95 % N₂/ 5 % H₂ (Formiergas) geöffnet.

In alle anaeroben Medien wurde der Farbstoff Resazurin (Sabnis 2007, Twigg 1945) zugegeben. Der Farbstoff reagiert neben dem pH-Wert auf den Redox-Wert einer Lösung. Diese Eigenschaft wurde in anaeroben Medien ausgenutzt, um indirekt die Abwesenheit von Sauerstoff zu

detektieren. Resazurin ist in oxidiertem Zustand blau gefärbt. Wird Resazurin zu Resofurin reduziert, wandelt sich der blaue Farbstoff zu pink. Dieser Schritt ist irreversibel. Wird Resofurin reversibel zu Dehydroresofurin reduziert, wechselt die pinke Farbe zu farblos, da der Redox-Wert sinkt. Bei jeder Überimpfung von Kulturen wurde entweder im Anaerobenzelt gearbeitet oder die zu überimpfenden Volumina mit Spritzen mit Gummistempeln (Insulinspritzen) zügig aufgenommen und direkt in das frische Medium überführt, so dass der Indikator Resazurin nicht umschlug.

3.3.1 Isolierung von Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen

Die von Herrn Dr. Dröge erhaltenen propionsäureabbauenden Anreicherungskulturen (Tabelle 14) aus vier beprobten Biogasanlagen (Tabelle 18) wurden in jeweils 9 mL PI- und PIII-Medium (Kapitel 2.6) mit 10 % Inokulum überimpft und bei 39 °C kultiviert. Die Mischkultur mit dem reproduzierbarsten Abbau von Propionsäure wurde ausgewählt, um propionsäureabbauende Mikroorganismen im *up scaling*-Verfahren über 18 mL und 180 mL bis zu einem Volumen von 500 mL in PI-Medium zu kultivieren. Für chemisch-analytische Messungen wurden die Mischkulturen in dieser Arbeit in 9 mL PI-Medium und PI-Medium ohne Reaktorfiltrat (PIP) mit 10 % Inokulum bei 39 °C kultiviert. Nach Stams *et al.* (1993) wurden die propionsäureabbauenden Mischkulturen außerdem mit 40 mmol L⁻¹ Fumarsäure im PI-Medium kultiviert, um den propionsäureabbauenden Mikroorganismen einen weiteren Nährstoff anzubieten, so dass die Möglichkeit bestand, ohne Syntrophie mit anderen Mikroorganismen Propionsäure abzubauen. 5 mmol L⁻¹ Bromoethansulfonsäure wurde zugegeben, um das Wachstum der methanogenen Archaea zu hemmen. Die propionsäureabbauenden Mischkulturen wurden parallel in Medien mit anderen Substraten anstatt Propionsäure mit 10 % Inokulum bei 39 °C kultiviert, um unterschiedliche Bakterien aus den Mischkulturen anzureichern und zu isolieren. Dafür wurden die DSMZ Medien 1264 für Spirochäten, das DSMZ-Medium 520 modifiziert für Clostridien, modifiziertes DSMZ-Medium 63 für *Desulfovibrio sp.*, DSMZ-Medium 846 für *Aminobacterium colombiense* und DSMZ-Medium 157 für *Wolinella succinogenes* verwendet (Kapitel 2.6, DSMZ 2012).



Abbildung 33: Gas befüllbarer Druckbehälter aus Stahl (IMW Eigenbau) zur Kultivierung von Reinigungsaustrichen anaerober Mikroorganismen aus Biogasanlagen; 1 Manometer von -1 bar bis 3 bar; 2 verschließbares Ventil zur Be- und Entgasung.

Anaerobe Bakterien aus den propionsäureabbauenden Mischkulturen Fp1a, Wp2a, Gp1b und Ap1a (Tabelle 14) wurden zur Isolierung im Anaerobenzelt auch auf Agarplatten mit den DSMZ-Medien 63 (modifiziert), 520 und 1264 (Kapitel 2.6, DSMZ 2012) mithilfe von Einmalimpfösen ausplattiert. Inkubiert wurden die Platten in Druckbehältern aus Stahl (Abbildung 33). Die Druckbehälter wurden für anaerobe Bakterien mit 0,5 bar Überdruck N_2 befüllt und bei 39 °C in einem Inkubationsschrank kultiviert. Der Druck wurde täglich über die Anzeige des Manometers (1 in Abbildung 33) kontrolliert und die Gasphase wöchentlich über das Ventil (2 in Abbildung 33) mit einer Begasungsanlage ausgetauscht. Einzelne Kolonien der Mischkulturen Fp1a und Ap1a auf DSMZ-Medium 520-Agarplatten wurden im Anaerobenzelt in flüssiges DSMZ-Medium 520 überimpft. Wöchentlich wurde die Gasphase dieser Flüssigkulturen ausgetauscht und alle zwei bis drei Wochen mit jeweils 10 % Inokulum in frisches DSMZ-Medium 520 überimpft. Die Reinheit der anaeroben Bakterienkulturen wurde durch Phasenkontrastmikroskopie und Analyse der 16S rDNA überprüft.

3.3.2 Anreicherung, Kultivierung und Isolierung methanogener

Archaea

Aus drei verschiedenen NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) wurden Proben (Kapitel 3.2 und 3.3) aus Fermentern verwendet, um in dieser Arbeit methanogene Archaea zu kultivieren und isolieren (Miller und Wolin 1974, Sowers und Noll 1995). Volumina von 50-100 μ L wurden aus

den Fermenterproben (Kapitel 3.2 und 3.3) genommen, um für methanogene Archaea modifizierte komplexe Medien (287, 318, 334 Kapitel 2.6) in Anaerobenkulturgefäßen zu beimpfen. Das Inokulum betrug jeweils 1 - 10 %. Aus diesen Anreicherungskulturen wurden Verdünnungsreihen bis zum Verdünnungsgrad 10^{-8} erstellt. Mit den von Herrn Dr. Klocke zur Verfügung gestellten Anreicherungskulturen aus Laborfermentern (Klocke *et al.*, 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) wurde ebenso verfahren. Zusätzlich wurden den Kulturen unterschiedliche Antibiotika (Tabelle 19) gegen bakterielle Verunreinigungen zugegeben. Die Antibiotika wurden entweder einzeln oder in Kombination von zwei unterschiedlich wirkenden Antibiotika verwendet, wie zum Beispiel Vancomycin/Tetracyclin oder Ampicillin/Valinomycin.

Tabelle 19: Zur Isolierung methanogener Archaea verwendete Antibiotika in alphabetischer Reihenfolge mit Wirkungsweise, verwendeten Konzentrationen und besonderen Eigenschaften

Antibiotikum	Wirkungsweise	Verwendete Konzentration und besondere Eigenschaften
Ampicillin	Hemmt die Transpeptidierung (Zellwandsynthese) in wachsenden Bakterien; gegen Gram positive und negative Keime, insbesondere gegen Enterokokken (Sambrook und Russel 2001)	Stammlösung: 100 mg mL^{-1} in ddH ₂ O Arbeitslösung: $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$
Bacitracin	Greift in die bakterielle Murein-Bio-synthese ein; wirkt als Komplexbildner mit Undecaprenol-diphosphat (Renneberg und Sussbier 2009)	Stammlösung: 15 mg mL^{-1} in ddH ₂ O Arbeitslösung: $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in ddH ₂ O
Colistinsulfat	Reagiert mit Phospholipid-Komponenten der Zytoplasmamembran von Bakterien und macht sie permeabel. Durch Efflux essentieller Komponenten bakterizide Wirkung auch auf nicht proliferierende Keime; Reduktion der antibakteriellen Wirkung durch zweiwertige Ionen (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), ungesättigte Fettsäuren und Polyphosphate; wirkt gegen Gram negative Keime und nicht proliferierende Keime (Mortensen <i>et al.</i> 2009)	Stammlösung: 50 mg mL^{-1} in ddH ₂ O Arbeitslösung: $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Lösungen von 10 mg mL^{-1} stabil bei +4 °C über 10 - 14 Tagen; Stabilität: gut bei pH-Werten zwischen 2 und 6; Bei pH-Werten über 6,0 langsame Inaktivierung (pH 9 nach 24 Stunden 50 % inaktiviert); bei pH 2 innerhalb 24 Stunden nur 1 % Inaktivierung; ist mit Polymyxin E identisch; cyclisches Pentapeptid mit einer Pentapeptid-Seitenkette
Gentamycin	Hemmt die Proteinsynthese durch Bindung an das L6-Protein der ribosomalen 30 S-Untereinheit. (Baron 1996)	Stammlösung: 10 mg L^{-1} in H ₂ O, bei -20 °C lagern Arbeitslösung: $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ löslich in Wasser bis 200 mg mL^{-1} ; unlöslich in 50 % Ethanol; giftig
Kanamycin	Hemmt die Proteinsynthese (Translokation); Gram positive, -negative Kokken und Bakterien (Dingermann <i>et al.</i> 2002)	Stammlösung: 100 mg mL^{-1} in ddH ₂ O Arbeitslösung: $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

Fortsetzung Tabelle 19:

Antibiotikum	Wirkungsweise	verwendete Konzentration und besondere Eigenschaften
Rifampicin	Hemmt die RNA Polymerase, durch Bindung an eine Untereinheit der Polymerase und somit Verhinderung der initialen Bindung der Polymerase an die DNA. (Baron 1996)	Stammlösung: 50 mg/mL Stammlösung in Methanol. um Rifampicin vom Boden zu lösen, gründlich vermischen. ~5 Tropfen 10 N NaOH mL ⁻¹ zugeben und vermischen. 2 mL in 1 L Medium geben, um die Arbeitslösung 100 µg mL ⁻¹ zu erreichen. Alternativ 50 mg mL ⁻¹ in DMSO durch wirbelmischen lösen. Keine Natriumhydroxid-Zugabe. Lagerung bei -20 °C. lichtempfindlich
Tetracyclin	Hemmt die Proteinsynthese durch Verhinderung der Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle im Ribosom (Baron 1996)	Stammlösung: 15 mg mL ⁻¹ in 50 % EtOH Arbeitslösung: 15 µg mL ⁻¹ lichtempfindlich; für Minimalmedien untauglich
Valinomycin	Hemmt die Bildung von Membranen (Lars und Jenkins 2007)	Stammlösung: 1 mg mL ⁻¹ in DMSO Arbeitslösung: 1 µg mL ⁻¹ Giftig
Vancomycin	Hemmt den Zellwandaufbau (Baron 1996)	Stammlösung: 50 mg mL ⁻¹ in ddH ₂ O Arbeitslösung: 50 µg mL ⁻¹

Die Reinheit der methanogenen Eigenisolate wurde durch Kultivierung ohne Antibiotika und anschließender Kontrolle durch Fluoreszenzmikroskopie und Analyse der 16S rDNA überprüft. Archaeale Eigenisolate (Tabelle 16) wurden kombiniert mit syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen (Tabelle 14) in PI-Medium inkubiert. Dabei wurde jeweils 10 % Inokulum verwendet.

Die Kultur LFP3.1 (Tabelle 16) wurde 4 Wochen bei 39 °C und bei 55 °C in DSMZ-Medium 318 (DSMZ 2012) inkubiert, um Unterschiede der wachstumsbedingten Trübung zu ermitteln und eine Zuordnung zu den Typstämmen *Methanomethylovorans hollandica* DSM15978^T oder *Methanomethylovorans thermophila* DSM17232^T (Tabelle 17) zu ermöglichen.

3.4 Physiologische Charakterisierung von Eigenisolaten aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern

Die physiologische Charakterisierung von Eigenisolaten aus NawaRo-Biogasanlagen wurde klassisch vorgenommen. Eigenisolate wurden mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops morphologisch analysiert. Hierbei wurde das Wachstum bei 400facher Vergrößerung regelmäßig überprüft und Gestalt und Größe der Mikroorganismen bei 1000facher Vergrößerung bestimmt. Bei Bedarf wurden Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI angefärbt und fotografisch festgehalten. Einige methanogene Eigenisolate haben eine autofluoreszierende

Eigenschaft durch einen bei der hydrogenotrophen Methanogenese beteiligten Kofaktor F_{420} (Kapitel 1.5.2.4). Diese Eigenschaft wurde zur genaueren Einordnung methanogener Archaea und zur regelmäßigen Überprüfung des Kulturzustandes verwendet. Mit den methanogenen Eigenisolaten wurden Wachstumsversuche mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt, um die Stämme zusätzlich substratbezogen einzuordnen.

3.4.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie der Eigenisolate

Mit einem Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss) wurde das Wachstum aller in dieser Arbeit bearbeiteten Kulturen regelmäßig überprüft und der visuelle Eindruck schriftlich dokumentiert und gegebenenfalls fotografiert. Zusätzlich wurden die Kulturen methanogener Archaea mit einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence) überprüft, welche durch den Kofaktor F_{420} befähigt waren, eine Autofluoreszenz auszubilden. Unter Einwirkung von gefiltertem Licht (435 nm) wurde die Anregung der Autofluoreszenz provoziert, der Zustand der Kultur bestimmt und bei Bedarf fotografiert. Zur Autofluoreszenz befähigte Stämme wurden in frisches Medium überführt, sobald die Fluoreszenz nachließ oder nicht mehr dauerhaft aufrechterhalten wurde.

3.4.1.1 Titerbestimmung mithilfe der DAPI-Färbung

Durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wurde die Gesamtzahl (Titer) der Mikroorganismen mikroskopisch bestimmt. DAPI bindet an Nukleinsäuren und färbt folglich alle Zellen an. Aus der Anzahl der gefärbten Zellen kann die Gesamtzellzahl pro mL berechnet werden. Dazu wurde 1 mL Probe (gegebenenfalls eine entsprechende Verdünnung in steriler 0,9 % NaCl-Lösung) mit 1 μ L DAPI-Stammlösung (Kapitel 2.5.5) versetzt und gemischt. Danach wurde die Probe 5 min im Dunkeln inkubiert. Circa 5 mL destilliertes Wasser wurde auf die Filterfläche vorgegeben, die Probe anschließend zugegeben und kurz mit der Pipette vermischt. Mittels einer Filtrationseinheit wurde die Probe durch einen Polycarbonatfilter gesaugt. Der Polycarbonatfilter wurde daraufhin ausgebaut und im Dunkeln trocknen gelassen. Der getrocknete Filter wurde auf einen Objektträger gelegt, mit einer gekürzten Pipettenspitze 50 μ L DABCO-Lösung auf den Filter gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) wurde unter UV-Anregung (Filter 01) mikroskopiert. Zur Ermittlung der Zellzahl können 3 Großquadrate ausgezählt werden. Aus der Anzahl der fluoreszierenden Bakterien pro Großquadrat, der effektiven Filterfläche, der Okular-Großquadratfläche, dem verwendeten Volumen und dem Verdünnungsfaktor kann die Gesamtkeimzahl pro mL berechnet werden.

3.4.1.2 Bestimmung des Titers methanogener Archaea

Die Keimzahl eigenisolierter methanogener Archaea-Stämme wurde mithilfe einer Thoma-Zählkammer durchgeführt. Die Schichtdicke der Kammer betrug 0,02 mm und der

Brechungsindex hatte den Wert $0,0025 \text{ mm}^2$. Die Mikroorganismen in 4 Großquadraten, bestehend aus 16 Kleinquadraten einer Zählkammer wurden manuell gezählt und die Werte durch die Anzahl der Kleinquadrate geteilt. Dieser Mittelwert der gezählten Mikroorganismenanzahl wurde mit der vorliegenden Verdünnung multipliziert und durch die mit dem Brechungsindex multiplizierte Schichtdicke dividiert.

$$\text{Gesamtzellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mm}^3} \right] = \frac{\emptyset \text{ Zellzahl in } 4 \times 16 \text{ Kleinquadraten} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Schichtdicke} \cdot \text{Brechungsindex}}$$

Formel 30: Berechnung der Gesamtzellzahl mit einer Toma-Kammer; Schichtdicke = $0,02 \text{ mm}$; Brechungsindex = $0,0025 \text{ mm}^2$.

Mit Formel 30 wurde die Gesamtzellzahl in Zellen $(\text{mm}^3)^{-1}$ berechnet. Durch Addition von 10^6 wurde die Gesamtzellzahl in Zellen L^{-1} erhalten.

3.4.2 Bestimmung des Titers propionsäureabbauender Mikroorganismen mithilfe des MPN-Verfahrens

Das Verfahren der Titerbestimmung mit der *most probable number* (MPN, Breitig und Trümping 1982) wurde verwendet, um die Zellzahlen der kultivierbaren syntrophen Bakterien in den untersuchten Anlagen mit dem Medium PI zu bestimmen. Zur Durchführung der MPN-Versuche wurde aus 8-12 Wochen alten propionsäureabbauenden Mischkulturen Ap1a, Fp1a, Gp1b und Wp2a (Tabelle 14) jeweils 1 mL Fermentersubstrat steril entnommen und in Anaerobenkulturröhrchen mit 9 mL des Mediums PI (Kapitel 2.6) verdünnt. Hiervon ausgehend erfolgte eine serielle Verdünnung in Zehnerschritten im fünffachen Parallelansatz. Sämtliche Proben wurden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Wochen im Dunkeln inkubiert. Der Abbau von Propionsäure wurde mittels HPLC-Analyse (Kapitel 3.6.1) nachgewiesen. Für die Ermittlung der MPN-Zahl wurden die bewachsenen Röhrchen der drei höchsten Verdünnungsstufen gezählt. Eine dreistellige Zahlenfolge resultierte daraus. Die erste Ziffer gab die Anzahl bewachsener Röhrchen der dritthöchsten positiven Verdünnungsstufe, die zweite diejenige der zweithöchsten und die dritte die der höchsten positiven Verdünnungsstufe wieder. Aus einer MPN-Tabelle für fünf Kulturröhrchen (Andrew 1980) wurde die zugehörige MPN-Zahl abgelesen und mit dem Reziprokwert der mittleren der drei herangezogenen Verdünnungsstufen multipliziert (nach Sass 1997).

3.4.3 Wachstumsuntersuchungen methanogener Eigenisolate mit unterschiedlichen Substraten

Für Substrattests wurden dem oben beschriebenen DSMZ-Medium 287 statt des Reaktorfiltrats und Acetat verschiedene Substrate als einzige C-Quelle zugesetzt: Auf einen Liter Medium wurden 2,0 g Acetat, 2,0 g Formiat, 10 mL 2-Propanol, 10 mL Ethanol, je 5,0 g Mono-, Di- oder

Trimethylamin beziehungsweise 40 mL Essigsäure zugegeben. Die Substratmengen wurden aus speziellen Medien für bestimmte Mikroorganismen aus der digitalen Datenbank der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) übernommen. Die Atmosphäre über den Medien wurde mit Stickstoff begast. Die mit eigenisolierten Reinkulturen beimpften Medien wurden vier Wochen im Inkubator bei 39 °C inkubiert. Das Wachstum wurde regelmäßig fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

3.5 Molekularbiologische Identifizierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen

Die molekularbiologische Analyse von Mikroorganismen aus den Fermentern, sowie aus Kulturen wurde hauptsächlich mit Fragmenten partieller 16S rDNA durchgeführt. Um Kontaminationen vorzubeugen, wurde in dieser Arbeit unter sterilen Bedingungen und mit sterilem Arbeitsmaterial gearbeitet, wie beispielsweise mit käuflich erworbenem DEPC-Wasser (Roth, Karlsruhe). Im ersten Schritt wurde chromosomale DNA aus Fermenterinhalt sowie aus Kulturen isoliert. Dies wurde zum einen auf klassischem Weg mit der Phenol/Chloroform-Fällung (Kapitel 3.5.1) und zum anderen mit DNA-Isolierungskits (Kapitel 2.3.3) durchgeführt.

Im zweiten Schritt wurde die isolierte chromosomale DNA mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Kleppe *et al.* 1971, Mullis *et al.* 1986) amplifiziert, um Fragmente der 16S rDNA zu erhalten (Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Dafür wurde doppelt deionisiertes Wasser durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert, daraufhin 2 h mit UV-Licht bestrahlt und zuletzt 21 min bei 121 °C feucht autoklaviert (PCR-Wasser). Spezifische synthetische Oligonukleotide (Tabelle 8 und Tabelle 9) wurden verwendet, um die 16S rDNA zu vervielfältigen. Bei der Analyse von archaealer DNA wurde ein PCR-Programm gewählt, das beim Anlagerungsschritt zunächst einige Zyklen eine Temperaturverminderung vollzieht, um mehr Amplifikat zu erhalten (Kapitel 3.5.3). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Eignung der SAPD-PCR (Pfannebecker und Fröhlich 2008) zur Unterscheidung archaealer Stämme anhand der chromosomalen DNA gezeigt.

Sequenzierungen führen zu zuverlässigen Ergebnissen, wenn die zu sequenzierende DNA zu einem Mikroorganismus gehört. Wenn aus Fermentern isolierte gesamte DNA, also keine Reinkulturen, analysiert wurden, wurde ein Zwischenschritt durchgeführt, bei dem amplifizierte 16S rDNA aufgetrennt wurde, die von mehreren Arten stammen kann. Hierzu wurden drei Methoden verwendet: Die Methode der Denaturierenden-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE, Kapitel 2.5.4), der Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE, Kapitel 2.5.4) und der Klonierung. Bei den ersten beiden Methoden wurden 500 bp große 16S rDNA-Fragmente nach ihrer Kodierung elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert. Eine weitere Methode zur Auftrennung von DNA verschiedener Mikroorganismen war das Klonieren. Hier wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gearbeitet. Mit dieser

Methoden wurden längere 16S rDNA-Fragmente als mit den vorher beschriebenen Methoden unterschieden. Prinzipiell wird bei der Klonierungsmethode immer ein Fragment in *Escherichia coli* kloniert, was gewährleistet, dass jede Zelle nur ein Fragment einer Art aufnimmt. Mit den Klonen wurde eine Kolonie-PCR vorgenommen, bei der ein Abstrich aus jeweils einer Klon-Kolonie als DNA-Vorlage fungierte. Um die Zellen aufzubrechen und die darin enthaltene DNA freizusetzen, wurde der initiale denaturierende Schritt zeitlich verlängert. Die Diversität der Klone wurde vorsortiert, indem der Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) genutzt wurde. Die Amplifikate der Kolonie-PCR wurden mit DNA-schneidenden Enzymen (Kapitel 2.3.2) verdaut und die verschiedenen Schnittmuster nach einer Gelelektrophorese miteinander verglichen. Jeweils ein Fragment jedes Musters wurde daraufhin reamplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels einer Internetdatenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dort eingetragenen Sequenzen verglichen, um die Art zu ermitteln. Da diese Datenbank eine freie Datenbank ist und darin fehlerhafte Sequenzen enthalten sein können, wurden die Sequenzen zusätzlich mit Sequenzen von in der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) registrierten Typstämmen verglichen. Folgend ist zur Veranschaulichung des mikrobiologischen und molekularbiologischen Arbeitsvorganges ein Pfeildiagramm (Abbildung 34) in chronologischer Reihenfolge gezeigt.

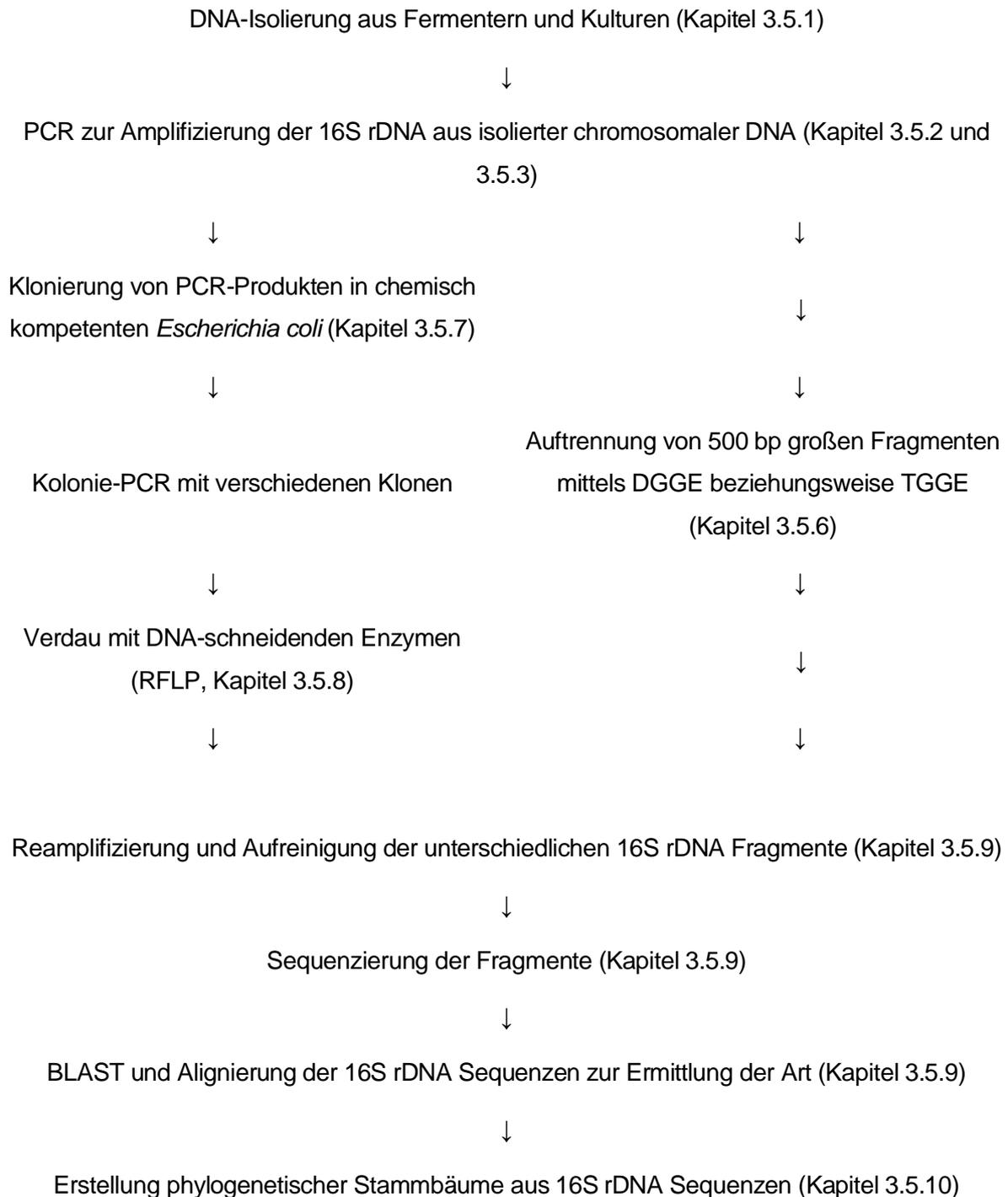


Abbildung 34: Pfeildiagramm des Ablaufs der molekularbiologischen Identifizierung von Mikroorganismen.

3.5.1 Isolierung chromosomaler Gesamt-DNA aus Fermentern und Kulturen

Die Isolierung chromosomaler Gesamt-DNA aus Fermentern, Anreicherungs- und Reinkulturen wurde in dieser Arbeit klassisch mit Phenol-Chloroform, sowie mit DNA Isolierungskits (Kapitel 2.3.3) durchgeführt. Für eine klassische DNA-Isolierung wurden 5-10 mL flüssiger Fermenterinhalt beziehungsweise Zellkultur für 5 min bei 5000 xg zentrifugiert und der

entstandene Zelniederschlag in 0,5 mL TE-Puffer aufgenommen. 0,5 mL Phenol wurden der Suspension zugegeben und durch Auf- und Ab pipettieren gut durchmischt. Für 10 min wurde bei 15000 x g zentrifugiert. Bei der DNA Isolierung wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert des Phenols über 7,8 lag, da DNA bei niedrigeren pH-Werten zum großen Teil in die organische Phenolphase eindringt und die Menge an isolierter DNA damit erheblich vermindert wird. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 0,3 mL Phenol/ Chloroform (1:1) zugeben, gut durchmischt und 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Wässrige Phasen (oben) wurden mit weiteren Spitzen abgenommen. Durch eine offenere Spitze werden Scherkräfte vermindert, die ein Zerschneiden der DNA zur Folge hätten. Nach einer Wiederholung des letzten Schritts wurde die Probe zunächst mit 0,4 mL Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1), dann mit 55 µL einer 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 1 mL Isopropanol behandelt, wie im ersten Phenol/Chloroform-Schritt. Der daraus resultierende Niederschlag wurde in 1 mL 70 %igen Ethanol aufgenommen, für 30 min bei -20 °C gelagert und anschließend für 5 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die gesamte Flüssigkeit 30 min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac, Eppendorf, Hamburg) verdampft. Die DNA wurde in 20 µL TE-Puffer aufgenommen und wurde bei Bedarf bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zum anderen wurde chromosomale DNA sowohl aus Fermentern als auch aus Kulturen mithilfe verschiedener Kits isoliert, welche in Kapitel 2.3.3 aufgeführt sind. Der Vorteil der Verwendung der Kits bestand bei gleicher Ausbeute weniger Ausgangsmaterial zu benötigen und Zeit zu sparen. Bei der Durchführung der DNA-Isolation mit Kits, wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet.

3.5.2 Optimierte Amplifizierung bakterieller 16S rDNA aus chromosomaler DNA für Proben aus NawaRo-Biogasanlagen und daraus stammenden Kulturen

Nach der Isolierung chromosomaler DNA aus Fermentern, Anreicherungs- Misch- und Reinkulturen (Kapitel 3.5.1) wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Kleppe *et al.* 1971, Mullis *et al.* 1986) verwendet, um Fragmente der 16S rDNA zu amplifizieren. Für die Amplifizierung 500 bp großer Fragmente bakterieller 16S rDNA wurden die synthetischen Oligonukleotide 519GCf und 1070r (Tabelle 8) für eine DGGE verwendet. Für die Erhaltung eines PCR-Produkts der fast gesamten bakteriellen 16S DNA wurden die Oligonukleotide BSF8 und BSR1541r (Tabelle 8) verwendet. Mithilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Tabelle 21) wurden sowohl die Teilsequenz als auch fast die gesamte 16S rDNA aus der isolierten chromosomalen DNA vervielfältigt. Die dafür benötigten Volumina der einzelnen Reagenzien für einen Ansatz ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: PCR-Ansatz (50 μL) für bakterielle DNA

Reagenz	1 Ansatz [μL]
DNA	Je nach Konzentration
dNTP's	1
High Y Puffer	5
Beschleuniger (<i>Enhancer</i>)	5
PCR- H_2O	ad 50 μL
Vorwärts-Oligonukleotid	1
Rückwärts-Oligonukleotid	1
Taq Polymerase (1:5 verd.)	2

Zunächst wurde mit dem PCR-Programm nach Coton und Coton (2005) gearbeitet, bei der die Anlagerungstemperatur 52 °C beträgt. Dies führte jedoch zu ungenügenden Sequenzierungsergebnissen (siehe Kapitel 4.5.1). Daher wurde mittels einer Gradienten-PCR eine Anlagerungstemperatur (Tabelle 21) ermittelt, um zuverlässige Sequenzierungsergebnisse zu erhalten. Ein Thermocycler (Eppendorf) wurde beim Anlagerungsschritt mit einem Temperaturgradient von 52,7 °C bis 62,4 °C pro Reaktionsgefäßstellplatz programmiert.

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S rDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94	1	35
Anlagerung	62,4	1	35
Elongation	72	1,5	35
Abschließende Extension	72	10	1
Gesamt-Zyklen			35

Die initiale Denaturierung erhöhte die Chance, dass möglichst viel einsträngige DNA zur Amplifizierung vorlag. Sie wurde einmalig zu Beginn einer jeden PCR durchgeführt. Am Beginn jedes weiteren Zyklus wurde eine kürzere Denaturierung vollzogen, um die angelagerten Oligonukleotide und Polymerasen von der DNA zu lösen. Auf die Denaturierung folgte die Anlagerung der Oligonukleotide. Jeder Zyklus schloss mit einer Elongation. Die Elongationsdauer wurde so gewählt, dass jede eingesetzte Polymerase ein Duplikat der DNA herstellte. Nach Abschluss der Zyklen wurde eine finale Extension programmiert, in der die Polymerase die bereits entstandenen Fragmente mehrfach zu vervielfältigen. Der Erfolg jeder PCR wurde durch eine Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.5.5) überprüft.

3.5.3 Amplifizierung der 16S rDNA aus archaealer chromosomaler DNA

Nach der DNA-Isolierung aus methanogenen Kulturen sowie methanogenen Reinkulturen wurde die *touch-down* Polymerase-Ketten-Reaktion (*td*-PCR, Don *et al.* 1991) gewählt, um die Ausbeute des Amplifikats zu erhöhen. Mithilfe der *touch-down*-PCR wurde sowohl eine Teilsequenz als auch fast die gesamte 16S rDNA aus isolierter chromosomaler DNA vervielfältigt. 500 bp große Fragmente der archaealen 16S-rDNA wurden mithilfe der synthetischen Oligonukleotide GCAr1000f und Ar1500r (Tabelle 9) amplifiziert. Die daraus resultierenden Sequenzen ließen eine Zuordnung zu einer Gattung zu. Artsspezifisch wurden die Mikroorganismen aus Fermentern und methanogener Reinkulturen mit bis zu 1245 bp langen Sequenzen zugeordnet, da die 1245 bp langen Fragmente fast die gesamte archaeale 16S rDNA umfassten. Diese Fragmente wurden mit dem Oligonukleotidpaar Met86f und Met1340r (Tabelle 9) amplifiziert. Der Mastermix für einen *td*-PCR-Ansatz ist in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Mastermix für einen *td*-PCR-Ansatz (50 μ L)

Reagenz	1 Ansatz [μ L]
DNA	Je nach Konzentration
dNTP's	2
High Y Puffer	5
BSA	1
PCR-H ₂ O	ad 50 μ L
Vorwärts-Oligonukleotid	2
Rückwärts-Oligonukleotid	2
Taq Polymerase	0,3

Tabelle 23: Reaktionsbedingungen einer *td*-PCR zu Charakterisierung archaealer 16S rDNA

	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	5	1
Denaturierung	96	1	35
Anlagerung 1	57-53	1	15
Anlagerung 2	53	1	20
Elongation	72	1,5	35
Abschließende Extension	72	10	1
Gesamt-Zyklen			35

Innerhalb der ersten 15 Zyklen verringerte sich die Temperatur um 0,267 $^{\circ}$ C pro Zyklus. Dieser *touch down* bewirkte eine immer größer werdende Wahrscheinlichkeit, dass sich die Oligonukleotide an die Ziel-Fragmente anlagerten, wobei darauf geachtet wurde, dass die

Spezifität nicht sank. Die restlichen Zyklen lag die Anlagerungstemperatur bei 53 °C. Der weitere Ablauf der *td*-PCR araealer 16S rDNA erfolgte wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, wobei die jeweiligen Oligonukleotide für archaeale 16S rDNA (Tabelle 9) verwendet wurden.

3.5.4 Amplifizierung verschiedener Teilsequenzen der chromosomalen DNA methanogener Archaea

In dieser Arbeit wurde die verschachtelte speziell amplifizierten polymorphen DNA (*nested* SAPD)-PCR (Pfannebecker und Fröhlich 2008, Fröhlich und Pfannebecker 2006) verwendet, um die Eignung der Methode mit archaealer chromosomaler DNA zu zeigen, da dies bisher noch nicht überprüft worden war. Die *nested* SAPD-PCR ist eine molekularbiologische Methode, um Stämme gleicher Art voneinander unterscheiden zu können oder Arten zu charakterisieren, über die weiter nichts bekannt ist. Die *nested* SAPD-PCR basiert auf der *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR (Williams *et al.* 1990). Die SAPD-PCR funktioniert mit der Amplifizierung chromosomaler DNA durch willkürlich gewählte synthetische Oligonukleotide. Die Oligonukleotide (10-mere, 11-mere) enthielten hauptsächlich eine 8 bp lange palindrome Erkennungssequenz der *Not* I-Restriktionsendonuklease (5'-GCGGCCGC-3') mit einer dahinter geschalteten Base (A, C, G oder T, Tabelle 10). Zur SAPD-PCR wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µL in 200 µL-Reaktionsgefäßen hergestellt. Bei einer SAPD-PCR wurde ein Oligonukleotid eingesetzt. Die Gehaltsangaben der einzelnen Reagenzien eines Reaktionsansatzes sind in Tabelle 24 und das SAPD-PCR-Programm in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Mastermix für einen SAPD-PCR-Ansatz (25 µL)

Reagenz	1 Ansatz [µL]
DNA	Je nach Konzentration
dNTP's	1
High Y Puffer	2,5
MgCl ₂	2
Doppelt deionisiertes Wasser	<i>ad</i> 25 µL
Primer (Not A, C, G oder T)	1
Taq Polymerase	0,15

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen einer SAPD-PCR zur Unterscheidung verschiedener Stämme einer Art

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	35
Anlagerung 1	35	1	35
Rampe (Temperatur Inkrement)	35 (+ 0,5)	0,2	15
Anlagerung 2	42,5	1	15
Rampe (Temperatur Inkrement)	52,5 (+ 1,5)	0,2	19
Elongation	72	5	35
Gesamt-Zyklen			35

Zur Reduktion der Variabilität enthielt das SAPD-PCR-Programm Temperaturrampen. Die Rampen beschrieben einen schrittweisen Temperaturanstieg zwischen der Anlagerung des Oligonukleotids an die chromosomale DNA und der Elongation der Fragmente. Die Dauer der Rampe bewirkte eine reproduzierbare Bindung des Oligonukleotids an die DNA-Matrize.

Nach der SAPD-PCR wurde ein charakteristisches Fingerprint-Bandenmuster verschiedener Stämme einer Spezies Agarose-gelelektrophoretisch aus dem Gesamtgenom generiert, wobei hierbei sowohl konservierte als auch individuelle Banden aus Fragmenten entstanden.

3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Jeder Amplifizierung (Kapitel 3.5.2, 3.5.3 und 3.5.4) und RFLP (Kapitel 3.5.8) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese nachgeschaltet, um den Erfolg einer PCR zu überprüfen. Gearbeitet wurde mit verschiedenen konzentrierten Agarosegelen. Eine niedrige Agarosekonzentration hatte zur Folge, dass große Fragmente bis zu chromosomaler Länge diskret aufgetrennt wurden und eine hohe Agarosekonzentration trennte kleine Fragmente bis zu 100 bp diskret auf. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer (pH 8,3) durch Aufkochen, unter Rühren gelöst und das Gel handwarm in dafür vorbereitete Schlitten gegossen. Um eine bessere Bandenschärfe zu erreichen wurde 0,1 % einer 35 %igen Natronwasserglaslösung zugegeben. Für Gele zur Überprüfung des Erfolgs einer bakteriellen PCR (Kapitel 3.5.2) und einer archaealen *td*-PCR (Kapitel 3.5.3) wurden Gele mit 1 % Agarose verwendet. 5 µL der Amplifikate wurden 1:6 mit Ladepuffer *MassRuler*TM (6 x) *Loading Dye Solution* (Fermentas St. Leon-Rot) vermischt und in jeweils eine Tasche gegeben. Die aufzutrennenden Proben wurden zunächst mit 80 V ins Gel und daraufhin bei 110 V gefahren, bis der lila Farbstoff des Ladepuffers etwa 1,5 cm vor dem unteren Rand des Gels positioniert war. So wurde gewährleistet, dass der *GeneRuler*TM *DNA Ladder Mix* SM0331 (Fermentas St. Leon-Rot) aufgetrennt worden war. Der SAPD-PCR (Kapitel 3.5.4) nachgeschaltete Agarose-Gelelektrophoresen wurden mit 1,5 %igen Agarose-Gelen durchgeführt, 10 µL Amplifikat mit 2 µL Ladepuffer in entsprechend große Taschen pipettiert und

bei 50 V gefahren bis der lila Farbstoff des Ladepuffers ebenfalls etwa 1,5 cm vor dem unteren Gelrand stand. Für RFLP's (Kapitel 3.5.8) wurden 2,5 %ige Agarosegele hergestellt, den jeweiligen gesamten Restriktionsansatz mit 2 µL Ladepuffer in entsprechend große Taschen überführt und zunächst bei 60 V eingefahren. Darauf wurde die Stromstärke auf 80 V erhöht und gefahren, bis der lila Farbstoff des Ladepuffers 1 cm vor dem Gelende positioniert war. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid (35 µL/500 mL Wasser) gefärbt, mit UV-Licht angeregt und mit einer computerautomatisierten Fotostation in Graustufen fotografiert. Die Gelbilder wurden digital mit einer der Fotostation angeschlossenen Software (Vision), gespeichert mit einer Bildbearbeitungssoftware (IrfanView) umgewandelt und mit einer Präsentationsbearbeitungssoftware (Powerpoint) beschriftet.

3.5.6 Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten mit der Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese und der Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) und die Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE) sind molekularbiologische Methoden, die verschiedene DNA Sequenzen gleicher Längen nach ihrem GC-Gehalt entlang eines Gradienten voneinander trennen.

Die Trennung verschiedener Sequenzen bei einer DGGE erfolgte in einem Polyacrylamidgel, in das ein Gradient denaturierender Agenzien (Harnstoff und Formamid) vorhanden ist (Muyzer *et al.* 1993). Je höher der GC-Gehalt der Sequenzen ist, desto weiter wandern sie im denaturierenden Harnstoffgradienten.

Zwei Glasplatten wurden gespült, mit doppelt deionisiertem Wasser gewaschen und mit Ethanol trocken gewischt. Darauf wurden die Glasplatten in den dafür vorgesehenen Ständer mit Platzhaltern zwischen den Glasplatten und Halterungen zusammengeschraubt. Lösung A und B wurden unter dem Abzug hergestellt (Zusammensetzung des denaturierenden Gels siehe Tabelle 12). Wurden viele unterschiedliche Kodierungen mit großer Ähnlichkeit in den Amplifikations-Produkten vermutet, wurde ein Gel mit einem kleineren Gradienten gegossen. Ein kleinerer Gradient spreitet die unterschiedlichen Sequenzen weiter auseinander. Lösungen A und B wurden in den Gradientenmischer gegeben und gerührt. Nachdem TEMED und APS zugegeben waren, wurde der Rührer gestoppt und sofort das Gel gegossen. Dazu war der Gradientenmischer durch einen Schlauch mit einer Kanüle verbunden, die zwischen die Glasplatten gehalten wurde. War der Zwischenraum der Glasplatten ausgefüllt, wurde ein Kamm aufgesteckt, der die Probestaschen formte. Das Gel benötigte etwa 2 h zum Polymerisieren. Während diesen zwei Stunden wurde der 1x TAE-Laufpuffer in den Elektrophoresebehälter gefüllt und von der Elektrophoreseapparatur auf 60 °C erwärmt. Nach Auspolymerisierung des Gels, wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingebaut und der Kamm entfernt. Die PCR-Produkte wurden 1:6 mit Ladepuffer *MassRuler*TM (6 x) *Loading Dye Solution* (Fermentas

St. Leon-Rot) versetzt. Die Taschen wurden direkt vor dem Beladen von Harnstoffrückständen mit Laufpuffer befreit. Maximal 40 µL PCR-Produkt wurden in die Taschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte entweder 5 h bei 200 V oder über Nacht bei 50 V. Das Gel wurde nach dem Lauf mit Ethidiumbromid angefärbt und mit UV-Licht angeregt. Nach der Fotografie wurden die Banden ausgeschnitten und über Nacht in 200 µL doppelt deionisiertes und steril filtriertes Wasser bei 4 °C für eine Reamplifizierung (Tabelle 21 und Tabelle 20 für bakterielle 16S rDNA, Tabelle 22 und Tabelle 23 für archaeale 16S rDNA) eluiert.

Bei einer TGGE werden in einem Polyacrylamidgel unterschiedliche Sequenzen gleicher Länge ebenfalls nach ihrem GC-Gehalt aufgetrennt. Hierbei wandern die Sequenzen entlang eines Temperaturgradienten bis zu ihrer spezifischen Denaturierungstemperatur. Für eine TGGE wurde das Biometra TGGE System verwendet. Beim Aufbau, der Herstellung von Lösungen und bei der Durchführung der Methode wurde nach Beschreibung des Herstellers gearbeitet. Zum Formen der Taschen wurde ein Silikon Streifen verwendet, statt Glasplatten mit Taschenformern. Als Laufpuffer wurde 1fach TAE-Puffer und Ladepuffer verwendet. Der Temperaturgradient belief sich von 33 °C bis 47 °C. Bei der TGGE wurden keine Banden ausgeschnitten.

3.5.7 Klonierung unterschiedlicher 16S rDNA Fragmente

Klonierung ist ebenfalls eine molekularbiologische Methode, die verschiedene DNA Sequenzen eines Amplifikats trennt. Prinzipiell, wird bei dieser Methode jeweils ein Fragment in ein für *Escherichia coli* geeignetes spezielles Plasmid kloniert und durch Vermehrung der Zellen vervielfältigt.

In dieser Arbeit wurde das TOPO TA *Cloning*[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) mit *one shot* chemokompetenten *Escherichia coli* TOP-10 verwendet. Es wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet.

Der hier verwendete TOPO Vektor 4,0 kb hat mehrere Eigenschaften codiert: ein Resistenzgen gegen Ampicillin, das Gen der β-Galaktosidase und eine virale Eigenschaft der häufigen Vervielfältigung wurden verwendet. Die Ampicillinresistenz wurde eingesetzt zur Selektion der transformierten Zellen auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten. Das Gen der β-Galaktosidase bildet die *multiple-cloning-site* des Vektors in die das DNA Fragment ligiert wird. Die β-Galaktosidase hydrolysiert 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (β X-Gal) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol. Sauerstoff oxidiert 5-Brom-4-chlor-3hydroxyindol zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Wurde das Fragment in den Vektor ligiert, wird die β-Galaktosidase nicht mehr exprimiert und der blaue Farbstoff kann nicht hergestellt werden. Dies wurde als qualitativer Indikator verwendet, ob die Ligation des Fragments in den Vektor erfolgreich war. Der virale Teil des Vektors bewirkte, dass das eingebrachte Fragment in großer Menge in einer Zelle kopiert wurde, was ermöglichte, eine

Kolonie-PCR durchzuführen, ohne die transformierten Zellen in Flüssigkulturen zusätzlich zu vervielfältigen.

Die Klone wurden auf LB-Agarplatten mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Ampicillin und $40 \mu\text{g L}^{-1}$ β X-Gal ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert.

Einige weiße Kolonien wurden jeweils in $50 \mu\text{L}$ ddH₂O suspendiert und $2 \mu\text{L}$ von der Zellsuspension in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz unterscheidet sich nicht zu den in Tabelle 20 (Kapitel 3.5.2) und Tabelle 21 (Kapitel 3.5.3) aufgeführten PCR-Ansätzen. Die PCR-Programme wurden bis auf die Initiale Denaturierung übernommen. Dieser Schritt wurde auf 15 min verlängert, um die Zellen aufzubrechen und die DNA freizusetzen.

3.5.8 Restriktionslängenpolymorphismus-Analyse von 16S rDNA Fragmenten zur Unterscheidung verschiedener Genera und Arten von Mikroorganismen

Der Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP, Saiki *et al.* 1985), genauer die amplifizierte ribosomale DNA Restriktionsanalyse (ARDRA, Vanechoutte *et al.* 1993), wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, um eigenisolierte Reinkulturen und Gesamt-DNA aus Fermentern von Biogasanlagen molekularbiologisch zu analysieren. Restriktionsenzyme sind DNA an spezifischen Stellen schneidende Endonukleasen (Voet und Voet 1990). Die meisten Restriktionsenzyme erkennen spezifisch Palindrom-Sequenzen. Restriktions-Endonukleasen des Typ-II schneiden DNA an einer spezifischen Schnittstelle innerhalb ihrer Erkennungssequenz wie zum Beispiel HaeII (Stein *et al.* 1998, Slatko *et al.* 1988) und HaeIII (BsuRI, Slatko *et al.* 1988) aus *Haemophilus aegyptius* (Pittman und Davis 1950). HaeII hat die Erkennungssequenz 5'-RGCGCY-3' und schneidet zwischen den Basen C und Y auf dem 5'-Strang und zwischen Y und C auf dem 3'-Strang, was kohäsive Enden der geschnittenen DNA Fragmente zur Folge hat. HaeIII schneidet in der Erkennungssequenz 5'-GGCC-3' zwischen den Basen G und C auf beiden Strängen, was stumpfe Enden der restringierten DNA ergibt. Amplifikate der 16S rDNA (Tabelle 20, Kapitel 3.5.2 und Tabelle 21, Kapitel 3.5.3) wurden unabhängig mit HaeII und HaeIII geschnitten, um Unterschiede in der hoch konservierten 16S rDNA aufzuzeigen. Für einen Restriktionsansatz wurde das Amplifikat mithilfe des *PCR-Purification Kits* (Qiagen, Hilden) in $30 \mu\text{L}$ doppelt deionisiertem, steril filtriertem Wasser aufgereinigt und jeweils $10 \mu\text{L}$ der aufgereinigten Fragmente mit $1,5 \mu\text{L}$ Restriktionspuffer (ungeschnittene Negativkontrolle), 10 U HaeII mit $1,5 \mu\text{L}$ Restriktionspuffer und 10 U HaeIII mit $1,5 \mu\text{L}$ Restriktionspuffer zugefügt. Inkubiert wurde entweder 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C . Agarose-gelelektrophoretisch wurden die entstandenen Restriktionsfragmente aufgetrennt. Auf diese Weise wurde zum Beispiel nach einer Klonierung (Kapitel 3.5.7) eine Vorselektion vorgenommen, indem jeweils ein Exemplar eines jeden Schnittmusters statt jeder Klon zur Sequenzierung versendet wurde.

3.5.9 Reamplifizierung und Sequenzierung reiner 16S rDNA-Fragmente

Die aus den DGGE-Gelen in deionisiertes und steril filtriertes Wasser eluierten 500 bp Fragmente wurden erneut amplifiziert (Tabelle 21 und Tabelle 23). Hierbei wurde das Oligonukleotid Ar1000f verwendet, da der bei der DGGE/TGGE benötigte GC-Anhang von GCAr1000f bei der Sequenzierung das Ergebnis verkürzte. Bei einer Kolonie-PCR nach einer Klonierung wurden die in Tabelle 21 und Tabelle 23 aufgeführten PCR-Parameter der initialen Denaturierung auf 15 min erhöht. Die Erhöhung der Dauer des Initialen Schrittes bewirkte das Aufbrechen der als Vorlage von Agarplatten abgestrichenen Zellen, so dass die Plasmide austreten konnten, in welche zuvor die Ziel-DNA kloniert und die durch Zellvermehrung vervielfältigt worden sind.

Die Reamplifikate beider oben beschriebenen Methoden wurden mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Aufgereinigten Fragmente wurden zum Sequenzieren an Eurofins mwg Operon (Ebersberg) beziehungsweise LGC Genomics (Berlin) versendet. Die digital erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mittels einer frei zugänglichen Internetdatenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dort hinterlegten Sequenzen verglichen, um die Art zu ermitteln. Da diese Datenbank eine freie Datenbank ist kann sie fehlerbehaftet sein. Daher wurden die eigenen Sequenzen zusätzlich mit digital hinterlegten Sequenzen der Typstämme verglichen, die in der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) registriert sind.

3.5.10 Phylogenetische Analysen partieller 16S rDNA aus eigenisolierten Reinkulturen und Klonen

Zur phylogenetischen Analyse wurden die *Softwares* Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA) oder Phylip 3.65 (Felsenstein 1989) verwendet. Für multiple Alignierungen wurde das JavaScript unterstützte *online tool* ClustalW2 (EBI, UK) genutzt. Es wurden ausschließlich Alignierungspositionen berücksichtigt, bei denen die Sequenzen mindestens 50 % identisch waren (50 % Gewichtung). Zwei verschiedene Stammbäume wurden mit den Modellen *Neighbor Joining* (Saitou und Nei 1987) und *Maximum Parsimony* (Sober 1983) berechnet. Zur statistischen Absicherung wurden *Bootstrap*-Analysen (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979) durchgeführt. Der Bootstrap-Wert gibt für jede Verzweigung an, wie oft die einzelnen Positionen der Sequenzen aus den Datensätzen stabil berechnet werden konnten. Es wurden jeweils 100 Baumkonstruktionen berechnet. Als *out-group* wurden die in der NCBI-Datenbank hinterlegten 16S rDNA Sequenzen von *Methanobacterium formicum*^T DSM1535 für die Stammbaumerstellung der *Bacteria* und *Methanopyrus kandleri*^T DSM6324 für die

Stammbaumerstellung der *Archaea* angegeben. Die phylogenetischen Stammbäume wurden teilweise mit TreeView (by Roderic D. M. Page, UK, 1996) visualisiert.

3.6 Chemische Analysen von Substraten und Produkten in Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen

Die Umsetzung von Substraten, wie Propionsäure durch propionsäureverwertende Mikroorganismen wurde in dieser Arbeit mithilfe der *high-performance liquid chromatography* (HPLC, Kapitel 3.6.1) nachvollzogen. Die Produktion von Methan durch methanogene *Archaea* wurde mit der Gaschromatographie (GC, Kapitel 3.6.2) nachgewiesen. Bei diesen chemisch-analytischen Methoden wurden Stoffeigenschaften ausgenutzt, um Stoffwechselprodukte aufzutrennen und ihre Konzentration zu messen. Damit wurden Umsetzungsraten und Produktionsmaxima errechnet (Kapitel 4.7.1 und 4.7.5).

3.6.1 HPLC-Analysen des mikrobiellen anaeroben Propionsäureabbaus

Substrate und Produkte des mikrobiell bedingten anaeroben Propionsäureabbaus wurde mithilfe eines computerautomatisierten *high-performance liquid chromatography* (HPLC)-Systems (Kapitel 2.1, Seite 70) gemessen.

Die propionsäureabbauenden Anreicherungs- und Mischkulturen wurden in PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) und PIP-Medium, ohne Reaktorfiltrat, sowie in PI-Medium mit 40 mmol L⁻¹ Fumarat beziehungsweise 5 mmol L⁻¹ Bromoethansulfonsäure (BrES) 1:10 mit Kulturen in stationärer Phase (stagnierter Propionsäureabbau) überimpft und im Dunkeln bei 39 °C inkubiert.

Die Konzentrationen von Propionat, Acetat, Fumarat und Succinat wurden anhand zuvor bestimmter Referenzwerte mit der den Analyse-Systemen angeschlossenen Analysesoftware mit der Masse pro Liter m in [g L⁻¹] berechnet und mit einer Tabellenbearbeitungssoftware (Excel, Microsoft) mit der Molaren Masse M [g mol⁻¹] (für Propionsäure = 47,08 g mol⁻¹ und Acetat = 60,05 g mol⁻¹) in die Stoffmenge n [mmol L⁻¹] umgerechnet.

$$n = \frac{m \cdot 1000}{M}$$

n = Stoffmenge pro Liter Medium [mmol L⁻¹]

m = Masse [g L⁻¹]

M = Molare Masse [g mol⁻¹]

Formel 31: n = Stoffmenge pro Liter Medium [mmol L⁻¹] aus m = Masse [g L⁻¹] dividiert durch M = Molare Masse [g mol⁻¹].

Bei den Messungen wurde davon ausgegangen, dass das automatisierte HPLC-System eine maximale Systemungenauigkeit von 5 % erzeugt. Daher wurden zwei-fach Messungen einer Probe durchgeführt, solange die Messwerte unterhalb der 5 % Systemungenauigkeit (Standardabweichung (σ)) lagen. Sobald die Messwerte um über 5 % Systemungenauigkeit differierten, wurden drei-fach Messungen einer Probe durchgeführt. Die Standardabweichung σ wurde aus dem Mittelwert der Messwerte x und der Anzahl der Messwerte N mit folgender Gleichung von einer Tabellensoftware (Excel, Microsoft) berechnet.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N}}$$

σ = Standardabweichung

N = Anzahl der Messwerte

x = Mittelwert der Messwerte

Formel 32: Standardabweichung σ aus dem Mittelwert der Messwerte x und der Anzahl der Messwerte N .

Für die HPLC-Messungen der organischen Säuren Propionat und Acetat wurde ein externer Standard mit 1 g L^{-1} Acetat und 2 g L^{-1} Propionsäure in doppelt deionisiertem Wasser bestimmt und für die Probenmessungen als Referenzkonzentrationen in die Analysesoftware (LC-Solutions, Shimadzu) eingespeichert. In wöchentlichem beziehungsweise zweiwöchentlichem Turnus wurden je $600 \mu\text{L}$ Probe aus den propionsäureabbauenden Anreicherungs- und Mischkulturen mit einer Insulinspritze abgezogen. Diese Proben wurden 30 min bei $13,0 \text{ r min}^{-1}$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand durch ein Filterzentrifugationsröhrchen mit 3K PES-Membran 15 min in $1,5 \text{ mL}$ Reaktionsgefäße zentrifugiert, um nicht vorher abzentrifugierte Partikel aus dem Zentrifugationsüberstand herauszufiltern und mindestens über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Das Einfrieren bewirkte einen weißen Niederschlag, der direkt vor der Messung 30 min abzentrifugiert wurde. Daraufhin wurden die Proben in Gewindeflaschen ND8 mit Schraubkappe G8-L/Dichtscheibe-1,3 überführt und in den automatischen Probengeber des HPLC-Systems zur Messung des Propionsäuregehalts im Kulturüberstand gestellt. Der Propionsäure-, und Essigsäuregehalt der propionsäureabbauenden Anreicherungskulturen in PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) wurde mithilfe eines UV-Vis Detektors gemessen. Dazu wurde zuvor ein externer Standard mit 1 g L^{-1} Essigsäure und 2 g L^{-1} Propionsäure in doppelt deionisiertem Wasser bestimmt und als Maß für alle Messungen mit dem UV-Vis Detektor verwendet. Die für die Messung organischer Säuren verwendeten Puffer sind tabellarisch in Kapitel 2.5.6 aufgeführt.

$20 \mu\text{L}$ Injektionsvolumen wurden durch den automatischen Probengeber in das HPLC-System gespritzt. Das injizierte Volumen wurde mit einem 20 min ütigen Programm zur Auftrennung des Mediums über eine Ionentauscher-Säule aufgetrennt und mit dem UV-VIS Detektor bei 210 nm

erfasst. Bei einem folgenden Waschprogramm lief innerhalb 2 min ein automatisierter Pufferwechsel über einen Gradienten ab. Die Säule wurde 10 min mit 90 % Methanol und 10 % 50 mmol L⁻¹ H₃PO₄-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde die für das Messprogramm notwendige Pufferzusammensetzung innerhalb 2 min wieder hergestellt und die Säule 5 min equilibriert. Die Programmparameter für die Messungen des Propionsäuregehalts in den Medien PI mit einem UV-Vis Detektor sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Programmparameter der UV-Vis Messungen des Propionsäuregehalts im Medium PI

Programmabfolge	Zeit [min]	50 mmol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ - Puffer [%]	99,9 % Methanol [%]
Probenauftrennung	20	100	0
Gradient	2	100-10	0-90
Waschen	10	10	90
Equilibrierung	2	10-100	90-0
Nachlauf	5	100	0

Die Durchflussrate des Puffers und des Methanols betrug während den Arbeitsschritten 1 mL min⁻¹. Das HPLC-System wurde nach spätestens 24 h Laufzeit über Nacht mit 99,9 % Methanol mit einer Flussrate von 0,2 mL min⁻¹ gespült, um die Säule vollständig von Mediumrückständen zu befreien.

Um das Substratverhalten der propionsäureabbauenden Kulturen näher zu untersuchen, wurde dem PI-Medium 40 mmol L⁻¹ Fumarsäure zugegeben. Der Propionsäure-, Acetat-, Fumarsäure-, und Bernsteinsäuregehalt (Succinat) wurde mithilfe eines RI Detektors gemessen, da Fumarsäure aufgrund seiner Doppelbindung ein zu starkes Signal bei Wellenlänge von 210 nm erzeugt und somit ein UV-Vis Detektor ungenaue Messdaten lieferte. Hierzu wurde ein externer Standard von 0,5 und 1 g L⁻¹ Essigsäure, 0,5 und 1 g L⁻¹ Fumarsäure, 0,5 und 1 g L⁻¹ Bernsteinsäure und 0,5 und 2 g L⁻¹ Propionsäure in doppelt deionisiertem Wasser bestimmt. Eine Dreipunkt-Standardgerade wurde mit den Konzentrationswerten der Standards in die HPLC-Analysesoftware eingespeichert. Die Empfindlichkeit des Brechungsindex-Detektors wurde auf 0,5 · 10⁻⁵ RIU F.S.⁻¹ und die Temperatur der Messzelle auf 45 °C gestellt. 20 µL Injektionsvolumen wurden durch den automatischen Probengeber in das HPLC-System gespritzt. Eine Probe wurde innerhalb 12 min über die Ionentauscher-Säule aufgetrennt und die organischen Säuren mit dem RI Detektor erfasst. Die Proben wurden direkt hintereinander gemessen. Das Waschen der Säule erfolgte nach spätestens 10 h Messzeit über Nacht mit 90 % Methanol und 10 % H₃PO₄-Puffer bei einer Durchflussrate von 0,2 mL·min⁻¹, um die Säule vollständig von Mediumrückständen zu befreien. Am nächsten Messtag wurde die Säule wieder durch 100 % 50 mmol L⁻¹ H₃PO₄-Puffer mit einer Durchflussrate von 1 mL pro min equilibriert. Die einzelnen Messungen wurden digital von der Rechnersoftware (LC-Solutions, Shimadzu) anhand der eingespeicherten Parameter des externen Standards ausgewertet. Die Ergebnisse

wurden digital gespeichert und teilweise mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft) für diese Arbeit visualisiert.

3.6.2 Gaschromatographie der mikrobiellen Methanbildung

Zur Bestimmung der Methanbildungsrate von Eigenisolaten aus Fermentern von NawaRo-Biogas-Anlagen wurde der Methangehalt in den gasförmigen Kulturüberständen gaschromatographisch gemessen. Die Parameter des verwendeten Gaschromatographen sind in Kapitel 2.1, Seite 70 tabellarisch aufgelistet.

Der Injektor, der Vordetektor, sowie der Wärmeleitdetektor wurden auf 200 °C erhitzt. Die Empfindlichkeit des Detektors wurde auf 40 mA Stromstärke eingestellt. Die Carbosieve SII Säule wurde auf 199 °C erhitzt. Diese Säule gehört zu den *Carbon Molecular Sieves* (CMS), welche aus einem porösen Netzwerk von Bruchstücken pyrolysierten Kohlenstoff-Polymeren bestehen. Aufgrund der sehr kleinen Poren können mit diesem Packmaterial sehr kleine Moleküle aufgetrennt werden. Die Durchflussrate des Trägergases Helium betrug während den Messungen 20 mL min⁻¹. Für die quantitativen Messungen des Methans über Kulturen wurde ein Standard aus 0,5 mL 100 % Methan ermittelt (Abbildung 109, n = 5) und zur Berechnung des Methangehalts von Proben verwendet. Dazu wurde Methan in 100 mL Serumflaschen mit 1 bar Überdruck geleitet und auf 40 °C im Inkubator temperiert. Als Standardprobe dienten 0,6 mL mit einer Insulinspritze genommenes Gas, von denen 0,5 mL in das GC-System über den Injektor manuell eingespritzt wurde, nachdem durch Drücken den Stempels direkt über dem Injektor der GC das Volumen um 0,1 mL reduziert worden war. Ein Volumen von ebenfalls je 0,6 mL wurde mit einer 1 mL Insulinspritze der Gasphase über anaeroben Kulturen entnommen und 0,5 mL in den Gaschromatographen injiziert. Daraufhin wurde die Messung sofort gestartet. Eine Messung dauerte 9 Minuten. Zur längerfristigen Equilibrierung der Säule, wurde diese über Nacht auf 199 °C erhitzt. Der Durchlauf des Heliums betrug 8 mL min⁻¹. Wurde der Gaschromatograph länger als über Nacht nicht benötigt, wurden der Injektor, Vordetektor, sowie der Detektor auf 170 °C und die Säule auf 150 °C erhitzt. So wurde gewährleistet, dass sich keine Ablagerungen im System bilden konnten. Auch bei den gaschromatischen Messungen wurde bei einer Standardabweichung (Kapitel, 3.6.1, Formel Seite 115) über 5 % dreifach-Messungen statt Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messungen wurden digital von der Rechnersoftware (GC-Solutions, Shimadzu) anhand des eingespeicherten Standardmittelwertes ausgewertet. Die Ergebnisse wurden digital gespeichert. Mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft) wurden die gemessenen Werte begründend auf der allgemeinen Gasgleichung idealer Gase mit dem Druck p , dem Volumen V , der Gaskonstanten R und der Temperatur T in die Stoffmenge n pro Liter [mmol L⁻¹] umgerechnet.

$$n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T}$$

Formel 33: Nach der Stoffmenge n [mmol L⁻¹] umgeformte allgemeine Gasgleichung; Druck, $p = 101325$ Pa; Volumen, $V = 0,001$ m³; Gaskonstante, $R = 8,3144621$ J · mol⁻¹ · K⁻¹; Temperatur, $T = 313,15$ K.

In dieser Arbeit wurde diese Gleichung (Formel 33) zur Errechnung der Stoffmenge des Methans gewählt, da sich die Gasproben in der Kanüle in einem nahezu offenen System befunden hatten, bis sie in die GC eingebracht wurden.

Aus fünf Methanstandardproben wurde von der GC-Software ein Mittelwert gebildet (Abbildung 109) und gleich 100 % gesetzt. Anhand dieses Mittelwertes wurden die Messwerte von Proben analysiert. Mithilfe einer Tabellensoftware (Excel, Microsoft) wurde die allgemeine Gasformel idealer Gase nach der Stoffmenge n aufgelöst (Formel 33) und der Methangehalt des gasförmigen Kulturüberstandes in mmol L⁻¹ mit Standardabweichung (Formel 32) berechnet. Der Standardmethangehalt von 100 % entsprach bei 1 bar Überdruck und 40 °C somit 38,9 mmol L⁻¹ Methan.

In dieser Arbeit wurden Doppelbestimmungen der Methangehalte eines Messzeitpunktes gemessen. Bei einer Abweichung der Messwerte um mehr als 5 %, wurde eine dritte Messung durchgeführt.

3.7 Chemische Analyse des Reaktorfiltrats

Als Zusatz zu vielen synthetischen Medien (Kapitel 2.6) wurden verschiedene Konzentrationen eines Reaktorfiltrats verwendet, um den Mikroorganismen eine möglichst gewohnte Umgebung bereit zu stellen. Dieses Reaktorfiltrat wurde durch Zentrifugation bei 5000 r·min⁻¹ (Cryofuge 5000, Heraeus) und Steril Filtration durch 250 mL fassende 0,2 µm Cellulose-Filtereinheiten (vwr, Darmstadt) des Reaktorinhalts gewonnen. Eine schwarz-braune Flüssigkeit war das Ergebnis der Reaktorfiltratextraktion. Es stellte sich die Frage, welche Stoffe in diesem flüssigen Filtrat vorhanden sind. Dieser Frage wurde chemisch-analytisch nachgegangen, indem zum einen die Aminosäurezusammensetzung und zum anderen die Zuckerzusammensetzung des Reaktorfiltrats untersucht wurden. Dazu wurden *Aliquots* des Filtrats teilweise durch 3 K Zentrifugationsfiltereinheiten (vwr, Darmstadt) filtriert, um restliche Partikel aus der Flüssigkeit zu entfernen und für die Aminosäure- und Zuckerdetektion vorbereitet.

3.7.1 Dünnschichtchromatographie des Reaktorfiltrats

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC, Randerath 1965) werden Wechselwirkungen organischer Substanzen einer Probe mit einer Festphase und einer Flüssigphase ausgenutzt. Jede organische Substanz hat eine individuelle Geschwindigkeit bei dem Übergang von der

Festphase in die Flüssigphase. Die mit der Flüssigphase durch die Festphase diffundierenden organischen Substanzen haben aufgrund ihrer individuellen Übergangseigenschaften von fest in flüssig eine Auftrennung der organischen Substanzen zur Folge.

Die Dünnschichtchromatographie ermöglichte in der vorliegenden Arbeit eine qualitative Analyse der Aminosäurezusammensetzung des Reaktorfiltrats und wurde in einer vertikalen DC-Kammer durchgeführt. Hierzu wurde als stationäre Phase eine kieselgelbeschichtete Aluminiumplatte (Merck, Darmstadt) und als flüssige Phase Butanol, Eisessig und H₂O im Verhältnis 4:1:1 verwendet. Zur Visualisierung der Aminosäuren wurde 1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) eingesetzt. Dansylchlorid verbindet sich mit seiner Schwefelgruppe an die freie Aminogruppe einer jeden Aminosäure unter Abspaltung von HCl (Voet und Voet 1990) zu Dansyl-Amid, welches mit UV-Licht angeregt werden kann und gelbes Licht emittiert. 100 µL ungefiltertes, wie 3000 K-gefiltertes Reaktorfiltrat wurden mit 100 µL NaHCO₃-Lösung (0,1 g mL⁻¹ in doppelt deionisiertem Wasser) und 100 µL Dansylchlorid-Lösung (1,5 mg mL⁻¹ Aceton) gemischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurde die Dansylchloridreaktion mit 800 µL 10% Formiatlösung gestoppt und 10 µL dieses Gemischs punktweise auf den untersten Zentimeter einer DC-Platte aufgetropft. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Butanol, Eisessig und H₂O (Verhältnis 4:1:1) gewählt (Randerath; 1965). Nach der Entwicklung wurde die Lauffront der Platte markiert und daraufhin unter dem Abzug getrocknet. Der Retentions (R_f)-Faktor wurde anhand des Verhältnisses der Wanderungsstrecke des Substanzflecks (S) zur Wanderungsstrecke des Lösemittels (L) errechnet.

$$R_f = \frac{S}{L}$$

R_f = Retentionsfaktor

S = Substanzfleck

L = Lösemittel

Formel 34: Verhältnis der Wanderungsstrecke des Substanzflecks; R_f = Retentionsfaktor; S = Substanzfleck; L = Lösemittel.

Auf einem UV-Tisch wurden die Aminosäuren des Reaktorfiltrats visualisiert und mit einer tragbaren Digitalkamera fotografiert.

3.7.2 HPLC-Analysen des Reaktorfiltrats

Die Detektion von Aminosäuren und Zuckern im Reaktorfiltrat wurde chemisch-analytisch mithilfe der *high-performance liquid chromatography* (HPLC) -Systeme (Kapitel 2.1, Seite 70 und 71) durchgeführt. Dafür wurde Reaktorfiltrat durch 3K-Filter 15 min zentrifugiert.

Für die Detektion von Aminosäuren wurde die Interaktion von Dansylchlorid mit Aminosäuren ebenfalls verwendet und mit der Probenvorbereitung so verfahren, wie in Kapitel 3.7.1

beschrieben. Es wurde 1:10 verdünntes Reaktorfiltrat (3 K-filtriert) als Probe verwendet. Die in HPLC Flaschen (Kapitel 3.6.1) abgestoppte Lösung wurde in den automatischen Probengeber des computerautomatisierten HPLC-Systems (Kapitel 2.1, HPLC-System Aminosäuren) platziert. 3 μL der Probe wurden automatisch in das System gespritzt und die Aminosäuren mit einer Flussrate von 1 mL pro Minute (Puffer siehe Kapitel 0) mit dem in Tabelle 27 aufgelisteten Programm mit einem Puffergradienten aufgetrennt.

Tabelle 27: Programmablauf zur RF-Messung von Aminosäuren im Reaktorfiltrat

Programmabfolge	Zeit [min]	50 mmol L ⁻¹ Na-Acetat-Puffer, pH 6,3 [%]	25 % Methanol [%]
Vorlauf	10	100	0
Gradient	45	100-50	0-50
Waschen	13	50-10	50-90
Equilibrierung	2	10-100	90-0
Nachlauf	15	100	0

Der Fluoreszenz-Detektor nahm die Signale der Aminosäuren bei einer Extinktion von 340 nm und einer Emission von 530 nm, mit den Einstellungen *range 8*, *response medium* und einer hohen Sensivität auf. Mit der Software wurden die Messungen aufgezeichnet und ausgewertet. Parallel wurden Aminosäurestandards (etwa 10 mg mL⁻¹ Wasser) in doppelt deionisiertem Wasser gemessen, um herauszufinden um welche Aminosäuren und in Etwa welchen Gehalt es sich im Reaktorfiltrat handelt. Wie bei den Messungen organischer Säuren wurden dreifach-Messungen statt Doppelbestimmungen bei einer Standardabweichung über 5 % (Kapitel, 3.6.1, Formel Seite 115) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden digital gespeichert und teilweise mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft) für diese Arbeit visualisiert.

Zucker im Reaktorfiltrat wurden mit einem weiteren automatisierten HPLC-System (Kapitel 2.1, HPLC-System Zucker) gemessen. Dazu wurde 10 %, 3 K filtriertes Reaktorfiltrat verwendet. 5 μL Probe wurde vom automatischen Probengeber in das System gespritzt. Der 0,013 N H₂SO₄-Puffer (0, Zucker) hatte während des gesamten Laufs jeder Probe eine Flussrate von 0,6 mL pro Minute. Der Brechungsindex-Detektor wurde auf eine mittlere Sensivität eingestellt. Der an das System angeschlossene Drucker hatte einige Zucker mit Konzentrationen gespeichert, die es ermöglichten, die Zucker im Reaktorfiltrat zu benennen und deren Gehalt in g L⁻¹ zu bestimmen. Auch bei den Messungen von Zuckern wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und eine Standardabweichung (Kapitel, 3.6.1, Formel Seite 115) ermittelt. Die ausgedruckten Ergebnisse wurden archiviert.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen, Laborfermentern und propionsäureabbauenden Mischkulturen

4.1.1 Isolierung von Bakterien aus propionsäureabbauenden Mischkulturen

In dieser Arbeit wurden aus den propionsäureabbauenden Mischkulturen Ap1a und Fp1a (Tabelle 14) anaerobe Bakterien (Tabelle 16) in DSMZ-Medium 520 (DSMZ 2012) mit der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Durchführung isoliert.

Tabelle 28: Eigenisolierte anaerobe Bakterien aus den anaerob propionsäureoxidierenden Mischkulturen Ap1a und Fp1a

Spezies ^a	Herkunft (Ort)	DSMZ-Medium
<i>Clostridium sartagoforme</i> Stamm Ap1a520	Arenrath ¹	520
<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> Stamm Fp1a520	Hochdorf-Assenheim ²	520

^a Eigenisolate wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

¹ Biogasanlage Arenrath GmbH & Co KG; ² Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR

Die Identifizierung der isolierten Bakterien erfolgte über die Analyse der partiellen 16S rDNA (Kapitel 3.5.1, 3.5.2, 3.5.5 und 3.5.9). Die Ergebnisse der 16S rDNA-Analyse werden in Kapitel 4.5.2 besprochen.

4.1.2 Isolierung methanogener Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern

Aus NawaRo-Biogasanlagen-Proben (Kapitel 3.1) und Proben (Tabelle 15) aus Laborfermentern (Klocke *et al.*, 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) wurden in dieser Arbeit methanogene Archaea aus fünf unterschiedlichen Gattungen eigenisoliert (Tabelle 16), wovon die Kulturen BEGN und LFP2.1 bis zum Ende des praktischen Teils der Arbeit bakteriell und BEG2N archaeal kontaminiert waren. Die Isolierung wurde durchgeführt, wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben wurde.

Tabelle 29: Eigenisolierte methanogene Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern

Spezies ^a	Herkunft (Ort)	DSMZ-Medium
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BEG1 ^{1, 1a}	Zweibrücken ⁴	287/ 287P
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm HWS1 ^{1, 1a}	Steinweiler ⁵	287/ 287P
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1 ^{1, 1a}	Potsdam ⁶	287/ 287P
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1 ^{1, 1a}	Hochdorf-Assenheim ⁷	287/ 287P
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1 ¹	Hochdorf-Assenheim ⁷	287
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm BEGN ¹	Zweibrücken ⁴	287
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm HWS1.1 ¹	Steinweiler ⁵	287
<i>Methanomethylovorans</i> sp. Stamm LFP3.1 ³	Potsdam ⁶	318
<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm BEG4 ²	Zweibrücken ⁴	334
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1 ^{1, 2, 3}	Steinweiler ⁵	318/ 318P
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3 ^{1, 2, 3}	Zweibrücken ⁴	318/ 318P
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm LFP2.1 ^{1, 2, 3}	Potsdam ⁶	318/ 318P
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm TAF1.2 ^{1, 2, 3}	Hochdorf-Assenheim ⁷	318/ 318P
<i>Methanosarcina siciliae</i> Stamm BEGN2 ^{1, 2, 3}	Zweibrücken ⁴	318

^a Eigenisolate wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben.

¹ Substrat H₂/CO₂, ^{1a} Formiat ² Substrat Acetat, ³ Substrat Methanol, ⁴ BioEnergie Glahn = BEG, ⁵ Hubert Wagner und Sohn GbR = HWS, ⁶ Laborfermenter des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e. V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie = LFP (Klocke *et al.*, 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010), ⁷ Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR = TAF

Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in Kapitel 2.6 aufgeführt. Die Identifizierung der methanogenen Eigenisolate erfolgte über die Analyse der archaealen 16S rDNA (Kapitel 3.5.1, 3.5.3, 3.5.5 und 3.5.7-3.5.9), deren Ergebnisse in Kapitel 4.6.3 besprochen werden und durch die Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.4.1, Ergebnisse siehe Kapitel 4.2.2).

4.2 Morphologie von Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern und anaerob propionsäureabbauender Mischkulturen

Propionsäure abbauende Mischkulturen und deren Unterkulturen (Tabelle 14) sowie die Eigenisolate methanogener Archaea aus NawaRo Biogasanlagen (Tabelle 18) und Laborfermenterproben (Tabelle 15) wurden regelmäßig phasenkontrastmikroskopisch überprüft und der visuelle Eindruck schriftlich dokumentiert.

4.2.1 DAPI-Färbung syntroph propionsäureoxidierender Mischkulturen

Im Phasenkontrast waren einige Mikroorganismen aufgrund ihrer Morphologie nicht von Partikeln des zugesetzten Reaktorfiltrats unterscheidbar (nicht gezeigt). Die Zellen der propionsäureabbauenden Mischkulturen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (Kapitel 3.4.1.1), der an DNA bindet und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert. Kultur Ap1a wurde auf diese Weise behandelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence) visualisiert. Die digital aufgenommenen Fotos unterschiedlicher Verdünnungen der anaerob propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1a sind im Folgenden gezeigt.

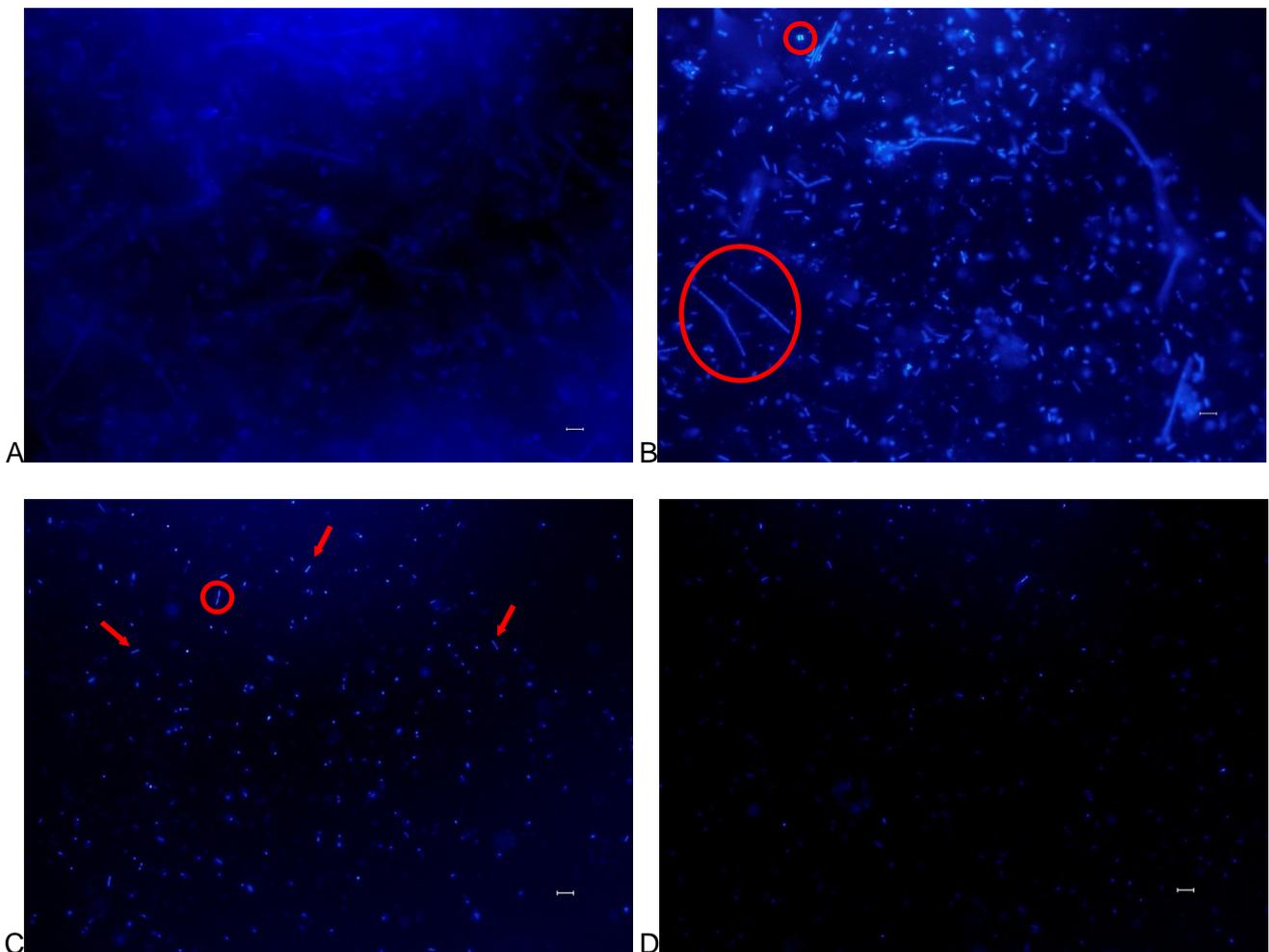


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit DAPI angefärbten propionsäureabbauenden Kultur Ap1a in PI-Medium und unbeimpftes, steriles PI-Medium; A unverdünnt; B 1:10 verdünnt; C 1:100 verdünnt; D unbeimpftes Medium; 400fache Vergrößerung; Größenmaß (weiß, unten rechts im Bild) = 5 μm .

In Abbildung 35 sind in den Teilabbildungen A bis C Verdünnungen in Zehner-Schritten der Kultur Ap1a aus der BGA Arenrath GmbH & Co KG visualisiert. Unterschiedliche Morphologien sind erkennbar. Kokken in Tetraden (zum Beispiel Abbildung 35 B, roter Kreis), kurze Stäbchen in Ketten (Abbildung 35 A bis C, rote Ellipse in B) kurze, gewölbte Stäbchen in Paaren (Abbildung 35 C) und

vermutlich gerade, einzelne Stäbchen (Abbildung 35 C, rote Pfeile). Eine Darstellung der Population der Kultur Ap1a in einer Ebene ist bei einer Verdünnung von 1:100 (Abbildung 35 C) gezeigt. Abbildung 35 D zeigt mit DAPI behandeltes, unbeimpftes, steriles Medium PI. Runde sowie längliche Gebilde in vergleichbarer Größe und Gestalt von Mikroorganismen wurden mit DAPI angefärbt. Es handelte sich bei den Partikeln somit um Pflanzenreste aus dem Reaktorfiltrat, deren DNA ebenfalls mit dem Farbstoff angefärbt wurde.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen methanogener Archaea

Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Autofluoreszenz des von methanogenen Archaea gebildeten Cofaktors F_{420} (Abbildung 29) in eigenisolierten Reinkulturen methanogener Archaea (Kapitel 3.3.2) aus Biogasanlagen (Tabelle 18) und Laborfermentern (Klocke *et al.* 2007, 2009 a, b, Nettmann *et al.* 2010) mit gefiltertem Licht angeregt, fotografiert und mit der zugehörigen Software die Bilder entrauscht und ein Größenmaß eingefügt. Im Folgenden sind Fotografien von Zellen eigenisolierter methanogener Archaea nach Gattungen geordnet gezeigt.

4.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie der eigenisolierten Reinkulturen der Art *Methanobacterium formicicum*

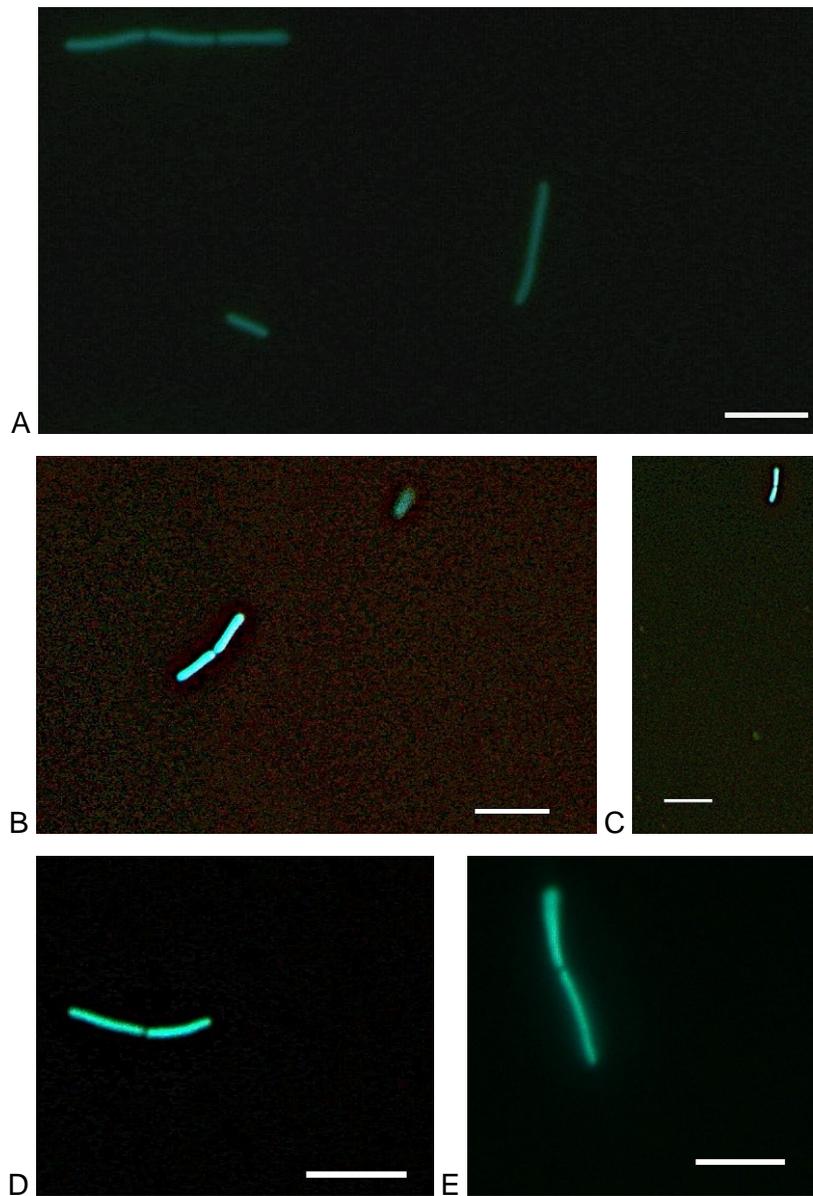


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der eigenisolierten Reinkulturen der Art *Methanobacterium formicicum* Stämme A TAF1 (Theo, Ingrid & Alexander Friedrich GbR), B HWS1 (Hubert Wagner und Sohn GbR), C BEG1 (BioEnergie Glahn), D LFP4.1 (Laborfermenter, Klocke *et al.* 2007, 2009 a, b, Nettmann *et al.* 2010) und der Typstamm E *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535; Bilder digital entrauscht; Größenstandard = 5 µm, weiß.

In Abbildung 36 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Art *Methanobacterium formicicum* eigenisolierter Kulturen (Kapitel 3.3.2) aus drei verschiedenen BGA's (Abbildung 36 A, B, C) und einer Laborfermenterprobe (Abbildung 36 D) gezeigt. Die geraden Stäbchen hatten eine Größe von 3 µm bis 4,5 µm und waren unbeweglich. Damit glichen Eigenisolate morphologisch sowohl dem Typstamm *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (Abbildung 36 E) als auch untereinander.

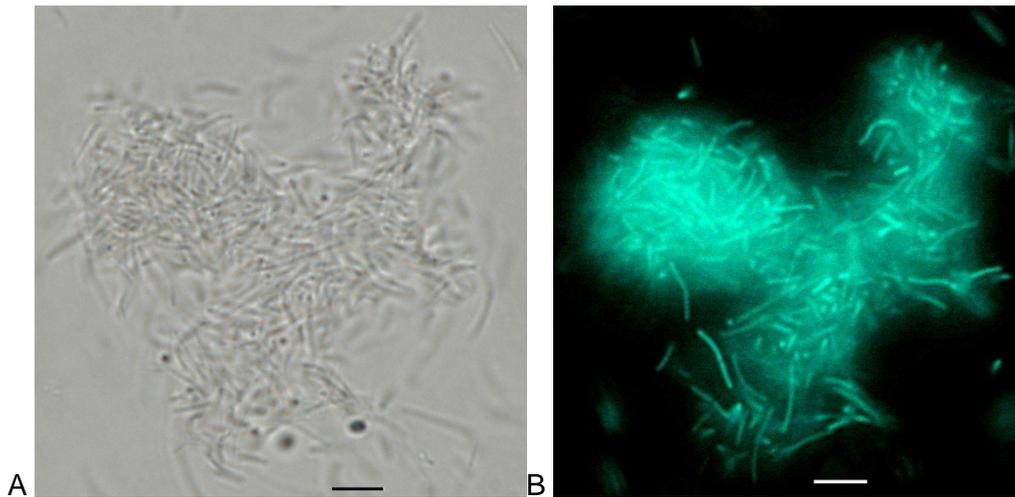


Abbildung 37: Zu Aggregat zusammengelagerte Zellen der Reinkultur *Methanobacterium formicicum* LFP4.1, A Hellfeldaufnahme, B Fluoreszenzaufnahme; Bilder digital entauscht; Größenstandard = 5 µm A schwarz, B weiß.

Nach Einsetzen des Wachstums lagen die Mikroorganismen in Ketten beziehungsweise in mit dem Auge erkennbaren Aggregaten vor, wie Abbildung 37 zeigt. Die im Hellfeld erkennbaren, unscharfen Mikroorganismen lagen in den Ebenen hinter dem Aggregat und sind im Fluoreszenzbild nicht erkennbar, da ihre Autofluoreszenz nicht ausreichte, um die Leuchtkraft des Aggregats zu überlagern.

4.2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen der Art *Methanoculleus bourgensis*



Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der eigenisolierten Kultur *Methanoculleus bourgensis* BEGN (BioEnergie Glahn); Bilder digital entauscht; Größenstandard = 5 µm, weiß.

Die archaeale Reinkultur (Kapitel 3.3.2) *Methanoculleus bourgensis* BEGN wurde in dieser Arbeit aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glahn eigenisoliert. Das Archaeon wies eine Morphologie von unregelmäßigen und unbeweglichen Kokken auf, die unter Anregung autofluoreszierten

(Abbildung 38). *Methanoculleus bourgensis* TAF1.1 bildete die gleiche Morphologie aus, wie in Abbildung 38 gezeigt.

4.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie eigenisolierter Reinkulturen der Art *Methanosarcina mazei*

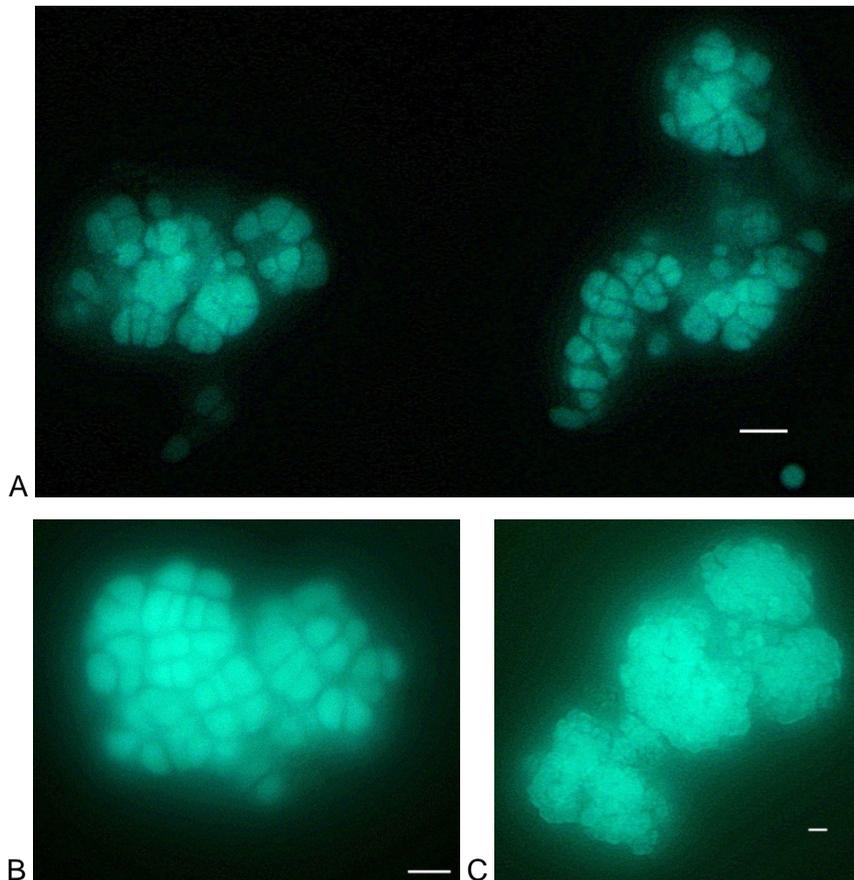


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der eigenisolierten Reinkulturen *Methanosarcina mazei* A Stamm TAF1.2 (Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR), B Stamm BEG3 (BioEnergie Glahn) und Typstamm C *Methanosarcina mazei*^T DSM2053; Bilder digital entrauscht; Größenstandard = 5 μm , weiß.

Die Stämme TAF1.2 und BEG3 mit dem zugehörigen Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Mah 1980) wurden exemplarisch abgebildet. Die Stämme *Methanosarcina siciliae* Stamm BEGN2 aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glahn und *Methanosarcina mazei* Stamm LFP2.1 aus dem Laborfermenter zeigten die gleiche Morphologie und Wachstumsweise, wie in Abbildung 39 gezeigt.

4.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der eigenisolierten Reinkultur HWS2.1 der Art *Methanosarcina barkeri*

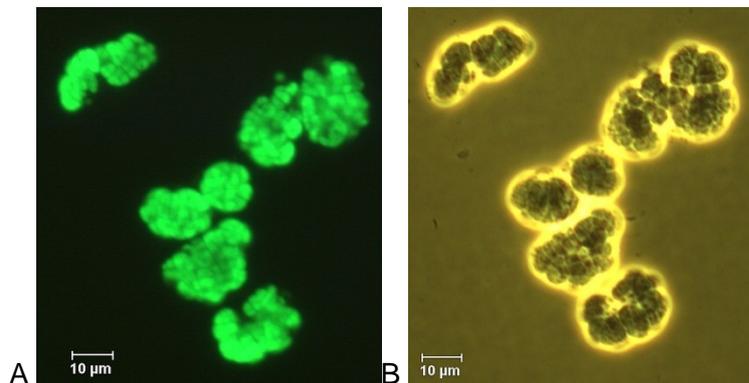


Abbildung 40: Mikroskopische Aufnahmen der eigenisolierten Reinkultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 A Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme B Phasenkontrast; Bilder digital entrauscht; Größenstandard = 10 µm, weiß.

Abbildung 40 A und B wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop von Schott erstellt, mit der zugehörigen Software entrauscht und der Größenstandard eingefügt. Die Morphologie gleicht der in Abbildung 39 C gezeigten Wachstumsweise von Kokken in Clustern der Stämme der Art *Methanosarcina mazei*.

4.2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie der eigenisierten Reinkultur LFP3.1 der Art *Methanomethylovorans* sp.

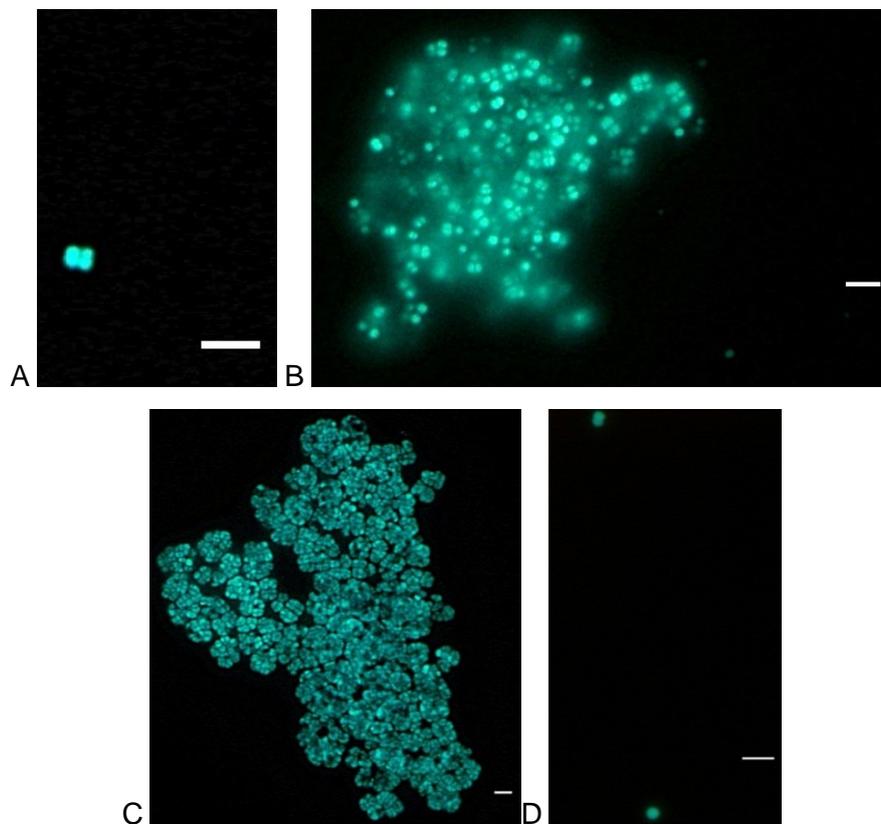


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen A der eigenisierten Reinkultur *Methanomethylovorans* sp. Stamm LFP3.1 (Laborfermenter, Klocke *et al.* 2007); B Cluster und den Typstämmen *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (C) und *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (D); Bilder digital entrauscht; Größenstandard = 5 µm, weiß.

Autofluoreszierende Kokken in Tetraden zeigt Abbildung 41 A und B diese Tetraden in Clustern zusammengelagert, welche der aus einem Laborfermenter reinisierte Stamm *Methanomethylovorans* sp. Stamm LFP3.1 bildete. Die Morphologie entsprach sowohl dem Wachstumsverhalten des Typstammes *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (Abbildung 41 C) als auch *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (Abbildung 41 D).

4.3 Titerbestimmung von Kulturen aus NawaRo-Biogasanlagen

4.3.1 Titerbestimmung propionsäureabbauender Mikroorganismen in Mischkulturen

Der Titer syntroph propionsäureabbauender Mikroorganismen in den Mischkulturen Fp1a, Wp2a, Gp1b und Ap1a (Tabelle 14) aus den in Tabelle 18 beschriebenen BGA's in fünffacher Wiederholung wurden mit dem MPN-Verfahren (Kapitel 3.4.2) ermittelt. Dabei wurde die Anwesenheit anaerob propionsäureabbauender Mikroorganismen über die chemische Analyse des Substrats Propionsäure in den Kulturüberständen bestimmt. Der Propionsäuregehalt wurde am Tag der Beimpfung und nach 10 Wochen mit der HPLC (Kapitel 3.6.1) gemessen. Die Differenz der beiden Messwerte bildete den Propionsäureumsatz in den Kulturmedien. Ein negativer Umsatz wurde qualitativ dem Wachstum der propionsäureabbauenden Mikroorganismen gleichgesetzt. Die Zahlenfolgen aus verwendeter Tabelle (siehe dazu Kapitel 3.4.2) ergaben mit dem Reziprokwert der mittleren Verdünnung folgende Zellzahlen pro Milliliter in der Ausgangskultur.

Tabelle 30: Titer propionsäureabbauender Mikroorganismen in PI-Mischkulturen mit dem MPN-Verfahren

Kultur ¹	Titer [Zellen L ⁻¹]
Fp1a	$7 \cdot 10^3$
Wp2a	$3,5 \cdot 10^4$
Gp1b	$5 \cdot 10^2$
Ap1a	$3,5 \cdot 10^4$

¹ Inkubationszeit betrug 10 Wochen

Die ermittelten Zellzahlen propionsäureabbauender Mikroorganismen in den Mischkulturen Fp1a, Wp2a, Gp1b und Ap1a (Tabelle 14) lagen in einem Bereich, bei dem die untere Erfassungsgrenze von $1 \cdot 10^4$ Zellen (Ziesing *et al.* in Hahn *et al.* 2008) einer mikroskopischen Charakterisierung unterschritten wird. Daher wurden molekularbiologische und chemische Charakterisierungsmethoden (Kapitel 4.5 und 4.7) angewendet.

4.3.2 Titerbestimmung eigenisolierter methanogener Archaea

Zellen eigenisolierter methanogener Archaea wurden mithilfe einer Toma-Kammer (Kapitel 3.4.1.2) und einem Phasenkontrastmikroskop gezählt und der Titer pro Liter Kulturmedium berechnet (Formel 30). Der Titer bei frisch überführten Kulturen des Archaeons *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 aus der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR lag bei durchschnittlich

10^{10} Zellen L^{-1} und der von Kulturen des Mikroorganismus *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 aus einem Laborfermenter (Klocke *et al.* 2007, 2009 a, b, Nettmann *et al.* 2010) bei durchschnittlich 10^{11} Zellen L^{-1} . Zellen des Stamms *Methanoculleus bourgensis* TAF1.1 wurden während der Wachstumsphase gezählt, um eine Korrelation zwischen dem Zellwachstum und der Methanproduktion herauszuarbeiten (Abbildung 119).

4.4 Physiologische Untersuchungen methanogener Eigenisolate mit unterschiedlichen Substraten

Eigenisierte methanogene Archaea wurden mit unterschiedlichen Substraten H_2/CO_2 und Formiat als Substrate für die hydrogenotrophe Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.1), Acetat und Essigsäure für die acetoklastische Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2), Methanol als Vertreter der methylotrophen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.3) und 2-Propanol als Vertreter für die Methanogenese aus zweiwertigen Alkoholen (Zellner und Winter 1987) kultiviert. Medien mit Substraten in der flüssigen Phase wurden mit N_2 und das Medium mit 2-Propanol mit CO_2 begast. Das Wachstum mit H_2/CO_2 als Substratmix wurde durch die Druckveränderung sowie visuell durch die Trübung oder mit dem Auge sichtbare Clusterbildung des Mediums und auch fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und schriftlich dokumentiert.

Tabelle 31: Wachstumsverhalten methanogener Eigenisolate mit unterschiedlichen Substraten

Stamm	H ₂ /CO ₂	Acetat	Essig- säure	Formiat	Methanol	2-Propanol
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BEG1	+	-	-	+	-	-
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm HWS1	+	-	-	+	-	-
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1	+	-	-	+	-	n. a. ^a
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1	+	-	-	+	-	-
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm BEGN	+	-	-	-	-	-
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1	+	-	-	-	-	-
<i>Methanomethylovorans sp.</i> Stamm LFP3.1	-	n. a. ^a	n. a. ^a	n. a. ^a	+	n. a. ^a
<i>Methanosaeta concilii</i> Opficon Stamm BEG4	-	+	-	n. a. ^a	-	n. a. ^a
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1	+	(+)	-	-	+	n. a. ^a
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm LFP2.1	+	(+)	-	-	+	n. a. ^a
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm TAF1.2	+	(+)	-	-	+	n. a. ^a
<i>Methanosarcina siciliae</i> Stamm BEGN2	+	(+)	-	-	+	n. a. ^a
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3	+	+	-	-	+	n. a. ^a

^an. a. = nicht analysiert; + Wachstum; (+) geringes Wachstum; - kein Wachstum

Stämme, welche der Gattung *Methanosarcina* zugehörten, wuchsen im Medium mit Acetat als Substrat zu vergleichsweise kleinen mit dem Auge gerade noch sichtbaren Clustern und zeigten nach der Inkubationszeit keine Autofluoreszenz mehr, was wahrscheinlich auf den restlosen Verbrauch des Acetats zurückzuführen ist. Hauptsächlich Stämme der Gattung *Methanoculleus* wurden in Medium mit 2-Propanol und CO₂ überführt, da einige Vertreter zweiwertige Alkohole zu Methan umsetzen können (Garcia *et al.* in Falkow *et al.* 2006). Die Stämme *Methanoculleus bourgensis* TAF1.1 und BEGN wuchsen nicht ohne Acetat im Medium, ebenso wenig wie mit Acetat als einzige C-Quelle. Keiner der methanogenen Archaea wuchs mit Essigsäure, was den Grund hatte, dass der pH-Wert unter dem pH-Optimum der methanogenen Archaea lag.

4.5 Systematik von Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen

Bakterielle Gesamt-DNA aus Fermenter- und Nachgärerproben sowie syntroph propionsäureoxidierende Anreicherungs-, Mischkulturen und Unterkulturen mit alternativen

Substraten aus NawaRo-Biogasanlagen wurden molekularbiologisch auf ihre mikrobielle Zusammensetzung untersucht, nachdem die *polymerase-chain-reaction* (*engl.* PCR, Kapitel 3.5.2) für bakterielle 16S rDNA aus Fermenter- und Nachgärerproben in dieser Arbeit optimiert und etabliert wurde. Bakterielle und methanogene Eigenisolate aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern wurden ebenfalls mit molekularbiologischen Methoden identifiziert. Die Gesamt-DNA wurde zunächst isoliert (Kapitel 3.5.1) und daraufhin die bakterielle und bei Kulturen archaeale 16S rDNA mit spezifischen synthetischen Oligonukleotiden (Kapitel 2.4) amplifiziert (Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Nach unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden (Kapitel 3.5.6-3.5.8) wurden die 16S rDNA-Fragmente reamplifiziert und extern sequenziert (Kapitel 3.5.9). Zudem wurde gezeigt, dass die molekularbiologische Methode der SAPD-PCR (Kapitel 3.5.4) auch mit Gesamt-DNA methanogener Archaea angewendet werden kann. Aus den erhaltenen Sequenzen bakterieller, sowie archaealer 16S rDNA aus Kulturen und Fermentern wurden mit der Phylogenie Software MEGA 4.0 Stammbäume mit Sequenzen von benachbarten Stämmen aus eigenanalyzierter 16S rDNA von Typstämmen von der Deutschen Stammsammlung (DSMZ) beziehungsweise in einer Datenbank (NCBI) hinterlegten 16S rDNA Sequenzen erstellt.

4.5.1 Analysen bakterieller 16S rDNA aus NawaRo-Biogasanlagen

Bakterielle DNA wurde aus Fermenterproben der in Tabelle 18 aufgeführten Biogasanlagen Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (TAF, F), Hubert Wagner und Sohn GbR (HWS, W), Arenrath GmbH & Co KG (A), BioEnergie Glahn (BEG, G) sowie des Nachgärers der BGA BioEnergie Glahn (GN) nach den in Kapiteln 3.5.1, 3.5.2, 3.5.5 und 3.5.7 bis 3.5.9 beschriebenen Methoden molekularbiologisch identifiziert. Für die Methodenetablierung der *polymerase-chain-reaction* (*engl.* PCR) für bakterielle 16S rDNA aus Biogasanlagen und Kulturen (Tabelle 14) in PI-Medium (Kapitel 2.6) wurde bakterielle chromosomale DNA aus der NawaRo-BGA BEG verwendet. Nach jeder Amplifizierung erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.5.5). Diese sind in dieser Arbeit nicht gezeigt, da sie lediglich zur Überprüfung des Erfolgs jeder Amplifizierung genutzt wurden.

4.5.1.1 Identifizierungsergebnisse bakterieller 16S rDNA aus dem Fermenter der NawaRo-Biogasanlage BEG mit Etablierungsergebnissen der PCR-Methode

Für Amplifizierungen isolierter chromosomaler DNA aus einer Fermenterprobe der NawaRo-BGA BEG (Tabelle 18) wurden jeweils 0,2 µL DNA eingesetzt und mit den bakteriellen Oligonukleotiden BSF8 und BSF1451 (Tabelle 8, Coton und Coton 2005) verfahren, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben. Es folgen die Ergebnisse der Methodenetablierung der PCR für Proben aus Biogasanlagen und Kulturen (Tabelle 14) in PI-Medium (Kapitel 2.6).

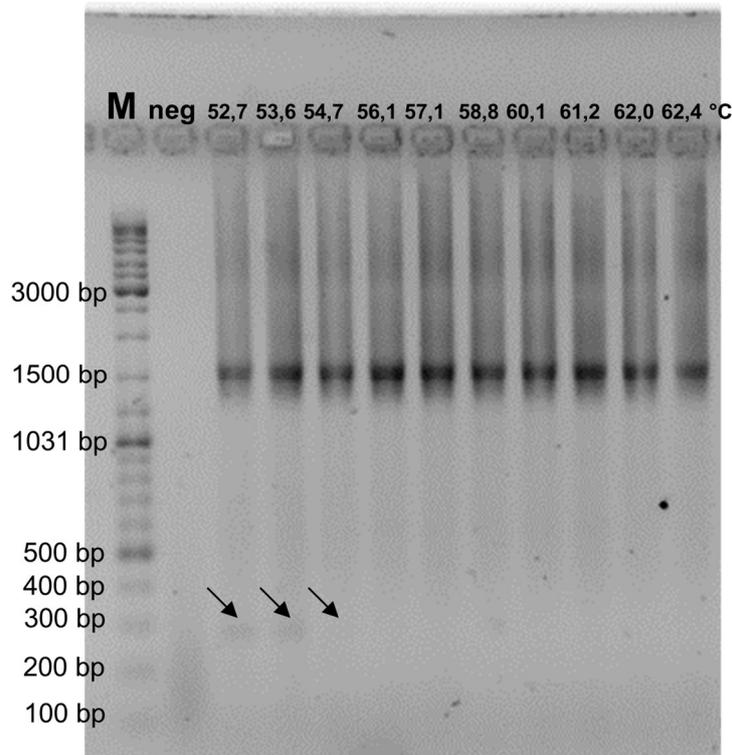


Abbildung 42: Temperaturgradienten-PCR bakterieller 16S rDNA aus einer Gesamt-DNA Isolierung des Fermenters BEG (BioEnergie Glahn); 5 μ L Amplifikat pro Geltasche eines 1 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Farben invertiert; schwarze Pfeile = unerwünschte Bande; M = 2,5 μ g GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331.

In Abbildung 42 sind jeweils 5 μ L Amplifikat gezeigt. Der Schleier in den Spuren über den erwarteten Banden auf der Höhe der 1500 bp Markierung gründet auf einer beabsichtigten Überladung des Agarosegels mit Amplifikat. Durch die Überladung ist nach der Amplifizierung bei 52,7 °C bis 54,7 °C ist jeweils eine unerwünschte Bande knapp unter der 300 bp Markierung erkennbar (schwarze Pfeile). Das meiste Amplifikat mit gewünschter Fragmentgröße wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 57,1 °C produziert.

Zum Vergleich der Zuverlässigkeit der PCR wurden die Amplifizierungs-Produkte mit 52,7 °C („52“) und 62,4 °C („62“) Oligonukleotidanlagerungstemperatur kloniert (Beschreibung siehe Kapitel 3.5.7). Im Folgenden ist die Auftrennung einer Kolonie-Amplifizierung in einem 1 %igen Agarosegel gezeigt, die mit je 5 μ L von 30 Klonen mit einer Anlagerungstemperatur bei 52,7 °C, sowie 30 Klonen mit einer Anlagerungstemperatur bei 62,4 °C durchgeführt worden war.

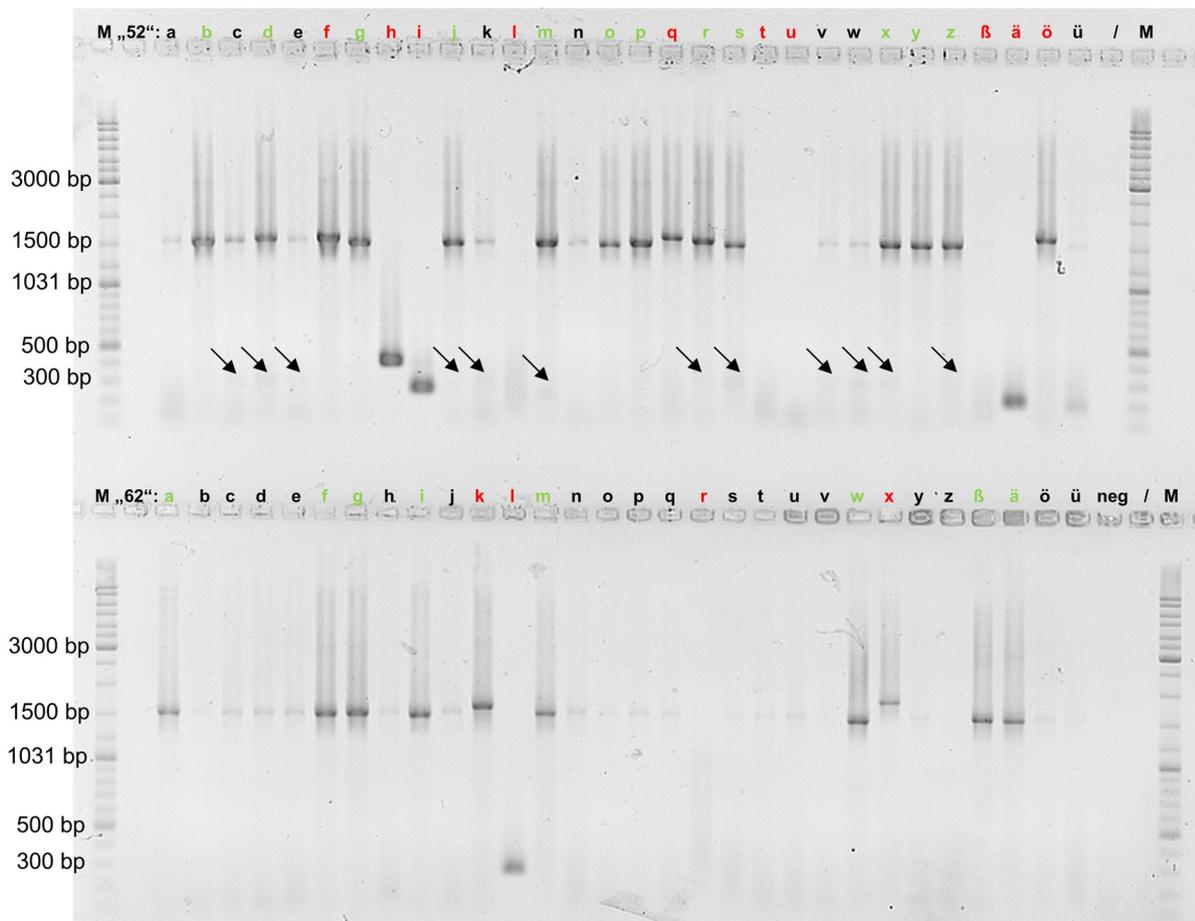


Abbildung 43: Kolonie-PCR bakterieller 16S rDNA aus je 2 μL Zellsuspension mit einem in *E. coli* transformierten Plasmid 4,0 des Fermenters BEG (BioEnergie Glahn); je 5 μL Amplifikat in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Buchstaben: grün = für RFLP geeignete Menge Amplifikat; rot = misserfolgte Klonierung; schwarz = zu wenig Amplifikat für RFLP; schwarze Pfeile = unerwünschte Bande; M = 5 μL GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 ($0,5 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, Fermentas); Farben invertiert.

Die Agarose-Gelelektrophorese in Abbildung 43 von je 5 μL einer Kolonie-PCR zeigte, dass die Klonierung einer Amplifizierung mit dem verwendeten Oligonukleotidpaar BSF8/BSR1451 bei einer Anlagerungstemperatur von 62,4 °C zuverlässiger war als eine Klonierung einer 16S rDNA-Vervielfältigung mit einer Anlagerungstemperatur bei 52,7 °C. Eine Anlagerungstemperatur von 52,7 °C lieferte 19 (schwarze und grüne Buchstaben, erste Reihe der Abbildung 43) erfolgreiche Klonierungen von insgesamt 30 analysierten Klonen, wovon 8 Amplifikate (schwarze Buchstaben) eine zu geringe DNA-Konzentration für eine weiterführende RFLP oder Sequenzierung lieferten. Außerdem waren in 12 von 30 Spuren (grüne wie auch schwarze Buchstaben) jeweils eine unerwünschte Bande auf der Höhe von 300 bp erkennbar (schwarze Pfeile). Bei 62,4 °C Anlagerungstemperatur - abgebildet in der zweiten Reihe der Abbildung 43 - waren 24 (schwarze und grüne Buchstaben) von 30 analysierten Klonierungen erfolgreich, wobei 8 (grüne Buchstaben)

von diesen 24 Amplifikaten genug Produkt lieferten, um eine RFLP durchführen zu können. Mit 4 μL Zellsuspension der Klone, die nicht genügend DNA für eine RFLP lieferten, wurde erneut eine Kolonie-Amplifizierung durchgeführt (Agarose-Gelelektrophorese nicht gezeigt). Folgend sind die Agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennten Restriktionen von jeweils 10 μL der erfolgreichen Kolonie-PCR-Amplifikate (1533 bp) verdaut mit jeweils 5 U des Restriktionsenzymys HaeIII abgebildet.

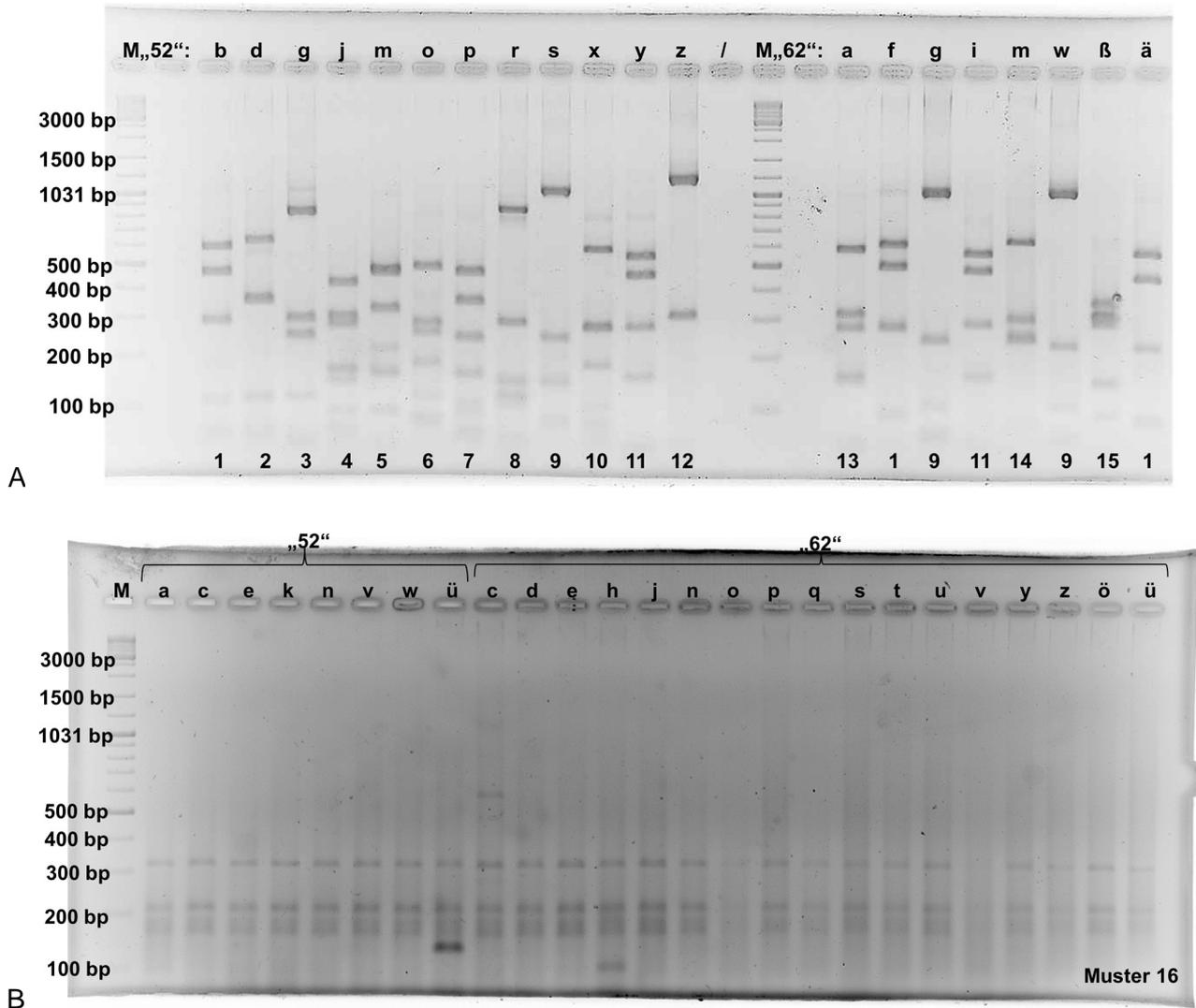


Abbildung 44: Restriktionsmuster bakterieller 16S rDNA-Klone aus einer Probe des Fermenters BEG (BioEnergie Glahn); je 10 μL in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; A = erste Amplifikate; B = zweite Amplifikate; Buchstaben = 10 μL Kolonie-PCR-Amplifikat (1533 bp) geschnitten mit 5 U HaeIII; Zahlen = Schnittmuster; M = 5 μL GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (0,5 μg μL^{-1} , Fermentas); Farben invertiert.

Die Restriktion der 20 Klone aus der ersten Kolonie-PCR ergab 15 verschiedene Schnittmuster (Abbildung 44 A). Dabei wurden 12 verschiedene Muster bei den Klonen, die mit 52,7 °C Anlagerungstemperatur amplifiziert worden waren und 6 verschiedene von 8 Mustern mit einer

Anlagerungstemperatur von 62,4 °C erzeugt. 5 Muster der Klone „62“ glichen 5 Mustern der Klone „52“. Muster 1 wiederholte sich insgesamt 3 Mal, wobei dieses 2 Mal bei den Klonen „62“ auftrat. Muster 9 trat ebenfalls insgesamt 3 Mal auf, wobei es sich 2 Mal allein bei den Klonen „62“ wiederholte. Muster 11 wurde 1 Mal bei den Klonen „52“ und 1 Mal bei den Klonen „62“ erzeugt. Die Klone der zweiten Kolonie-PCR, ergaben ein weiteres Muster (16, Abbildung 44 B), wobei in den Spuren „52“ü, „62“c und „62“h jeweils eine zusätzliche Bande in verschiedenen Höhen entstanden ist. Die Ergebnisse der RFLP bakterieller 16S rDNA-Fragmente aus dem Fermenter der Biogasanlage Biogasenergie Glahn (BEG, G) wurden in dieser Arbeit bei der molekularbiologischen Analyse durch Restriktion mit dem Enzym Hae III von 16S rDNA-Fragmenten anaerober Mikroorganismen aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1a und dessen Unterkulturen zum Vergleich der Muster zugezogen (Abbildung 53). Fragmente mit den Mustern 1-8, 10 und 13-15 wurden nicht sequenziert, da sich diese Arbeit auf die kultivierbaren propionsäureabbauenden Mischkulturen konzentrierte.

4.5.1.2 Identifizierung von Bakterien mit chromosomaler Gesamt-DNA aus den Fermentern weiterer NawaRo-Biogasanlagen und einem Nachgärer

Die bakterielle Gesamt-DNA der Fermenter der Biogasanlagen Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (TAF, F), Hubert Wagner und Sohn GbR (HWS, W) und Arenrath GmbH & Co KG (A) und des Nachgärers der Biogasanlage BioEnergie Glahn (BEG, GN) wurden ebenfalls molekularbiologisch analysiert (Tabelle 18). Die chromosomale Gesamt-DNA wurde auch hier zunächst mit den Oligonukleotiden BSF8 und BSR1541 (Tabelle 8) amplifiziert und daraufhin kloniert. Jeweils 25 bis 30 Klone wurden einer Kolonie-PCR ausgesetzt und das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym HaeIII verdaut. Die folgende Abbildung 45 zeigt die Restriktionsmuster der erfolgreichen Amplifizierungen beziehungsweise der in ausreichender Menge vorhandenen Produkte aus der Kolonie-PCR der Fermenter Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (F), Hubert Wagner & Sohn GbR (W), Arenrath GmbH & Co KG (A) und dem Nachgärer der Biogasanlage BioEnergie Glahn (GN).

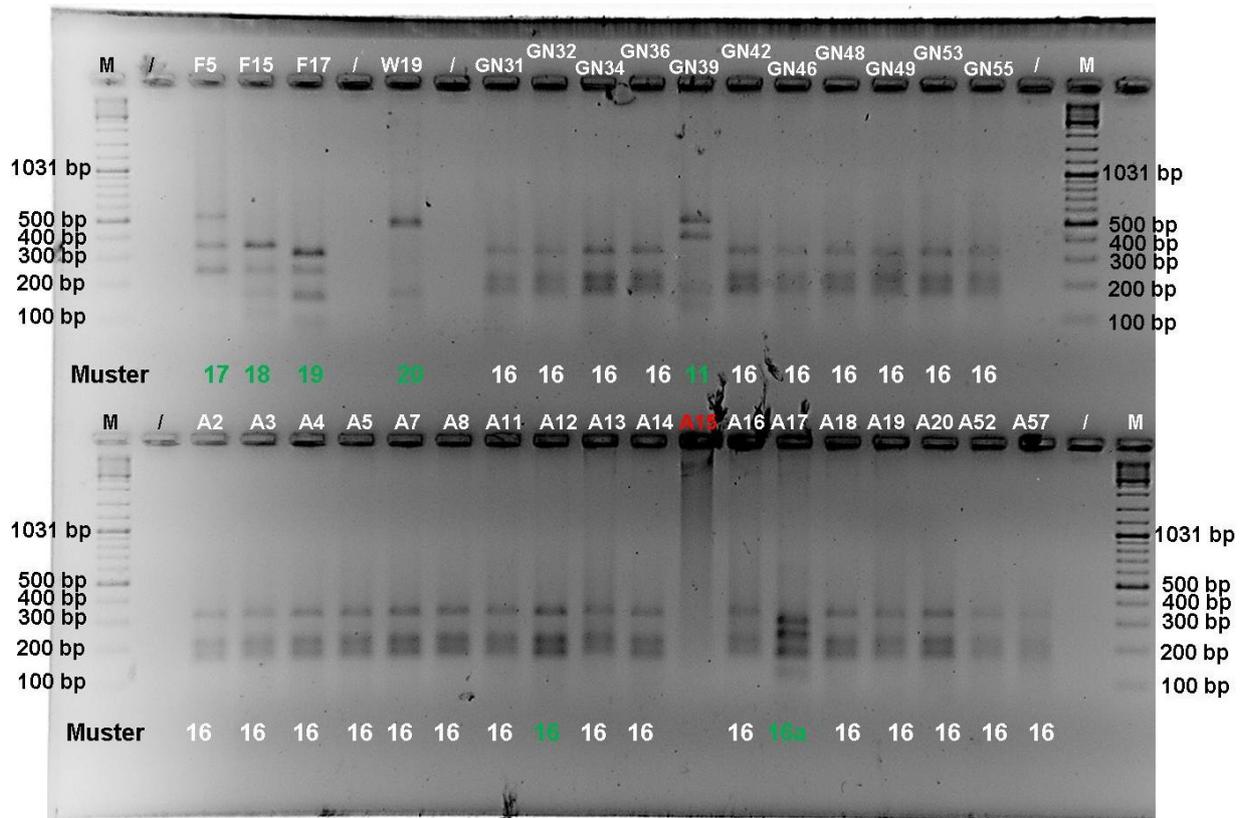


Abbildung 45: Restriktionsmuster bakterieller 16S rDNA-Klone aus den Fermentern F (Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR), W (Hubert Wagner und Sohn GbR), A (Arenrath GmbH & Co KG) und dem Nachgärer GN (BioEnergie Glahn); je 10 µL in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Kolonie-Amplifizierungs-Produkt (1533 bp) = 10 µL geschnitten mit 5 U HaeIII; Buchstaben = Schnittmuster; grüne Spurenbezeichnung über Gelbeladungstasche = zur Sequenzierung verwendetes Reamplifikat; rot = Reamplifizierung nicht möglich; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

Aus den Fermentern F wurden drei verschiedene Muster festgestellt und aus W wurde eine Restriktion durchgeführt, welche eine weitere Restriktionsmustervariante ergab. Beim Vergleich der Abbildung 45 mit der Abbildung 44 B fällt auf, dass das Muster 16 in den Restriktionen der Klon-Amplifikate des Nachgärers GN sowie Fermenter A wiederholt auftauchen. Reamplifikate der in Abbildung 45 grünen Musterzahlen wurden zur Sequenzierung versendet. Die digital erhaltenen Sequenzen wurden mit Datenbanken verglichen, um den Mikroorganismus zu identifizieren. In Tabelle 32 ist eine erste Übersicht der Sequenzierungsergebnisse der bakteriellen Gesamt-DNA aus den Fermentern F, W, A und des Nachgärers GN dargestellt.

Die für den Sequenzvergleich verwendeten Sequenzen sind auf der ‚RohdatenCD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Fermenter/Molbiol_Analysen_Fermenter_Bac‘ einsehbar.

Tabelle 32: Systematische Zuordnung bakterieller partieller 16S rDNA-Sequenzen aus Fermentern F, W und A sowie Nachgärer GN

BGA	Muster [Häufigkeit]	Beschreibung des Mikroorganismus mit größter Übereinstimmung aus digitaler Datenbank	Sequenzlänge [bp]	%
F ³	17 [1/3]	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	858 ¹ (773/34/871) ²	89
	18 [1/3]	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	780 ¹ (663/26/761) ²	87
	19 [1/3]	<i>Firmicutes</i>	867 ¹ (n. a.) ²	89
W ⁴	20 [1/1]	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	885 ¹ (768/35/883) ²	87
GN ⁵	11 [1/11]	<i>Clostridia</i>	381 ¹ (n. a.) ²	85
	16 [10/11]	Musterzuordnung zu Muster 16 aus BGA A: <i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	Muster 16 aus BGA A: 528 ¹ (528/0/529) ²	99
A ⁶	16 [16/17]	<i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	528 ¹ (528/0/529) ²	99
	16a [1/17]	<i>Firmicutes</i>	429 ¹ (n. a.) ²	84

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; ³ Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR, ⁴ Hubert Wagner & Sohn GbR, ⁵ Arenrath GmbH & Co KG; ⁶ Nachgärer der Biogasanlage BioEnergie Glahn; n. a.: nicht auswertbar

Tabelle 32 zeigt eine Übersicht über die ausgewerteten Sequenzen aus NawaRo-Biogasanlagen. Mithilfe der digitalen Datenbank der NCBI wurden die erhaltenen Sequenzen identifiziert. Die Sequenz mit dem in Nachgärer GN, sowie Fermenter A häufig auftretenden Muster 16 wurden dem Organismus *Escherichia coli* zugeordnet. Die Sequenzen mit den Mustern 17 und 18 aus Fermenter F und auch die Sequenz mit Muster 20 aus Fermenter W wiesen Übereinstimmungen bis zur Gattung *Clostridium* vor. Die Sequenz aus dem Nachgärer GN mit aus der RFLP des Fermenters G bekanntem Muster 11 (Abbildung 44 A und Abbildung 45) wurde der Klasse *Clostridia* zugeordnet. Die Sequenzen mit Muster 19 aus Fermenter F und Muster 16a aus Fermenter A wurden beim Phylum *Firmicutes* eingeordnet. Mit diesen Ergebnissen, war es möglich, einige in den Fermentern vorhandene Bakterien zu identifizieren. Die Restriktionsmuster wurden für den Vergleich mit Mustern aus propionsäureabbauenden Mischkulturen und deren Unterkulturen verwendet.

4.5.2 Identifizierung kultivierbarer Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Misch- und Unterkulturen

Syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen (Tabelle 14) aus den NawaRo-BGA's Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR, Hubert Wagner und Sohn GbR, BioEnergie Glahn und Arenrath GmbH & Co KG (Analgenparameter siehe Tabelle 18) wurde zur Identifizierung nach den in Kapiteln 3.5.1, 3.5.2, 3.5.5, 3.5.6 sowie 3.5.7 bis 3.5.9 beschriebenen molekularbiologischen Methoden verfahren. Die Kulturen wurden nach jeweils 6 wöchiger Inkubation dafür verwendet, da in den Mischkulturen der Abbau des Propionsäuregehalts chemisch analytisch messbar war (Kapitel 4.7.1). Basierend auf den Sequenzierungsergebnissen der propionsäureabbauenden Mischkulturen Fp1a (Tabelle 34) und Gp1a (Tabelle 41) wurden die propionsäureabbauenden Mischkulturen Ap1a, Fp1a Gp1a, Gp1b, Wp1a, und Wp2a (Tabelle 14) zusätzlich in Kulturmedien mit anderen Substraten 1:10 (v/v) verdünnt überimpft, um eine Selektion einzelner Bakterienarten zu erreichen. Es wurden die DSMZ-Medien 1264 für den Genus *Spirochaeta*, 520 für den Genus *Clostridium* und 63 modifiziert für den Genus *Desulfovibrio* verwendet (Kapitel 2.6). 1533 bp der Gesamt-16S rDNA aus den Unterkulturen Ap1a1264, Fp1a1264, Gp1b1264 und Wp2a1264 in DSMZ Medium 1264 (Tabelle 14, DSMZ 2012) wurden molekularbiologisch analysiert. Die Methode wurde durchgeführt, wie bereits bei der Analyse der Gesamt-DNA aus Fermentern (Kapitel 3.5.1) beschrieben worden ist. Es wurden zwei Klonierungsdurchgänge durchgeführt, da die extern durchgeführte Sequenzierungsreaktion des ersten Durchgangs auf Grund von Signalüberlappungen respektive fehlenden Signalen nicht zu den erwünschten Sequenzen führten. Die in dieser Arbeit durch die extern durchgeführten Sequenzierungsreaktionen erhaltenen eindeutigen Restriktionsmuster des ersten Klonierungsdurchganges wurden bei der Auswertung des zweiten Klonierungsdurchganges zum Vergleich der Muster berücksichtigt. Propionsäureoxidierende Mischkulturen überimpft in DSM-Medium 520 für den Genus *Clostridium* wurden ebenfalls molekularbiologisch analysiert. Hierfür wurde Gesamt-DNA aus den Kulturen Fp1a520 und Ap1a520 mit dem synthetischen Oligonukleotidpaar 519fGC/1070r (Tabelle 8) amplifiziert und daraufhin eine Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE, Kapitel 3.5.6) durchgeführt. Die aufgetrennten Banden wurden manuell ausgeschnitten und die DNA-Fragmente eluiert. Mit dem Oligonukleotidpaar 519f/1070r (Tabelle 8) erhaltene Reamplifikate dieser Fragmente wurden zum Sequenzieren versendet. Aus den propionsäureabbauenden Mischkulturen Fp1a, Wp1a und Gp1a wurden Unterkulturen in modifiziertem DSMZ-Medium 63 mit den Bezeichnungen Fp1a63-L, Wp1a63-L und Gp1a63-L kultiviert. Isolierte Gesamt-DNA aus den Unterkulturen Fp1a63-L und Gp1a63-L wurde wie oben beschrieben molekularbiologisch analysiert. Von jeweils 20 Klon-Reamplifikaten der Unterkulturen in modifiziertem DSMZ-Medium 63 wurden drei aus jeder Kultur mit den höchsten DNA-Fragment-Gehalten zur Sequenzierung versendet und eine Sequenz aus der Kulturen Fp1a63-L und Gp1a63-L erhalten.

Eine molekularbiologische Analyse der Kulturen Fp1b, Wp2a, Gp1b, Ap1a, Ap1b, Ap3a und Ap3b wurde nicht durchgeführt, da aufgrund einer zu hohen Partikelanzahl im Medium keine DNA-Isolierung aus den Kulturen in PI-Medium möglich war.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der Identifizierungen der Mischkultur Fp1a und dessen Unterkulturen Fp1a1264 (F), Fp1a520 (F520) und Fp1a63-L, der Mischkultur Wp1, der Unterkultur Wp2a1264 (W), der Mischkultur Gp1a, dessen Unterkulturen Gp1b1264 (G), Gp1a63-L, sowie Unterkulturen Ap1a1264 (A) und Ap1a520 (A520) in angegebener Reihenfolge dargestellt und erläutert.

4.5.2.1 Identifizierung von Bakterien aus den Mischkulturen Fp1, Fp1a sowie Unterkulturen Fp1a1264, Fp1a520 und Fp1a63-L

Mit der mehrfach überimpften Mischkultur Fp1 aus der NawaRo-BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (Analgenparameter siehe Tabelle 18) wurde nach der Isolierung der chromosomalen Gesamt-DNA (Kapitel 3.5.1) eine Identifizierung der partiellen bakteriellen 16S rDNA über eine Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese durchgeführt (DGGE, Kapitel 2.5.3 und 3.5.6).



Abbildung 46: DGGE des Amplifikats aus Kultur Fp1 (Tabelle 14); Denaturierender Gradient: 70/30; angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; grüne Zahlen = zur Sequenzierung versendete Reamplifikate; schwarze Zahlen = zu wenig Reamplifikat für eine Sequenzierung; Farben invertiert.

Die Spur eines DGGE-Gels in Abbildung 46 zeigt sechs unterschiedlich weit gelaufenen DNA-Banden verschieden codierter DNA aus der Kultur Fp1. Zur Sequenzierung wurden zwei Eluate reamplifiziert DNA-Fragmente und versendet (Abbildung 46, grüne Zahlen). Die weiteren eluierten Fragmente (Abbildung 46, schwarze Zahlen) erbrachten zu wenig Amplifikat aufgrund zu geringer Menge Ausgangs-DNA.

Tabelle 33: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Fp1 (Tabelle 14)

Kultur	Bande	Mikroorganismus	Sequenzlänge [bp]	%
Fp1	Fp5	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> ^T DSM12254	382 ¹ 378/1/382 ²	99
	Fp6	<i>Spirochaeta</i> sp.	443 ¹ 433/0/437 ²	99

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Eine Art der Gattung *Spirochaeta* wurde mit der DGGE zu 99 % identifiziert (Tabelle 33). Bei den beiden zur Sequenzierung versendeten 16S rDNA-Fragmente (500 bp) aus der DGGE von Kultur Fp1 trat neben der Sequenz eines *Spirochaeta* sp. die Sequenz mit 99 %iger Übereinstimmung mit dem Mikroorganismus *Desulfovibrio aminophilus*^T DSM12254 auf.

Die nach der Inkubation mit Fumarat (Abbildung 83) erhaltene syntroph propionsäureabbauende Kultur Fp1a (Abbildung 94) wurde ebenfalls molekularbiologisch analysiert. Die isolierte Gesamt-DNA aus Kultur Fp1a wurde die gesamte 16S rDNA mit dem Oligonukleotidpaar Eubac5/Eubac3 (Tabelle 8) amplifiziert und kloniert. Von 25 Klonen wurden 24 Klon-Fragmente der gesamten bakteriellen 16S rDNA aus Kultur Fp1a wurden für eine RFLP (Kapitel 3.5.8) mit den Restriktionsenzymen HaeII und HaeIII (Kapitel 2.3.2) verwendet.

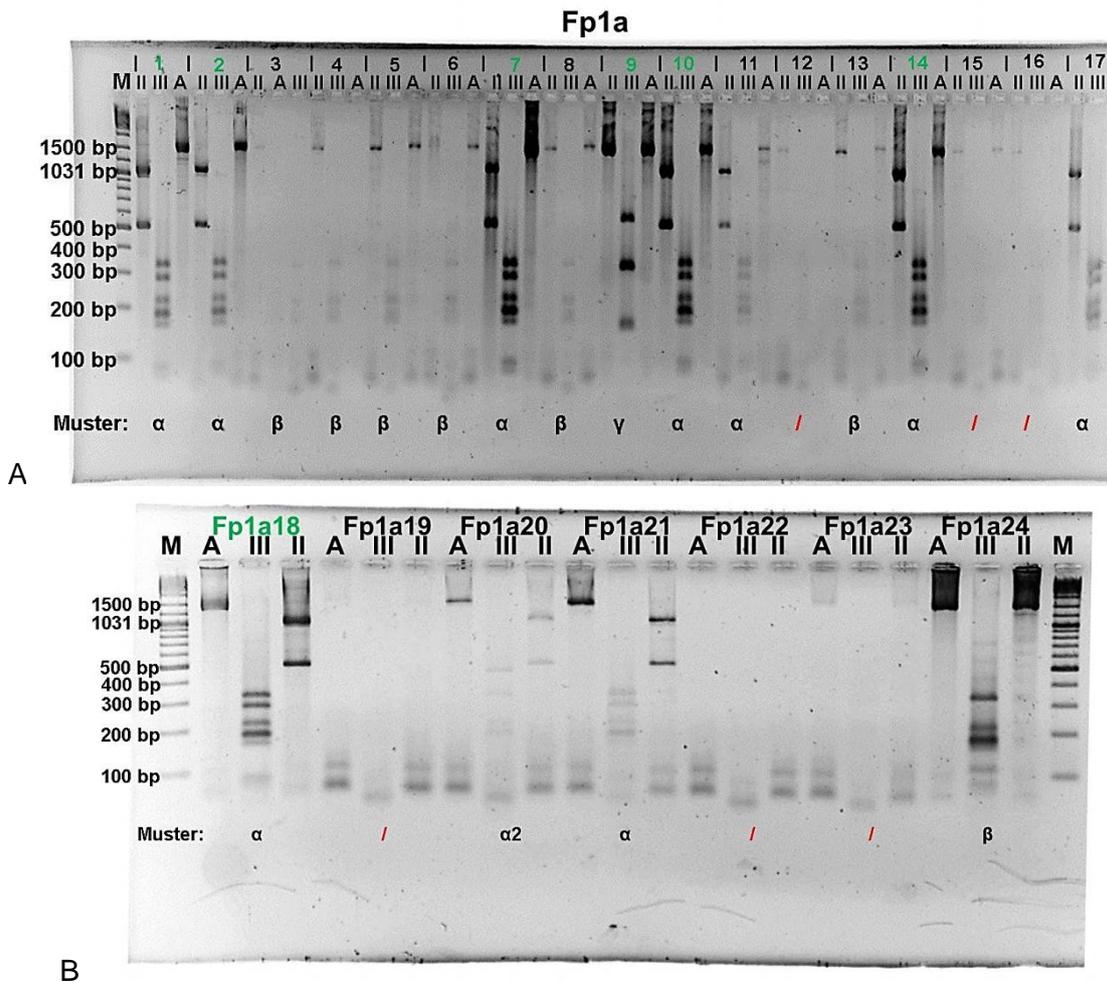


Abbildung 47: RFLP von 24 16S rDNA-Klon-Fragmenten aus Kultur Fp1a (Tabelle 14); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III); A Klone 1-17, grüne Klonbezeichnung = zur Sequenzierung verwendetes Reamplifikat; B Klone 18-24 in einem 2,5%igen Agarosegel mit 0,1% einer 0,035%igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7%igen Ethidiumbromidlösung; griechische Buchstaben = Schnittmuster; grüne Zahlen über Spuren = Versand des Fragments zur Sequenzierung; schwarze Beschriftung über Spuren = nicht genügend Reamplifikat für Sequenzierung; rote Diagonalbalken = zu geringe Amplifikatkonzentration für RFLP; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

In den Spuren einiger Restriktionen - zum Beispiel bei Klon Fp1a24 in Abbildung 47 dunkel dargestellte Schatten - wurden über den diskreten Banden angefärbt. Dies deutet auf eine Überladung des Agarosegels mit DNA hin, die sich aufgrund der Menge nicht in einer Bande konzentrieren lies. Muster α (Abbildung 47) ergaben 9 Restriktionen von 24 Klon-Fragmenten bakterieller 16S rDNA aus der Mischkultur Fp1a. Ein dem Schnittmuster α durch HaeIII ähnliches Muster β mit einer Bande weniger als bei Muster α entstand bei 7 von 24 Klonen, mit dem zusätzlichen Unterschied, dass HaeII kein- oder einmalig geschnitten hat. Muster γ entstand bei der Restriktion des Klons Fp1a9. Ebenfalls Einmal trat Muster α2 auf, was in der mit HaeIII

geschnittenen DNA-Spur des Klon Fp1a20 eine hohe Ähnlichkeit mit Muster α aufwies und ebenfalls zwei Mal vom Restriktionsenzym HaeII geschnitten wurde. von 24 Amplifikaten wiesen 6 eine zu geringe DNA-Konzentration auf, dass sie unter die Visualisierungsgrenze der Färbung von DNA mit Ethidiumbromid fielen. Die 16S rDNA-Fragmente der Klone Fp1a1, Fp1a2, Fp1a7, Fp1a9, Fp1a10, Fp1a14 und Fp1a18 wurden nach Aufreinigung der Reamplifikate zur Sequenzierung versendet. Mit den restlichen Klon-Fragmenten war eine Reamplifizierung auch mit variierender Konzentration der DNA-Vorlage nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Tabellarisch sind die Identifizierungsergebnisse der erhaltenen Sequenzen aus der propionsäureabbauenden Kultur Fp1a nach Klonen geordnet aufgeführt.

Tabelle 34: Molekularbiologische Analyse der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Mischkultur Fp1a (Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Mikroorganismus	Sequenzlänge [bp]	%
Fp1a1	α (9/24)	<i>Spirochaeta caldaria</i> ^T DSM7334	572 ¹ (503/16/572) ²	88
Fp1a2	α (9/24)	<i>Spirochaeta caldaria</i> ^T DSM7334	930 ¹ (816/31//921) ²	89
Fp1a7	α (9/24)	<i>Spirochaeta caldaria</i> ^T DSM7334	809 ¹ (692/26/796) ²	87
Fp1a9	γ (1/24)	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> ^T DSM17427 <i>Clostridium clariflavum</i> ^T DSM19732	718 ¹ (646/19/713) ² (646/26/711) ²	91
Fp1a10	α (9/24)	<i>Spirochaeta caldaria</i> ^T DSM7334	555 ¹ (476/17/540) ²	88
Fp1a14	α (9/24)	<i>Spirochaeta caldaria</i> ^T DSM7334	660 ¹ (577/23/664) ²	87
Fp1a18	α (9/24)	unzureichende Signalstärke bei der Sequenzierung	n.a.	n.a.

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Die Klonsequenzen mit Muster α haben die höchste Übereinstimmung mit dem Typstamm *Spirochaeta caldaria*^T DSM7334 mit nah beieinanderliegender Wertigkeiten von 87 bis 89 %. Ein multipler Sequenzvergleich mit Erstellung einer Konsensussequenz (662 bp, Clustal 2.1, EBI, siehe Abbildung 128) und einen erneuten Abgleich mit der NCBI-Datenbank wurde durchgeführt. Zu 87 % (Übereinstimmung: 581 bp, Lücken: 25 bp, verglichene Sequenzlänge: 666 bp) stimmte die Konsensussequenz ebenfalls mit *Spirochaeta caldaria*^T DSM7334 überein. Die Sequenzen mit Muster α wurden dem Genus *Spirochaeta* zugeordnet. Dieses Sequenzierungsergebnis bedeutet,

dass die Kultur Fp1a nach der Inkubation mit Fumarat Spirochäten enthält, wie Kultur Fp1 (Tabelle 33). Die Signalstärke der farbmarkierten 16S rDNA-Fragmente des Klon Fp1a18 war zur Bestimmung der Abfolge der DNA-Basen zu gering. Klon Fp1a9 mit dem Restriktionsmuster γ hatte die höchste Übereinstimmung mit dem Typstamm *Gracilibacter thermotolerans*^T DSM17727, dicht gefolgt von dem der gleichen Ordnung zugehörigen *Clostridium clariflavum*^T DSM19732, was in beiden Fällen auf eine Übereinstimmung von jeweils 91 % hinauslief. Daher wurde diese Klonsequenz zur Ordnung Clostridiales zugeordnet.

Aufgrund der Häufigkeit des Spirochäten-Musters α (Abbildung 47) und der enthaltenen Clostridiales-Sequenz (Klon Fp1a9, Tabelle 34) wurde Spirochäten-Medium 1264 und Clostridien-Medium 520 (Kapitel 2.6) der DSMZ 1:10 mit der syntroph Propionsäureoxidierende Kultur Fp1a beimpft. Außerdem wurde Kultur Fp1a in modifiziertem DSMZ-Medium 63 ohne Lactat (Kapitel 2.6) überimpft, um nachzuprüfen, ob sulfatreduzierende Mikroorganismen in Kultur Fp1a enthalten sind, die mit molekularbiologischen Identifizierungsmethoden bisher nicht erfasst worden waren. Folgend sind die Identifizierungsergebnisse der Unterkulturen Fp1a1264, Fp1a520 und Fp1a63-L aufgeführt.

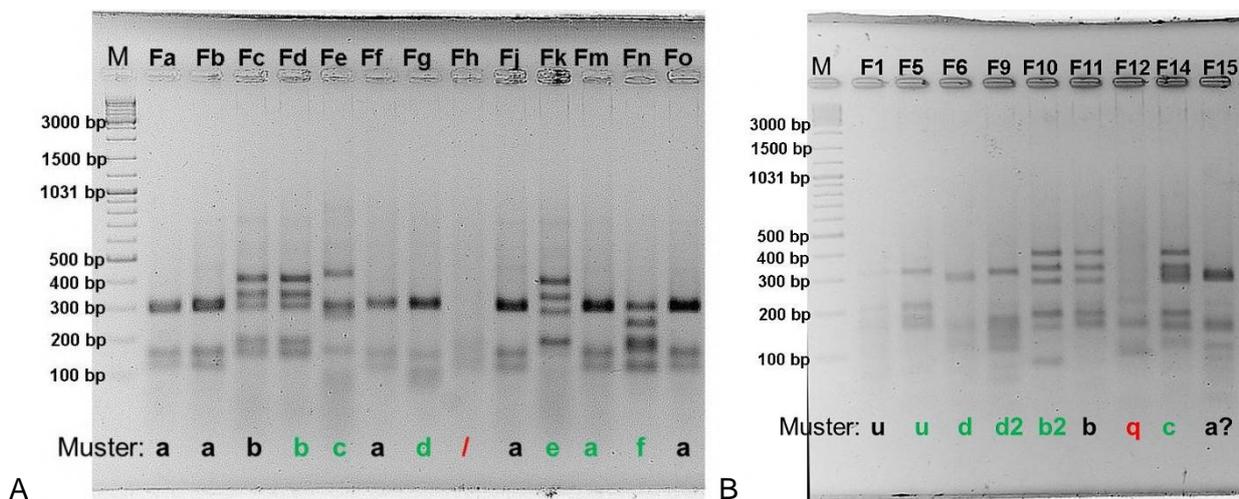


Abbildung 48: RFLP der Klon-Amplifikate aus Unterkultur Fp1a1264 (F, Tabelle 14); A erster Klonierungsdurchgang, B zweiter Klonierungsdurchgang; in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; jeweils 8 μ L Klon-Amplifikat (1533 bp) geschnitten mit 5 U HaeIII; Buchstaben: Restriktionsmuster; grün: zur Sequenzierung versendetes Reamplifikat; rot: Reamplifizierung nicht erfolgreich; M = 2,5 μ g GeneRulerTM DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

Beim ersten Klonierungsdurchgang der Kultur Fp1a1264 enthielten 13 von 15 Klonen genügend Amplifikat, um eine Restriktion durchführen zu können (Abbildung 48 A). Im zweiten Durchgang wurden ebenfalls 15 Klone einer Kolonie-PCR unterzogen. Danach wurden 9 Amplifikate restringiert (Abbildung 48 B). Eine Übersicht über die molekularbiologische Analyse der Unterkultur Fp1a1264 ist im Folgenden alphabetisch nach Mustern geordnet aufgeführt. Die auswertbaren Sequenzen der

Klon-Fragmente befinden sich digital auf der Rohdaten CD unter ‚/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Ukulturen/Molbiol_Analysen_Ukulturen1264‘.

Tabelle 35: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Fm	a (6/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
F15	a? (1/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
Fd	b (3/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
F10	b2 (1/22)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	533 ¹ (495/11/531) ²	93
F14	c (2/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
F6	d (2/22)	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM12261	386 ¹ (366/2/381) ²	96
F9	d2 (1/22)	<i>Sphaerochaeta globus</i> Stamm Buddy	799 ¹ (787/2/798) ²	99
Fk	e (1/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
Fn	f (1/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
F12	q (1/22)	Reamplifizierung nicht möglich	n. a.	n. a.
F5	u (2/22)	<i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	500 ¹ (499/0/500) ²	99
Fh	- (1/22)	Reamplifizierung nicht möglich	n. a.	n. a.

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Die Sequenzierung des Musters ‚b2‘ aus der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 35) ergab nach dem Vergleich mit der NCBI-Datenbank eine Übereinstimmung zu gleichen Verhältnissen mit der 16S rDNA-Sequenz des Mikroorganismus *Proteiniphilum acetatigenes*^T DSM18083 und mit der Sequenz eines Mikroorganismus *Ruminobacillus xylanolyticum*. Bei *Ruminobacillus xylanolyticum* handelt es sich um einen unveröffentlichten Stamm aus dem Pansen, von dem nur eine partielle Sequenz aus der 16S rDNA in der offenen Datenbank bekannt ist. Er wurde daher bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt und diese Sequenz dem Genus *Proteiniphilum* zugeordnet. Die Sequenz mit Muster ‚d‘ wurde der Gattung *Aminobacterium* zugeordnet. Muster d2 gehört nach den Informationen der NCBI-Datenbank zu einer Art des Genus *Sphaerochaeta*. Neben diesem Mikroorganismus wurden in der Kultur Fp1a1264 keine *Spirochaeta* identifiziert. Mit der Sequenz des Klons F5 wurde ein weiteres Muster sequenziert, welches mithilfe der digitalen Datenbank der NCBI zu 99 % *Escherichia coli* K-12 zugeordnet wurde. Ein visueller Vergleich des

Restriktionsmusters ‚u‘ des Klons F5 (Abbildung 48) mit dem Muster 16 aus Fermenter der BGA Arenrath GmbH & Co KG (Abbildung 45) zeigte, dass die Restriktionsmuster die gleiche Bandenverteilung vorwiesen. Restriktionen des bakteriellen 16S rDNA-Fragments mit diesem Muster wurden dem Bakterium *Escherichia coli* K-12 zugeordnet und Muster ‚u‘ genannt.

Aus den obigen Sequenzierungsergebnissen der Kultur Fp1a1264 und mit Berücksichtigung der nachstehend identifizierten Sequenzen aus den anderen Unterkulturen in DSMZ-Medium 1264 ergab sich folgende bakterielle Diversität nach alphabetischer Reihenfolge der Restriktionsmuster geordnet für Kultur Fp1a1264.

Tabelle 36: Bakterielle Diversität der Kultur Fp1a1264(Tabelle 14)

Kultur	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Fp1a1264	a (6/22)	Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-Klons G13: <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	G13: 862 ¹ (836/9/864) ²	97
	a? (1/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
	b (3/22)	Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-Klons A10: <i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	A10: 785 ¹ (734/15/786) ²	93
	b2 (1/22)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	533 (495/11/531) ²	93
	c (2/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
	d (2/22)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	386 (366/2/381) ²	96
	d2 (1/22)	<i>Sphaerochaeta globus</i> Stamm Buddy	799 ¹ (787/2/798) ²	99
	e (1/22)	Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-DNA-Klons W12: <i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	W12: 546 (533/0/535) ²	99
	f (1/22)	Sequenzierung ohne Ergebnis	n. a.	n. a.
	q (1/22)	Reamplifizierung nicht möglich	n. a.	n. a.
	u (2/22)	<i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	500 ¹ (499/0/500) ²	99
	/ (1/22)	n. a.	n. a.	n. a.

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Mit mehrfacher Überimpfung in flüssigem DSMZ-Medium 520 wurde *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 aus der Mischkultur Fp1a isoliert. Die Identifizierung des Mikroorganismus wurde mithilfe der DGGE (Kapitel 2.5.3 und 3.5.6) durchgeführt.



Abbildung 49: DGGE-Gel der partiellen bakteriellen 16S rDNA (500 bp) aus Kultur Fp1a520 (F520, Tabelle 14); Denaturierender Gradient: 70/30; angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; grüne Zahl = zur Sequenzierung versendetes Reamplifikat; schwarze Zahl = zu wenig Reamplifikat für eine Sequenzierung; Farben invertiert.

Die in Abbildung 49 gezeigte DGGE-Spur der Unterkultur Fp1a520 wies zwei Banden auf, die ausgeschnitten und eluiert wurden. Zur Sequenzierung wurde das Reamplifikat der ersten Bande versendet. Die zweite Bande erbrachte zu wenig Reamplifikat für eine Sequenzierungsreaktion, was darauf hindeutete, dass diese Bande aus degradierten DNA-Fragmenten der Fragmente bestand, die oben als Bande 2 separiert worden waren.

Tabelle 37: Molekularbiologisch analysierte Sequenz der 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Fp1a520

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Fp1a520	1	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	478 ¹ (463/2/474) ²	98
	2	zu wenig Reamplifikat	n. a.	n. a.

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Aus Unterkultur Fp1a520 wurde mithilfe der DGGE-Methode der Mikroorganismus *Proteiniphilum acetatigenes*^T eindeutig identifiziert (Tabelle 37), was die bereits erfolgte Zuordnung des Restriktionsmusters ‚b2‘ (Abbildung 48 B) des Klon F10 (Tabelle 35) aus der Unterkultur Fp1a1264 zum Genus *Proteiniphilum* bestätigte. Aus der propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1a wurde über den Wechsel des Substratangebots und Verdünnungsreihen in Medium 520 *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 isoliert. Die partielle 16S rDNA Sequenz ist mit der *accession number* JQ955659 in der NCBI-Datenbank hinterlegt.

Eine 521 bp lange Sequenz (siehe ‚RohdatenCD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Ukulturen‘) des Klon-Fragments Fp1a63-L11 stimmte zu 94 % mit der Sequenz des Sulfat reduzierenden Mikroorganismus *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 überein (Übereinstimmung von 492 bp mit 4 Lücken bei einer verglichenen Sequenzlänge von 523 bp). Diese Identifizierung bestätigte beispielsweise das Ergebnis der Sequenzierung des Klon G10 mit Muster ‚β‘ der Unterkultur Gp1b1264 (Abbildung 53 B, Tabelle 42), dass Bakterien des Genus *Geovibrio* in propionsäureabbauenden Mischkulturen enthalten sind. Eine fortführende Kultivierung in Medium 63-L kann den Mikroorganismus von bakteriellen Kontaminanten isolieren.

Eine Übersicht der aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1a identifizierten Bakterien bietet die phylogenetische Aufarbeitung der Sequenzierungsergebnisse (Abbildung 72).

4.5.2.2 Identifizierung von Bakterien aus der Mischkultur Wp1

Mit der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp1 aus der NawaRo-BGA Hubert Wagner und Sohn GbR (Tabelle 18) wurde eine DGGE (Kapitel 2.5.3 und 3.5.6) durchgeführt.



Abbildung 50: DGGE des Amplifikats der Kultur Wp1 (Tabelle 14); Denaturierender Gradient: 70/30; angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; grüne Zahlen = zur Sequenzierung versendete Reamplifikate; schwarze Zahlen = zu wenig Reamplifikat für eine Sequenzierung; rote Zahl = keine Reamplifizierung möglich; Farben invertiert.

Zwei Teilsequenzen wurden aus Kultur Wp1 zum Sequenzieren versendet (grüne Zahlen, Abbildung 50). Auch hier gelten die bei der DGGE der Kultur Fp1 erläuterten Bemerkungen zu der unterschiedlichen Ausprägung der Banden.

Tabelle 38: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Wp1 (Tabelle 14)

Kultur	Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Wp1	Wp1.1	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	454 ¹ 446/0/446 ²	100
	Wp1.2	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> ^T DSM21804	452 ¹ 447/0/449 ²	99

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Die DGGE der Kultur Wp1 trennte ein DNA-Fragment auf (Bande 1, Abbildung 50), welches zu 100 % als *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 identifiziert wurde. Das zweite sequenzierte Fragment hatte zu 99 % eine eindeutige Übereinstimmung mit *Tepidanaerobacter acetatoxydans*^T DSM21804.

Die Mischkultur Wp1 wurde nicht weiterführend analysiert, da sie auch mit Zugabe von Fumarat keinen Abbau der Propionsäure zeigte (Tabelle 53).

4.5.2.3 Identifizierung von Bakterien aus der Unterkultur Wp2a1264

Eine weitere syntroph Propionsäureoxidierende Mischkultur (Wp2) aus der NawaRo-BGA Hubert Wagner und Sohn GbR (Tabelle 18) wurde mit Fumarat inkubiert (Abbildung 86) und die weiterhin Propionsäure abbauende Mischkultur Wp2a (Abbildung 96 A) in die Medien 1264, 520 und 63-L (Kapitel 2.6) überimpft. Die Unterkulturen wurden molekularbiologisch analysiert. Zunächst sind die Restriktionsmuster der 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Wp2a1264 abgebildet und erläutert.

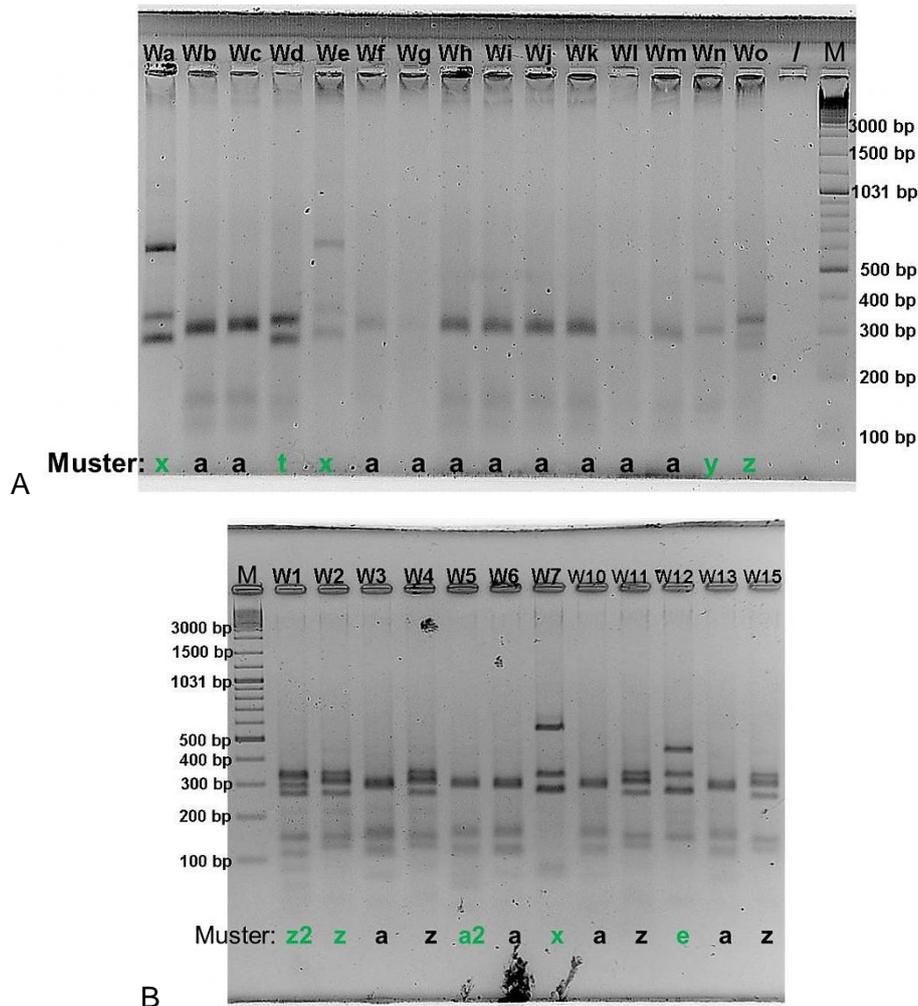


Abbildung 51: RFLP der Klon-Amplifikate aus Unterkultur Wp2a1264 (W, Tabelle 14); A erster Klonierungsdurchgang, B zweiter Klonierungsdurchgang; in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; jeweils 8 µL Klon-Amplifikat (1533 bp) geschnitten mit 5 U HaeIII; Buchstaben: Restriktionsmuster; grün: zur Sequenzierung versendetes Reamplifikat; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 ; Farben invertiert.

Von insgesamt 30 Klonen wurden 15 im ersten Klonierungsdurchgang restringiert und im zweiten Durchgang wurden 12 Klon-Fragmente verdaut. Die aufgetrennten Restriktionsfragmente sind in

Abbildung 51 visualisiert. Die Restriktion der Unterkultur Wp2a1264 zeigte ein sich häufig wiederholendes Muster ‚a‘, welches sich im ersten Klonierungsdurchgang (Abbildung 51A) 10fach wiederholte und im zweiten Klonierungsdurchgang 4 Mal von 12 Klonen bakterieller 16S rDNA-Fragmente durch Restriktion entstand. Muster ‚x‘ zeigte sich ebenfalls in beiden Klonierungen, sowie Muster ‚z‘. Muster ‚t‘ und ‚y‘ erschienen nur im ersten Klonierungsdurchgang. Nach Durchführung der zweiten Klonierung traten Muster ‚a2‘, ‚e‘ und ‚z2‘ auf. Im Folgenden sind die Zuordnungen der erhaltenen Sequenzen zu Mikroorganismen alphabetisch nach Mustern geordnet aufgeführt. Die dafür verwendeten Sequenzen sind auf der ‚RohdatenCD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Ukulturen/Molbiol_Analysen_Ukulturen1264‘ hinterlegt.

Tabelle 39: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Wp2a1264 (Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
W5	a2 (1/27)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	789 ¹ (787/1/789) ²	99
W12	e (1/27)	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	546 ¹ (533/0/535) ²	99
Wd	t (1/27)	n. a.	n. a.	n. a.
W7	x (3/27)	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	668 ¹ (663/1/665) ²	99
Wn	y (1/27)	n. a.	n. a.	n. a.
W2	z (5/27)	<i>Thermotogaceae</i> bacterium SulfLac1	802 ¹ (791/0/794) ²	99
		<i>Petrotoga mobilis</i> ^T SJ95	(723/23/796) ²	91
W1	z2 (1/27)	a <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	204 ¹ (202/0/204) ²	99
		b <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	724 ¹ (657/18/721) ²	91

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Tabelle 39 zeigt, dass die Sequenz des Klons W5 mit Muster ‚a2‘ dem Mikroorganismus *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 zu 99 % zugeordnet wurde. Die Sequenz des Klons W1 mit Muster ‚z2‘ wurde mit Sequenz der Länge 204 bp (W1a) zu 99 % *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261, jedoch mit der längeren Sequenz von 724 bp nur zu 91 % *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 zugeordnet, da die Signale mit Zunahme der Sequenzlänge überlagerten. Eine paarweise Sequenzalignierung mit der Online-Software Clustal 2.1 (EBI) der Sequenzen (W1a, W1b, Abbildung 131) mit Muster ‚z2‘ (Klon W1) bestätigte mit 99%iger Übereinstimmung

(203 bp von 204 bp vergleichbaren Basenpaaren) des ersten Teils der längeren Sequenz, dass diese Sequenz *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 zugehört. Der paarweise Vergleich der Sequenzen der Klone W5 und W1b (613 bp von 679 bp vergleichbaren Basenpaaren mit 19 Lücken, Abbildung 133) untermauerte das Ergebnis der vorangegangenen paarweisen Alignierung des Klons W1a mit Klon W1b. Die Sequenzen der Muster ‚e‘, sowie ‚x‘ wurden *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 zugeordnet, obwohl sich die Muster der beiden Fragmente unterschieden (Abbildung 51B). Der Paarweise Sequenzvergleich der W12 und W7 (Abbildung 134) zeigte, dass die Sequenzen zu 99 % (460 bp von 452 bp vergleichbaren Basenpaaren ohne Lücke) übereinstimmten und bestätigten somit das Sequenzierungsergebnis der partiellen 16S rDNA aus Kultur Wp1 (Tabelle 38), das in der NawaRo-BGA HWS *Wolinella succinogenes* enthalten ist. Die Sequenz mit Restriktionsmuster ‚z‘ (Klon W2) wurde einem Mikroorganismus der Familie *Thermotogaceae* beziehungsweise der Gattung *Petrotoga* zugeordnet. Die Sequenzierungen der Klone Wd mit Muster ‚t‘ und Wn mit Muster ‚y‘ aus dem ersten Klonierungsdurchgang schlugen aufgrund zu geringer Signalstärke bei der Sequenzierung fehl. Daher war keine Zuordnung dieser Restriktionsmuster zu Mikroorganismen möglich.

Mit der Musterzuordnung des Restriktionsmusters ‚a‘ zu nachstehend identifizierter Sequenz des Klons G13 (Tabelle 42) mit gleichem Muster wurde Tabelle 39 wie folgt vervollständigt.

Tabelle 40: Bakterielle Diversität der Kultur Wp2a1264 (Tabelle 14)

Kultur	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%	
Wp2a1264	a (14/27)	Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-Klons G13: <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	G13: 319 ¹ (273/2/285) ²	96	
	a2 (1/27)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	789 ¹ (787/1/789) ²	99	
	e (1/27)	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	546 ¹ (533/0/535) ²	99	
	t (1/27)	n. a.	n. a.	n. a.	
	x (3/27)	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	668 ¹ (663/1/665) ²	99	
	y (1/27)	n. a.	n. a.	n. a.	
	z (5/27)		<i>Thermotogaceae bacterium</i> SulfLac1	802 ¹ (791/0/794) ²	99
			<i>Petrotoga mobilis</i> ^T SJ95	(723/23/796) ²	91
	z2 (1/27)		<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	724 ¹ (657/18/721) ²	91

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Auch für Unterkultur Wp2a1264 ist in Abbildung 73 ein phylogenetischer Stammbaum dargestellt.

4.5.2.4 Identifizierung von Bakterien aus der Mischkultur Gp1a und Unterkultur Gp1b1264

Mit isolierter Gesamt-DNA aus der propionsäureoxidierenden syntrophen Kultur Gp1a (aus der NawaRo-BGA Biogasanlage BioEnergie Glahn, Tabelle 18) wurde ebenfalls eine molekularbiologische Analyse durchgeführt. Amplifiziert wurde mit dem Oligonukleotidpaar BSF8/BSR1541 (Tabelle 8) und weiterführend wie bei der in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Analyse der Klone verfahren. 20 von 25 16S rDNA-Fragmente aus Kultur Gp1a wurden restringiert. Mit Klon Gp1a29 wurde ein eindeutiges Muster generiert.

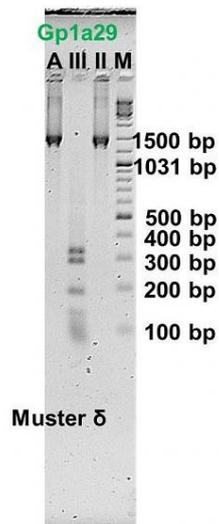


Abbildung 52: RFLP des Plasmid-Amplifikats Gp1a aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1a (Tabelle 14); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III) in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; griechischer Buchstaben = Schnittmuster; grüne Klonbezeichnung über 3 Gelbeladungstaschen = zur Sequenzierung verwendetes Reamplifikat; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

Eine zu geringe DNA-Konzentration wiesen 7 Amplifikate von insgesamt 20 Klonen auf. 12 Restriktionen zeigten mit HaeIII geschnitten keine diskreten Bandenmuster, so dass mit diesen Klonen keine Bandenauswertung durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Einschließlich Gp1a29 (Abbildung 52) wurden vier 16S rDNA Fragmente mit der höchsten Amplifikat-Ausbeute zum Sequenzieren verschickt. Mit Zwei Fragmenten wurde ein zufriedenstellendes Ergebnis erhalten (Tabelle 41). Die digital erhaltenen Sequenzen befinden sich auf ‚Rohdaten_CD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Propkulturen‘.

Tabelle 41: Molekularbiologische Analyse der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Mischkultur Gp1a (Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Gp1a6	n. a.	<i>Desulfovibrio oxamicus</i> ^T DSM1925	816 ¹ (791/7/810) ²	98
Gp1a29	δ (1/20)	<i>Desulfovibrio oxamicus</i> ^T DSM1925	901 ¹ (886/6/901) ²	98

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Zwei Sequenzen aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1a zeigten die größte Übereinstimmung mit *Desulfovibrio oxamicus*^T DSM1925 (Tabelle 41). Ein paarweiser Vergleich (Clustal 2.1, EMBL, siehe Abbildung 129) der beiden Sequenzen wurde durchgeführt. Auch die aus der paarweisen Alignierung ermittelten Konsensussequenz (798 bp, Abbildung 130) stimmte zu 98 % (Übereinstimmung: 798 bp, Lücken: 12 bp, verglichene Sequenzlänge: 805 bp) mit *Desulfovibrio oxamicus*^T DSM1925 überein.

Weiteren Aufschluss gaben die Restriktionen von Klonen der partiellen bakteriellen 16S rDNA aus Unterkultur Gp1b1264 mit anschließender Sequenzierung.

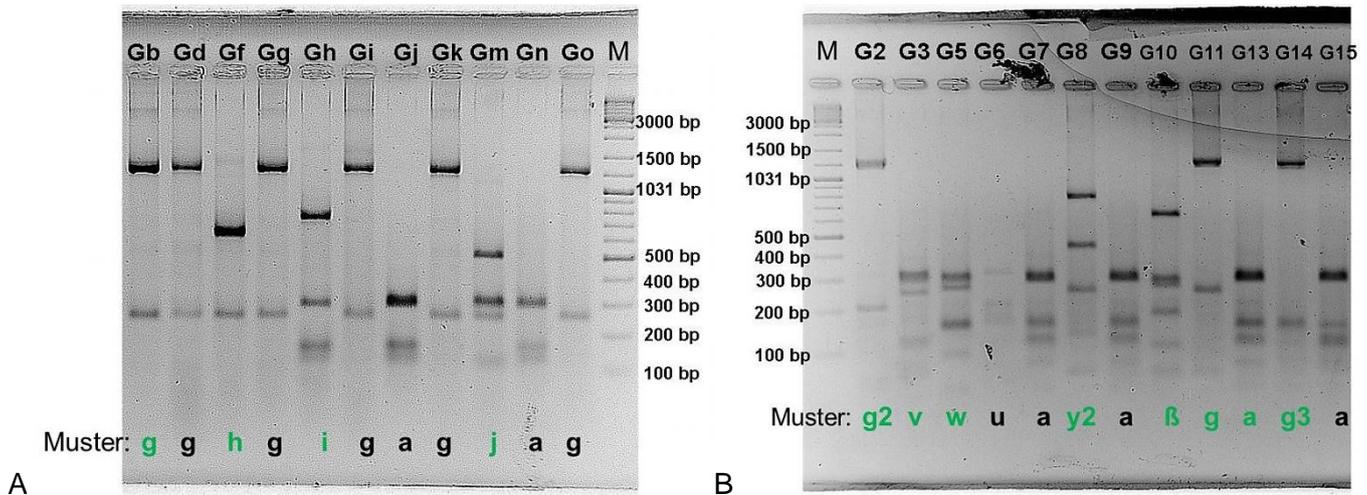


Abbildung 53: RFLP Klonen der partiellen bakteriellen 16S rDNA aus Unterkultur Gp1b1264 (G, Tabelle 14); A erster Klonierungsdurchgang, B zweiter Klonierungsdurchgang; in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; jeweils 8 µL Klon-Amplifikat (1533 bp) geschnitten mit 5 U HaellI; Buchstaben: Restriktionsmuster; grün: zur Sequenzierung versendetes Reamplifikat; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

Aus den jeweils 15 Klonen wurden nach der ersten Klonierung 11 und nach der zweiten Klonierung 12 Amplifikate mit HaellI verdaut. Der erste, wie auch der zweite Klonierungsdurchgang ergaben von 23 restringierten Klonfragmenten 7 das Restriktionsmuster ‚g‘, zu dem bei der Restriktion der zweiten Klonierung zwei sehr ähnliche Muster auftraten, ‚g2‘ und ‚g3‘ genannt (Abbildung 53 B). Ebenfalls eine bereits im Fermenter der BGA BioEnergie Glahn nachweisbare Dichte wiesen die 16S rDNA-Fragmente mit den Mustern ‚g‘ und ‚g2‘ der Unterkultur Gp1b1264 (Abbildung 53 A, B) auf, da diese Muster bei der zuvor erfolgten Restriktion der 16S rDNA des gesamten Fermenters (Abbildung 44) als Muster ‚12‘ respektive dreifach als Muster ‚9‘ benannt auftauchten. Klone mit Restriktionsmuster a, bereits bekannt aus der Restriktion der Klone der Unterkultur Wp2a1264 (Abbildung 51), tauchten insgesamt 6 Mal bei beiden Klonierungen der Unterkultur Gp1b1264 auf. Einzig im ersten Klonierungsdurchgang zeigten sich Restriktionsmuster ‚h‘, ‚i‘ und ‚j‘, welche sich nicht zuordnen ließen, da die Sequenzierungen ohne Ergebnis blieben. Bei der Restriktion der 16S

rDNA-Fragmente des zweiten Klonierungsdurchgangs entstanden neue Muster, die ‚ β ‘, ‚v‘, ‚w‘ und ‚y2‘ benannt wurden. Letzt genanntes Muster wies eine Ähnlichkeit zu Muster ‚y‘ von Klon Wn (Abbildung 51) auf. Die Restriktion des Klons G6 zeigte das bereits bekannte Muster ‚u‘, welches zu *Escherichia coli* K-12 zugeordnet wurde. Auch aus Unterkultur Gp1b1264 wurden die Klone in Abbildung 53 mit in grünen Buchstaben markierten Mustern zur Sequenzierung versendet. Wie oben bereits beschrieben, lieferten die Sequenzierungen des ersten Klonierungsdurchgangs keine Ergebnisse. Auf der ‚RohdatenCD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Ukulturen/Molbiol_Analysen_Ukulturen1264‘ sind die verwendeten Sequenzen hinterlegt, die zur Identifikation dienen.

Tabelle 42: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Gp1b1264 (Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
G13	a (6/23)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	862 ¹ (836/9/864) ²	97
Gf	h (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.
G11	g (7/23)	<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	817 ¹ (756/10/801) ²	94
		<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC 33270	(742/20/809) ²	92
G2	g2 (1/23)	<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	852 ¹ (783/15/830) ²	94
		<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC 33270	(765/23/837) ²	92
G14	g3 (1/23)	<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	811 ¹ (679/12/815) ²	94
		<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC 33270	(749/18/818) ²	92
Gh	i (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.
Gm	j (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.
G10	β (1/23)	<i>Geovibrio thiophilus</i> ^T DSM11263	847 ¹ (814/4/842) ²	97
G3	v (1/23)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	678 ¹ (675/1/678) ²	99
G5	w (1/23)	Anaerobic bacterium MO-CFX2	731 ¹ (647/32/724) ²	89
		<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM 12261	(610/42/722) ²	84
G8	y2 (1/23)	<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i> ^T DSM16054	765 ¹ (507/27/592) ²	86

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Die in Tabelle 42 aufgelisteten Sequenzierungsergebnisse des Klons G13 mit Muster ‚a‘ wurde als *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 identifiziert, ebenso wie die Sequenz des Klons G3 (Muster ‚v‘), auch wenn sich die Restriktionsmuster voneinander unterschieden (Abbildung 53B). Eine paarweise Sequenzalignierung dieser beiden Klon-Fragmente (663 bp von 881 bp vergleichbaren Basen mit 5 Lücken) zeigte signifikante Übereinstimmungen (99 %). Die Übereinstimmung mit Klon F6 (Muster ‚d‘ ähnlich Muster ‚a‘) betrug beim paarweisen Vergleich mit Klon G3 (366 bp von 381 bp verglichenen Basen mit 2 Lücken) sowie G13 (362 bp von 377 bp und keiner Lücke) mit 96 % aus. Die Sequenz der Klone G2, G11 und G14 zeigten, dass die drei Sequenzen mithilfe der NCBI-Datenbank der Familie der *Peptostreptococcaceae* zugeordnet wurden, obwohl sich ihre Muster unterschieden. Die Sequenzen der Muster ‚g‘, ‚g2‘ und ‚g3‘ (Abbildung 53) zeigten eine Übereinstimmung von 99 % (multipler Sequenzvergleich siehe Abbildung 136). Die Muster ‚h‘, ‚i‘ und ‚j‘ tauchten beim zweiten Klonierungsdurchgang nicht erneut auf, weshalb die Sequenzen mit diesen Mustern nicht identifiziert wurden. Klon-Fragment G10 mit Muster ‚β‘ (Abbildung 53) wurde *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 zugeordnet. Die Sequenz des Klons G8 mit Muster ‚y2‘ ließ keine eindeutige Zuordnung zu einer Art zu. Diese Klon-Sequenz gehört zur Gattung *Spirochaeta*. Keine artspezifische Zuordnung wurde bei Klon G5 (Muster ‚w‘) aufgrund von Signalüberlagerungen bei der Sequenzierung vorgenommen.

Tabelle 43: Bakterielle Diversität der Kultur Gp1b1264 (Tabelle 14)

Kultur	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%	
Gp1b1264	a (6/23)	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	862 ¹ (836/9/864) ²	97	
	h (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.	
	g (7/23)		<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	817 ¹ (756/10/801) ²	94
			<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC33270	(742/20/809) ²	92
	g2 (1/23)		<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	852 ¹ (783/15/830) ²	94
			<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC33270	(765/23/837) ²	92
	g3 (1/23)		<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium SK031	811 ¹ (679/12/815) ²	94
			<i>Parvimonas micra</i> ^T ATCC33270	(749/18/818) ²	92
	i (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.	
	j (1/23)	n. a.	n. a.	n. a.	
	β (1/23)		<i>Geovibrio thiophilus</i> ^T DSM11263	847 ¹ (814/4/842) ²	97
	u (1/23)		Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-Klons F5: <i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	500 ¹ (499/0/500) ²	99
	v (1/23)		<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	678 ¹ (675/1/678) ²	99
	w (1/23)		Anaerobic bacterium MO-CFX2	731 ¹ (647/32/724) ²	89
			<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	(610/42/722) ²	84
y2 (1/23)		<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i> ^T DSM16054	765 ¹ (507/27/592) ²	86	

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Eine Sequenz aus der Unterkultur Gp1a63-L wurde zu 97 % der Art *Tissierella creatinini*^T DSM9508 zugeordnet (Übereinstimmung von 456 bp mit 4 Lücken bei einer verglichenen Sequenzlänge von 469 bp). Bereits in der molekularbiologischen Analyse des Fermenters sowie des Nachgärers aus der NawaRo-BGA BEG zeigte sich, dass Mikroorganismen der Klasse *Clostridia* bei der Biogasbildung beteiligt sind (Muster 11, Abbildung 44 A und Abbildung 45).

In Abbildung 74 ist eine Übersicht der molekularbiologischen Identifizierungsergebnisse der den ursprünglich aus Kultur Gp1 stammenden Bakterien in Form eines phylogenetischen Stammbaums dargestellt.

4.5.2.5 Identifizierung von Bakterien aus den Unterkulturen Ap1a1264 und Ap1a520

Zunächst wurde mit 16S rDNA-Klonen aus Unterkultur Ap1a1264 die Restriktionsmethode angewendet und darauffolgend eine Sequenzierungen ausgewählter Klon-Fragmente durchgeführt. Jeweils 15 Klone wurden für eine RFLP amplifiziert, von denen jeweils 12 Amplifikate eine ausreichende Menge 16S rDNA-Fragmente für eine RFLP enthielten.

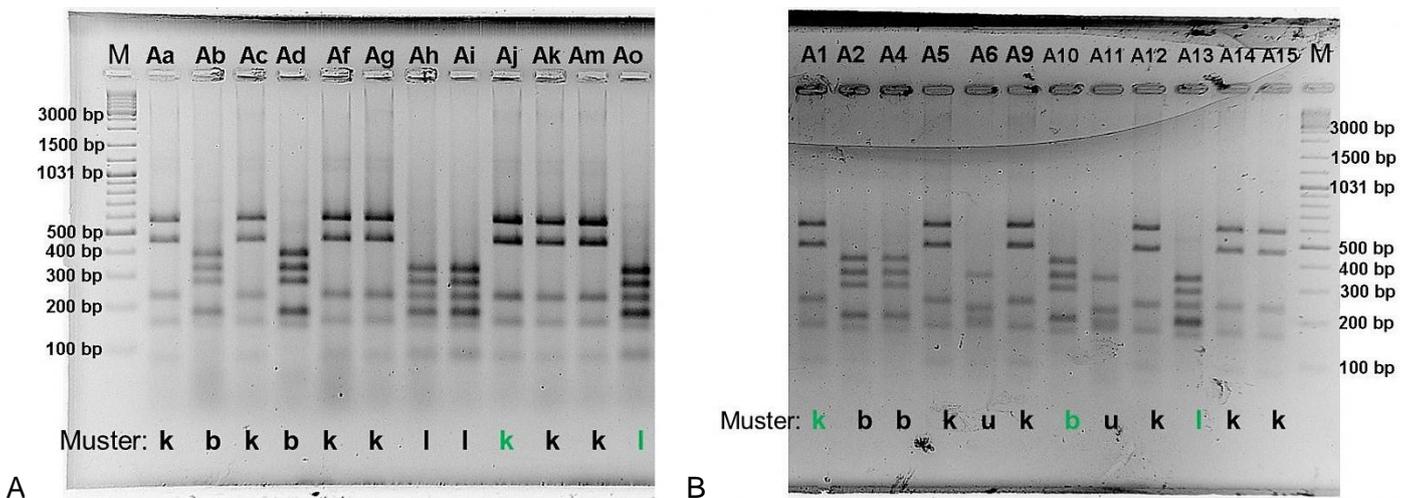


Abbildung 54: RFLP der Klon-Amplifikate aus Unterkultur Ap1a1264 (A, Tabelle 14); A erster Klonierungsdurchgang, B zweiter Klonierungsdurchgang; in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; jeweils 8 μ L Klon-Amplifikat (1533 bp) geschnitten mit 5 U HaeIII; Buchstaben: Restriktionsmuster; grün: zur Sequenzierung versendetes Reamplifikat; M = 2,5 μ g GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; Farben invertiert.

Die RFLP der partiellen bakteriellen 16S rDNA aus Unterkultur Ap1a1264 zeigte insgesamt zwei neue Muster, ‚k‘ und ‚l‘ und zwei bereits bekannte Muster ‚b‘ und ‚u‘ (Abbildung 54). Im Folgenden sind die Zuordnungen der erhaltenen Sequenzen nach Mustern alphabetisch geordnet aufgezählt. Die verwendeten Sequenzen sind auf der ‚RohdatenCD/Molbiol_Analysen/Molbiol_Analysen_Ukulturen/Molbiol_Analysen_Ukulturen1264‘ hinterlegt.

Tabelle 44: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der klonierten 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Ap1a1264(Tabelle 14)

Klon	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
A10	b (5/24)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	785 ¹ (734/15/786) ²	93
A1	k (13/24)	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	863 ¹ (859/7/867) ²	99
A13	l (4/24)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	835 ¹ (754/27/833) ²	90

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Die Sequenz des Klons A1 zeigte eine eindeutige Übereinstimmungen mit der 16S rDNA-Sequenz von *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 aus der digitalen Datenbank der NCBI zu 99 % (Tabelle 44). Klon A10 mit Muster ‚b‘ ließ sich nicht eindeutig einer Art zuordnen, wie Klon F10 (Tabelle 41) mit ähnlichem Muster ‚b2‘ (Abbildung 48). Ebenfalls wurde Klon A13 mit Muster ‚l‘ zum Genus *Proteiniphilum* wie Klone A10 und F10 eingruppiert. Eine multiple Sequenzalignierung (Abbildung 138) der Sequenzen der drei Klone wurde durchgeführt. Dieser Vergleich zeigte hohe Übereinstimmungen der Sequenzen der Klone A10, A13 und F10 zu 99 % beziehungsweise zu 98 %, was die zuvor erfolgte Einordnung zum Genus *Proteiniphilum* bestätigte. Außerdem zeigte die Sequenz des Klons A13 eine zusätzliche Schnittstelle des Restriktionsenzym HaellI, die ein 186 bp großes Fragment verursacht.

```

A10_BSF8      TTTGTTAAAGATTFTTTTCGGTAGAAGATGGGCATGCGTTCATTAGCTAGTTGGTTGAG 135
A13_BSF8      GTAATTAAGGAGTAATCCGCTATAAGATGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT-GAG 177
F10_BSF8      TTTGTTAAAGATTFTTTTCGGTAGAAGATGGGCATGCGTTCATTAGCTAGTTGGTTGAG 180
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

A10_BSF8      GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGGAAGTGGAGGTTTATCCCCACACTGG 195
A13_BSF8      GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGGAAGTGGAGGTTTATCCCCACACTGG 237
F10_BSF8      GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGGAAGTGGAGGTTTATCCCCACACTGG 240
*****

A10_BSF8      TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATGGTCAATGGAG 255
A13_BSF8      TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATGGTCAATGGAG 297
F10_BSF8      TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATGGTCAATGGAG 300
*****

A10_BSF8      GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTC 315
A13_BSF8      GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTT 357
F10_BSF8      GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTT 360
*****

```

Abbildung 55: Ausschnitt aus der multiplen Sequenzalignierung des Klons F10 (533 bp) aus der Unterkultur Fp1a1264 mit der Sequenz des Klons A10 (785 bp) und A13 (835 bp) aus der Unterkultur Ap1a1264 (Tabelle 14)

Diese zusätzliche Schnittstelle ist für das unterschiedliche Restriktionsmuster des Klons A13 (Muster ‚l‘) zu Muster ‚b‘ des Klons A10 verantwortlich (Abbildung 54). Das Bandenmuster ‚b‘ (Klon A10) zeigt eine Bande bei etwa 400 bp und keine bei Muster ‚l‘ (Klon A13). Dafür ist bei Muster ‚l‘

(Klon A13) eine zusätzliche Bande über der 200 bp-Markierung zu sehen. Die Bande knapp unter der 200 bp-Markierung von Muster ,l' (Klon A13) ist stärker als die des Musters ,b'(Klon A10). Eine Sequenzen mit Muster ,u' wurde zuvor bereits identifiziert (Klon F5, Tabelle 35), so dass aus Kultur kein Fragment mit Muster b zur Sequenzierung versendet wurde.

Tabelle 45: Bakterielle Diversität der Kultur Ap1a1264 (Tabelle 14)

Kultur	Muster [Häufigkeit/ Gesamtklone]	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Ap1a1264	b (5/24)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	785 ¹ (734/15/786) ²	93
	k (13/24)	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	863 ¹ (859/7/867) ²	99
	l (4/24)	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	835 ¹ (754/27/833) ²	90
	u (2/24)	Musterzuordnung zur Sequenz des Unterkultur-Klons F5: <i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	F5: 500 ¹ (499/0/500) ²	99

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Wie bereits beschrieben wurde auch für Unterkultur Ap1a520 eine Identifizierung über eine DGGE durchgeführt.

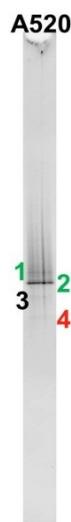


Abbildung 56: DGGE des 500 bp Amplifikats der Kultur Ap1a520 (A520, Tabelle 14); Denaturierender Gradient: 70/30; angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; grün = zur Sequenzierung versendete Reamplifikate; schwarz = zu wenig Reamplifikat für eine Sequenzierung; rot = keine Reamplifizierung möglich; Farben invertiert.

In der Spur der Amplifikate der Unterkultur Ap1a520 (Abbildung 56) wurden vier Banden durch die DGGE aufgetrennt. Diese vier Banden wurden ebenfalls ausgeschnitten und eluiert. Genügend Reamplifizierungsprodukt für eine Sequenzierung lieferten Banden 1 und 2 der Unterkultur Ap1a520, welche ebenfalls versendet wurden. Die erhaltenen Sequenzen der Banden 1 aus Unterkultur Fp1a520 sowie der Banden 1 und 2 aus Unterkultur Ap1a520 wurden mit Sequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen, um sie Mikroorganismen zuzuordnen. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 46: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente aus der Unterkultur Ap1a520 (Tabelle 14) in DSM-Medium 520

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
Ap1a520	1	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	447 ¹ (439/0439) ²	100
	2	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	445 ¹ (442/0/442) ²	100
	3	zu wenig Reamplifikat	n. a.	n. a.
	4	kein Reamplifikat	n. a.	n. a.

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Die beiden sequenzierten Fragmente aus den signifikantesten DGGE-Banden der Unterkultur Ap1a520 wurden jeweils zu 100 % als *Clostridium sartagoforme*^T identifiziert.

```

A520 1 434 GCATGGCTTCCC 445
          |||||  |||||
A520 2 435 GCATGG-TTCCC 445

```

Abbildung 57: Ausschnitt aus der paarweisen Alignierung (Abbildung 140) der partiellen 16S rDNA Sequenzen A520 1 mit A520 2 aus Unterkultur Ap1a520 (Tabelle 14), Deletion im Strang A520 2 hellblau markiert.

Eine paarweise Alignierung (Abbildung 140) zeigte eine Deletion (blaue Markierung Abbildung 57) in der Sequenz des Fragments A520 2 zwischen den Basen 441 und 442, was das andere Laufverhalten im DGGE-Gel (Abbildung 49) begründen kann. Diese Sequenzierungsergebnisse bestätigten außerdem die bereits eindeutigen Ergebnisse aus der 16S rDNA-Analyse von Klonen aus Ap1a1264 (Tabelle 44) mit Muster ‚k‘ (Abbildung 54 A, B) mit dem Unterschied, dass es sich hier um eine bakterielle Reinkultur aus der anaerob propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1a handelte, die durch Wechsel des Substratangebots isoliert wurde. Beide partiellen 16S rDNA-Sequenzen aus dieser Kultur sind in der NCBI-Datenbank mit den *accession numbers* JQ955660 und JQ955661 hinterlegt.

4.5.3 Zusammenfassung der identifizierten und isolierten Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen

Bei der Bildung von Biogas wurden Bakterien unterschiedlicher Ordnungen aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen (Tabelle 14) identifiziert und teilweise durch Substratwechsel und darauffolgende Überimpfungen in flüssigen teilweise artspezifischen Medien (Kapitel 2.6) isoliert. Muster ‚a‘ trat 6 Mal von 22 Mustern aus der Unterkultur Fp1a1264 (Abbildung 48 A,B), 14 Mal von 27 Mustern aus Wp2a1264 (Abbildung 51 A, B), und 6 Mal von 23 Mustern aus Gp1a1264 (Abbildung 53 A, B) auf und wurde mit der Sequenz des Klons G13 (Tabelle 42) aus Gp1a1264 artspezifisch zu *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 zugeordnet. Ebenfalls als *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 wurden die Sequenzen mit in Kultur Fp1a1264 2fach auftretendem Muster ‚d‘ (Abbildung 48 A, B), mit Muster ‚a2‘ (Abbildung 51 A, B) aus Kultur Wp2a1264 sowie mit Muster ‚v‘ (Abbildung 53 A, B) aus Kultur Gp1a1264 identifiziert. Auf Grund von Signalüberlagerungen bei der extern durchgeführten Sequenzierung wurden die Sequenzen mit Muster ‚z‘ (Abbildung 51 A, B) aus Kultur Wp2a1264 und mit Muster ‚w‘ (Abbildung 53 B) aus Kultur Gp1a1264 lediglich zu 91 % beziehungsweise 84 % dem Genus *Aminobacterium* zugeordnet. Eine Anreicherung von *Aminobacterium colombiense* wurde in DSMZ-Medium 846 erzielt.

Muster ‚d2‘ wurde der Art *Sphaerochaeta globus* Stamm Buddy zugeordnet, von dem das Gesamtgenom in der NCBI-Datenbank bekannt ist.

Die Sequenzen mit Muster ‚b‘ (5 von 24 Restriktionen, Abbildung 54 A, B) aus der Unterkultur Ap1a1264 sowie Fp1a1264 (3 von 22 Restriktionen, Abbildung 48 A, B), Muster ‚b2‘ (1 von 22 Restriktionen, Abbildung 54 A, B) und Muster ‚l‘ aus Unterkultur Ap1a1264 (4 von 24 Restriktionen, Abbildung 54 A, B) wurden dem Genus *Proteiniphilum* zugeordnet. *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 wurde in dieser Arbeit durch Wechsel des Substrats und Verdünnungsreihen in DSMZ-Medium 520 isoliert. Durch die eindeutige molekularbiologische Identifizierung des Bakteriums (Abbildung 49 und Tabelle 37) wurde die Reinkultivierung in dieser Arbeit belegt.

13 von 24 Restriktionen der Unterkultur Ap1a1264 ergaben das Muster ‚k‘ (Abbildung 54 A, B). Aus dieser Sequenz wurde eindeutig *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 identifiziert. Muster ‚k‘ und Muster 11 aus dem Fermenter (Abbildung 44) sowie Nachgärer (Abbildung 45) der BGA Glahn zeigten identische Muster. *Clostridium sartagoforme* hatte somit in dieser Biogasanlage zur Zeit der Probennahme eine Populationsdichte, die ausreichte, um die Anwesenheit dieses Bakteriums mit der molekularbiologischen Analyse der bakteriellen Gesamt-16S rDNA des Fermenter- und Nachgärerinhaltes zu zeigen (Abbildung 44 A, Abbildung 45 und Tabelle 32). Mit einem Substratwechsel und mehreren Überimpfungen in DSMZ-Medium 520 wurde der Stamm *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 in dieser Dissertation isoliert, was durch molekularbiologische Analysen gezeigt wurde (Abbildung 56 und Tabelle 46).

Die Sequenzen mit jeweils einmalig auftretenden Mustern ‚e‘ in Unterkultur Fp1a1264 und Wp2a1264 sowie das in Unterkultur Wp2a1264 dreifach auftretende Muster ‚x‘ (3/27) wurden zu 99 % *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 zugeteilt. In dieser Arbeit wurden die von der DSMZ erstandenen Kulturen des Typstamms *Wolinella succinogenes* in DSMZ-Medium 157 überimpft, um den Mikroorganismus anzureichern. Das Substratverhalten dieses Stamms in mit Propionsäure versetzten PI-Medium und in Co-Kultur mit eigenisolierten methanogenen Archaea sowie *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 analysiert, was in Kapitel 4.7.4.2 besprochen wird. *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 wurde ebenfalls in dieser Arbeit verwendet, da die Sequenz mit Muster ‚β‘ aus Unterkultur Gp1b1264 zu 97 % mit diesem Mikroorganismus übereinstimmte (Tabelle 42). In Kultur Fp1a63-L wurde der Mikroorganismus außerdem aus der Mischkultur Fp1a angereichert (Tabelle 34).

Muster ‚u‘ tauchte zweifach in Unterkulturen Fp1a1264 und Ap1a1264 sowie einfach in Unterkultur Gp1b1264 auf. Der durch Sequenzanalyse identifizierte Vertreter der Art *Escherichia coli* mit Muster ‚u‘ war mit dem mit der Zahl ‚16‘ versehenen Muster aus der Restriktionsanalyse der Gesamt-16S rDNA aus Fermentern der BGA Glahn (G, Abbildung 44) und Arenrath sowie dem Nachgärer der BGA Glahn (A, GN, Abbildung 45) identisch. Dieser typische Darmkeim wurde bei der weiterführenden Analyse der in propionsäureabbauenden Mischkulturen wachsenden Mikroorganismen nicht berücksichtigt.

Die Typstämme *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261, *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292, *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 und *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 wurden aufgrund der Sequenzierungsergebnisse von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bestellt und für chemische Analysen in PI-Medium (Kapitel 3.6.1 und 4.7.1) verwendet. Um mögliche syntrophe Stoffwechsel der bei der Biogasbildung beteiligten Bakterien chemisch zu analysieren wurden in dieser Dissertation methanogene Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen kultiviert, angereichert und isoliert. Diese Kulturen wurden auch molekularbiologisch identifiziert.

4.6 Identifizierung eigenisolierter methanogener Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen

16S rDNA von archaealen Eigenisolaten (Tabelle 16) aus den NawaRo-Biogasanlagen (BGA, Tabelle 18) BioEnergie Glahn (BEG), Huber Wagner und Sohn GbR (HWS) und Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (TAF) sowie Laborfermentern des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (LFP, mesophil sowie thermophil, Klocke *et al.* 2007) wurden mithilfe von *touch down* Amplifizierungen (*td*-PCR, Kapitel 3.5.3) mit den synthetischen Oligonukleotiden (Tabelle 8) Ar1000f/ Ar1500r beziehungsweise Met86f/ Met1340r vervielfältigt, welche 500 bp große

sowie 1254 bp große DNA-Fragmente ergaben. Mit den Aufreinigungsmethoden Denaturierende/Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (D/TGGE, Kapitel 3.5.6) wurden die 500 bp großen Fragmente aufgetrennt. Die 1254 bp großen Fragmente aus Kulturen methanogener Archaea wurden zur Charakterisierung mit dem Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP, Kapitel 3.5.8) verwendet. Die archaealen 16S rDNA Fragmente wurden nach Reamplifizierung zur Sequenzierung versendet (Kapitel 3.5.9). Digital erhaltene Sequenzen wurden wie bereits beschrieben mit den in der offenen NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen und Mikroorganismen zugeordnet. Sequenzen von archaealen Reinkulturen wurden in der NCBI-Datenbank eingetragen. Paarweise und multiple Alignierungen dienten zur Bestätigung der Identifizierungen von methanogenen Archaea und zur Erstellung von Stammbäumen (Kapitel 3.5.10).

Tabelle 47: Eigenisolierte (Rein)Kulturen methanogener Archaea

Spezies ^a	Isoliert aus	accession number ^b
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm BEG1 ^{1, 1a}	NawaRo-Fermenter	AN JN243320
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm HWS1 ¹	NawaRo-Fermenter	AN JN243318
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1 ^{1, 1a}	Laborfermenter	AN JN566059
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1 ^{1, 1a}	NawaRo-Fermenter	AN JN243315
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm BEGN ¹	NawaRo-Nachgärer	AN JX943602
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm HWS1.1 ¹	NawaRo-Fermenter	-
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1 ¹	NawaRo-Fermenter	AN JN243316
<i>Methanomethylovorans</i> sp. Stamm LFP3.1 ³	Laborfermenter	AN JN566058
<i>Methanosaeta concilii</i> Stamm BEG4 ²	NawaRo-Fermenter	AN JN243322
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1 ^{1, 2, 3}	NawaRo-Fermenter	AN JN243319
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3 ^{1, 2, 3}	NawaRo-Fermenter	AN JN243321
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm LFP2.1 ^{1, 2, 3}	Laborfermenter	-
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm TAF1.2 ^{1, 2, 3}	NawaRo-Fermenter	AN JN243317
<i>Methanosarcina siciliae</i> Stamm BEGN2 ^{1, 2, 3}	NawaRo-Nachgärer	AN JX943603

^a Alle Eigenisolate wurden zur Hinterlegung in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) übergeben; ^b Reinkulturen; ¹ Substrat H₂/CO₂, ^{1a} Formiat ² Substrat Acetat, ³ Substrat Methanol

Die Kulturen *Methanoculleus bourgensis* Stamm HWS1.1, *Methanosarcina mazei* Stamm LFP2.1 haben keine *accession number* bei der Datenbank der NCBI, da diese Kulturen zum Abschluss der praktischen Arbeit dieser Dissertation mit anderen methanogenen Archaea kontaminiert waren (siehe dazu Abbildung 63 und Abbildung 66).

Nach einer *td*-PCR chromosomaler DNA der propionsäureabbauenden Mischkulturen Ap1a, Fp1a, Gp1b und Wp2a (Tabelle 14) mit dem archaealen Oligonukleotidpaar Met86f/ Met1340r (Tabelle 9) wurde mit der Agarose Gel Elektrophorese der Kulturen Ap1a und Fp1a geringe Mengen archaealer 16S rDNA mit Ethidiumbromid angefärbt. Aus Gp1b und Wp2a wurde mittels Agarose Gel Elektrophorese keine archaealen Amplifikate detektiert (Agarose Gel Elektrophorese nicht gezeigt). Eine weiterführende Identifizierung der archaealen 16S rDNA Fragmente aus den

syntroph propionsäureabbauenden Mischkulturen Ap1a und Fp1a wurde nicht durchgeführt, da die *td*-PCR zu geringe Mengen Amplifikat lieferte.

4.6.1 Stammspezifische Identifizierung methanogener Archaea der Art *Methanobacterium formicicum* mit der SAPD-PCR

Mit einzelnen methanogenen Reinkulturen der Art *Methanobacterium formicicum* wurde in dieser Arbeit die Anwendbarkeit der SAPD-PCR (Kapitel 3.5.4) gezeigt.

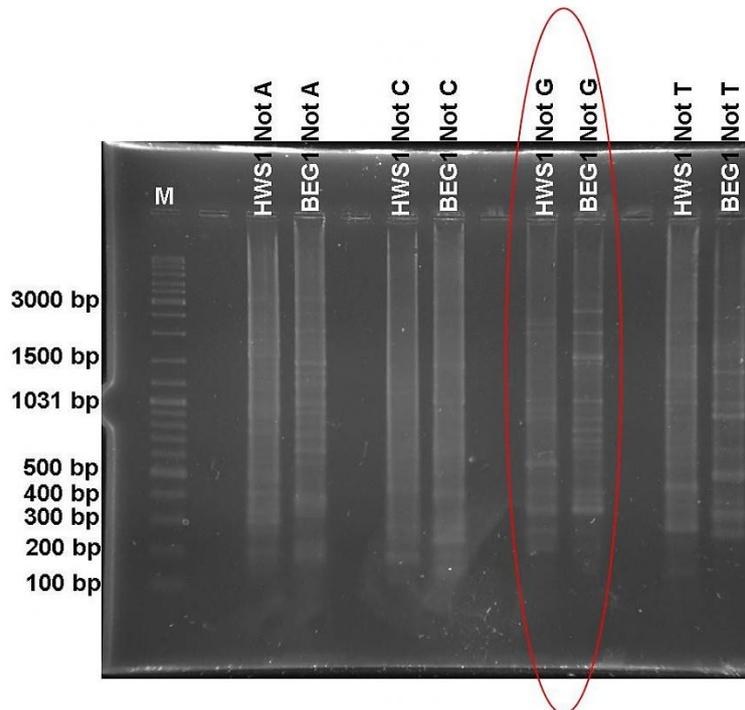


Abbildung 58: SAPD-PCR der chromosomalen archaealen 16S rDNA aus den Kulturen HWS1 und BEG1; M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; rote Ellipse = eindeutiger Unterschied des Bandenmusters; 1,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen.

In Abbildung 58 sind aus vier gleichzeitig durchgeführten SAPD-PCRs mit vier verschiedenen synthetischen Oligonukleotiden (Tabelle 10) entstandenen Bandenmuster der Kulturen HWS1 (aus BGA Huber Wagner und Sohn GbR, Tabelle 18) und BEG1 (aus BGA BioEnergie Glahn, Tabelle 18) dargestellt. Mit chromosomaler DNA aus den Kulturen HWS1 sowie BEG1 wurde mit Oligonukleotid Not G (rote Ellipse) Bandenmuster mit dem deutlichsten Unterschied amplifiziert. Mit dieser SAPD-PCR wurde eine geringere Anzahl Banden produziert, was die Banden diskreter voneinander trennte. Die SAPD-PCR stellt eine Möglichkeit dar, methanogene Kulturen anhand chromosomaler DNA voneinander zu unterscheiden. Diese Methode wurde nicht weiterführend angewandt, da weitreichende Modifikationen der Methode zur Optimierung auf archaeale DNA nötig sind.

4.6.2 Artspezifische Identifizierung der Eigenisolate methanogener Archaea mit der DGGE

Das hintere Drittel der archaealen 16S rDNA eigenisolierter Kulturen methanogener Archaea, zu denen auch archaeale Reinkulturen zählen, wurden unter anderem mit der Methode der DGGE (Kapitel 2.5.3 und 3.5.6) analysiert. Die Auftrennung von 500 bp großen 16S rDNA Amplifikaten (Oligonukleotidpaarung: Ar1000f/ Ar1500GC, Tabelle 8) mit der DGGE gab Aufschluss über die Reinheit der Kulturen durch anschließende externe Sequenzierung der Reamplifikate (Oligonukleotidpaarung: Ar1000f/ Ar1500, Tabelle 8) aus den eluierten Banden.

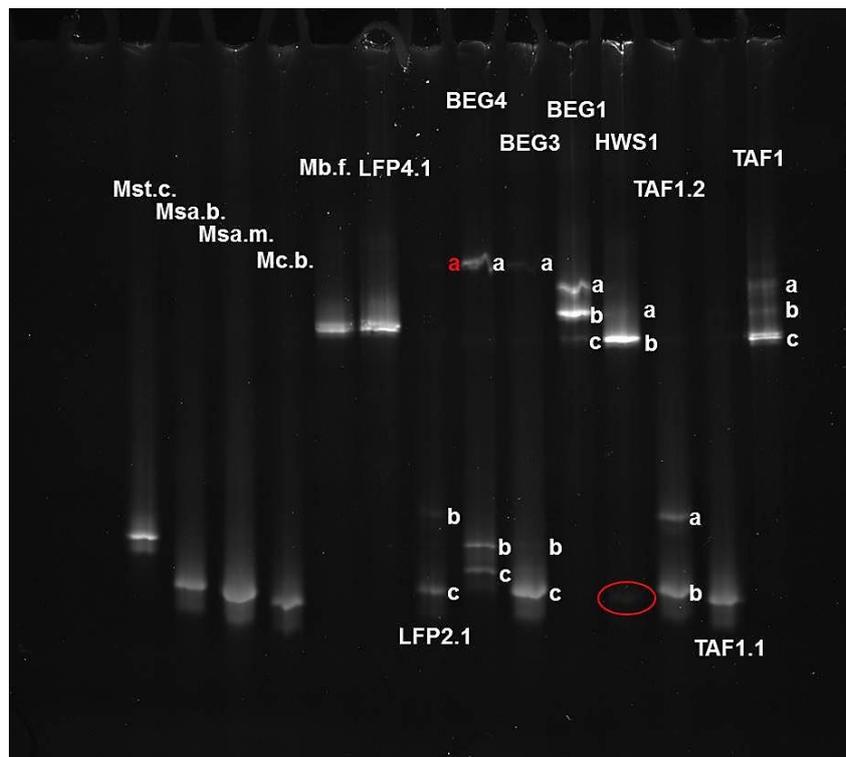


Abbildung 59: Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese 500 bp großer 16S rDNA-Fragmente aus Eigenisolaten methanogener Archaea (Spuren von rechts nach links) TAF1 (Banden a, b, c), TAF1.1, TAF1.2 (Banden a, b), HWS1 (Banden a, b), BEG1 (Banden a, b, c), BEG3 (Banden a, b, c), BEG4 (Banden a, b, c), LFP2.1 (Banden a, b, c), LFP4.1, Typstämme *Methanobacterium formicum*^T DSM1535, *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045, *Methanosarcina mazei*^T DSM2053, *Methanosarcina barkeri*^T DSM800, *Methanosaeta concilii* DSM2139; weiße Buchstaben = zur Sequenzierung versendete Reamplifikate; roter Buchstabe = misserfolgte Reamplifizierung; rote Ellipse = nicht ausgeschnittener, angefärbter Bereich; Denaturierender Gradient: 60/40; angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen.

In den Spuren (Abbildung 59) der 16S rDNA Fragmente aus den Kulturen TAF1 (aus BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR, Tabelle 18) und BEG1 (aus BGA BioEnergie Glahn, Tabelle 18) sind drei diskrete Banden aufgetrennt worden (a, b, c), welche auf gleicher Höhe lagen. In der Spur

TAF1 wurde Bande TAF1c am stärksten angefärbt und in der Spur des Stamms BEG1 dominierte Bande BEG1b. Die Spur der Kultur HWS1 (aus BGA Hubert Wagner und Sohn GbR, Tabelle 18) wies zwei Banden auf (a, b), die auf gleicher Höhe mit den Banden b und c der anderen beiden Kulturen TAF1 und BEG1 zum Stillstand gekommen sind, wobei Bande HWS1b die stärkere von beiden gewesen ist. Ein mit einer roten Ellipse gekennzeichnete mit Ethidiumbromid angefärbter Bereich im Gel wurde aufgrund geringer Diskretion nicht zur weiteren Analyse verwendet. Die Banden TAF1 c sowie BEG c als auch HWS1 b hatten im Vergleich zu der Bande des Typstamms *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 einen etwas längeren Weg im DGGE-Gel zurückgelegt. Die einzige Bande des 16S rDNA Fragments der Kultur LFP4.1 (thermophiler Laborfermenter, Klocke *et al.* 2007) wurde in gleicher Höhe mit der Bande des Typstamms *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 abgegrenzt. Die einzige Bande der Spur, Kultur TAF1.1 kam auf der gleichen Höhe wie die Spur des Typstamms *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 zum Stillstand. Die untersten Banden der Spuren TAF1.2 b, BEG3 c und LFP2.1c liefen im Gel bis zur gleichen Höhe des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053. Bande TAF1.2a hatte einen mit Bande LFP2.1b vergleichbaren Lauf. Spur BEG3 wies mit Bande b eine Bande vor, welche sich auf gleicher Höhe mit der Bande des DSMZ-Stamms *Methanosaeta concilii* DSM2139 befand. Ebenfalls auf gleicher Höhe wurde die Bande BEG4b aufgetrennt, einer weiteren aus dem gleichen Fermenter wie BEG3 stammenden Kultur. Bande BEG3a, BEG4a befanden sich auch auf gleicher Höhe wie auch Bande a der Kultur LFP2.1. Bande LFP2.1a ergab kein Reamplifikat, da der DNA-Gehalt für eine weitere *td*-PCR zu gering war.

Auf separaten Gelen wurden die mit dem Oligonukleotidpaar Ar1000f/ Ar1500rGC amplifizierte 16S rDNA Fragmente der Kulturen HWS2.1 und LFP3.1 mit der DGGE-Methode aufgetrennt.

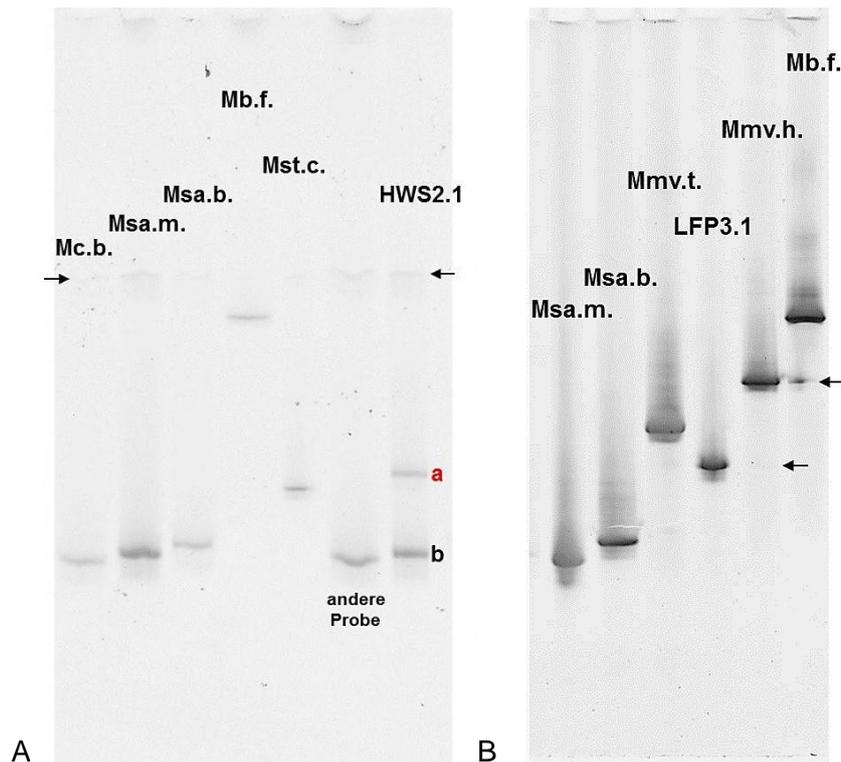


Abbildung 60: DGGE 500 bp großer 16S rDNA-Fragmente aus Kulturen A HWS2.1, *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 (Msa. b.), *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Msa. m.), *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (Mc. b.), *Methanosaeta concilii* DSM2139 (Mst. c.), *Methanobacterium formicum*^T DSM1535 (Mb. f.); Pfeile = separierte Verunreinigung B *Methanomethylovorans* sp. Stamm LFP3.1 (2te Spur rechts), *Methanobacterium formicum*^T DSM1535, *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (Mmv. h.), *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (Mmv. t.), *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 (Msa. b.), *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Msa. m.), Pfeile = aus der linken Nachbartasche übergelaufene Probe; Denaturierender Gradient: 60/40; angefärbt mit einer 7%igen Ethidiumbromidlösung; Buchstaben = zur Sequenzierung versendete Reamplifikate; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Abbildung 60 A zeigt die Auftrennung des 500 bp großen 16S rDNA Amplifikats aus Kultur HWS2.1 im Vergleich zu Amplifikaten verschiedener Typstämme. Bande HWS2.1b wurde zwischen die Höhe der Banden der Typstämme *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 und *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 separiert. Aus der Spur der Kultur HWS2.1 wurde Bande b für die Reamplifizierung zur Sequenzierung ausgeschnitten und die DNA eluiert. Bande a hatte einen zu indiskreten Bereich. Die Abbildung 60 A begrenzenden Pfeile zeigen eine Verunreinigung, welche durch die Methode der DGGE abgetrennt worden ist. In Abbildung 60 B ist die Auftrennung der Kultur LFP3.1 mit unterschiedlichen Typstämmen dargestellt. Die Auftrennungshöhe des einzigen 16S rDNA Fragments aus Kultur LFP3.1 ist nicht mit der Höhe der Banden der angrenzenden Typstämme vergleichbar. Die Pfeile in Abbildung 60 B deuten auf während der Probenauftragung aus der jeweils links gelegenen Tasche gelaufene Probenflüssigkeit, welche während der DGGE mit in die

Spur gezogen worden ist. Aus diesem Grund wurden die daraus entstandenen Teilbanden bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

Die ausgeschnittenen DGGE-Banden der Kulturen sowie der Typstämme wurden eluiert und mit dem Oligonukleotidpaar Ar1000f/ Ar1500r reamplifiziert. Die von extern erhaltenen Sequenzen sind auf der Rohdaten CD unter dem Pfad ‚Molbiol_Analysen\Molbiol_Analysen_Methanogene\DGGE_Methanogene‘ digital dieser Arbeit beigefügt. Die durch Vergleich mit der offenen Datenbank NCBI beziehungsweise mit den Sequenzen der Typstämme erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 48 zusammengefasst.

4.6.3 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen methanogener Archaea

Die oben bereits vorgestellten eigenisolierten Kulturen methanogener Archaea (Tabelle 47) wurden zusätzlich mit dem Oligonukleotidpaar Met86f/ Met1340r amplifiziert. Ein Teil des Amplifikats wurde aufgereinigt und zur Sequenzierung versendet. Die von extern digital erhaltenen Sequenzen sind auf der Rohdaten CD (‚Molbiol_Analysen\Molbiol_Analysen_Methanogene‘) einsehbar. Die verbliebenen Aufreinigungen der 16S rDNA-Amplifikate wurden in gleiche Volumina aufgeteilt und mit den Enzymen HaeII und HaeIII sowie ohne Enzym für eine Restriktion inkubiert. Die so behandelten DNA-Fragmente der methanogenen Kulturen wurde in der Reihenfolge Marker, ungeschnittenes Amplifikat, restringiert mit HaeII und restringiert mit HaeIII in Taschen von 2,5 %igen Agarosegelen aufgetragen und mit Gelelektrophoresen aufgetrennt.

4.6.3.1 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung

Methanobacterium

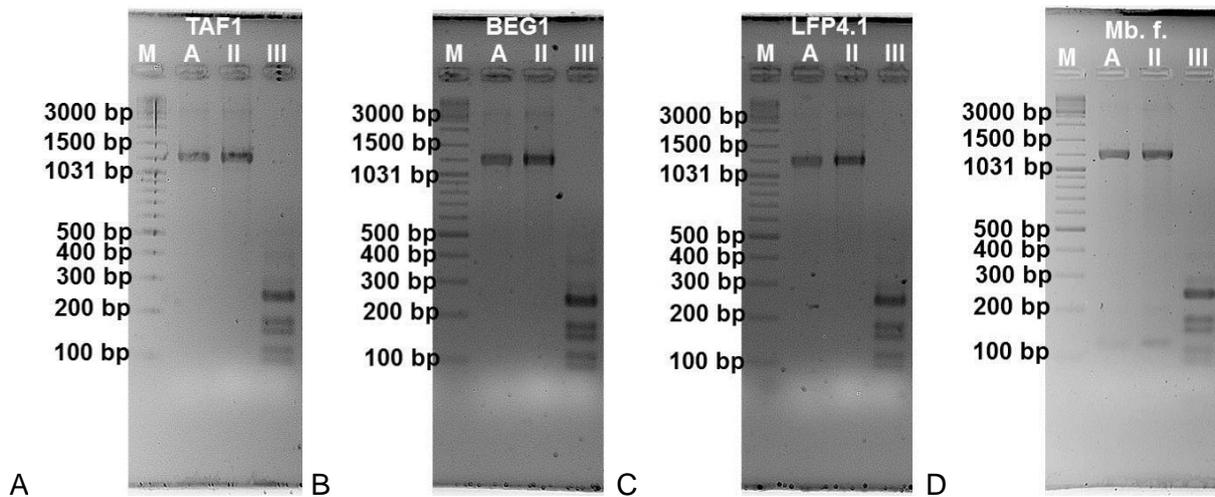


Abbildung 61: RFLP der partiellen 16S rDNA-Fragmente aus den Kulturen methanogener Archaea A TAF1, B BEG1 und C LFP4.1 sowie dem Typstamm *Methanobacterium formicum*^T DSM1535 (D); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp bei D und geschnitten mit jeweils 5 U Haell (II) und HaellIII (III), M = 5 µL GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (0,5 µg/µL, Fermentas); 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Die Bandenmuster der mit dem Oligonukleotidpaar Met86f/ Met1540r partiell amplifizierten Gesamt-16S rDNA aus den Kulturen TAF1, BEG1 und LFP4.1 (Abbildung 61 A, B, C) glichen den Bandenmustern des Typstamms *Methanobacterium formicum*^T DSM1535 (Abbildung 61 D) in Spur II sowie Spur III. Trotz mehrerer Banden im DGGE-Gel (Abbildung 59) zeigten die längeren Fragmente aus den Kulturen TAF1 und BEG1 ein eindeutiges dem Typstamm *Methanobacterium formicum*^T DSM1535 gleichendes Bandenmuster. Das ebenfalls eindeutige Restriktionsmuster des Fragments aus Kultur LFP4.1 bestätigte das Ergebnis der DGGE (Abbildung 59) mit einer einzelnen Bande auf der Höhe des Typstamms *Methanobacterium formicum*^T DSM1535.

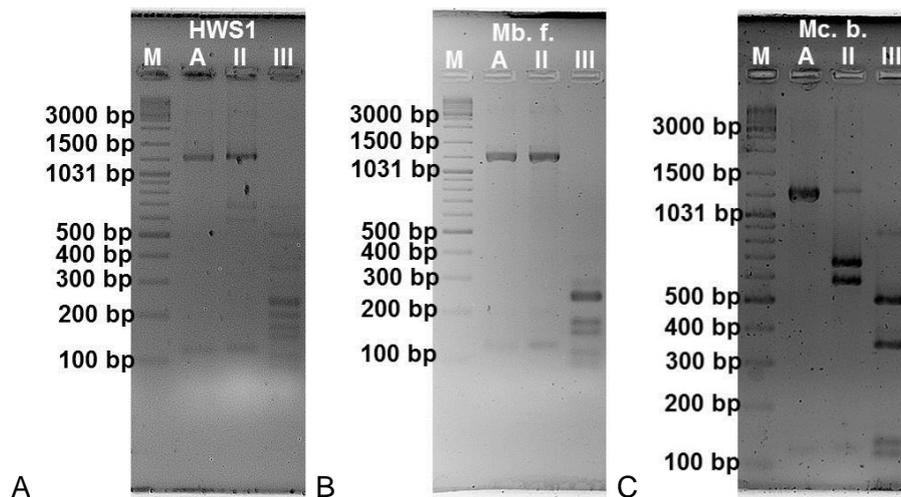


Abbildung 62: RFLP der partiellen 16S rDNA-Fragmente aus der Kultur methanogener Archaea A HWS1 sowie den Typstämmen *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (C) und *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (C) zum Vergleich; 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp außer bei B und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 5 µL GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (0,5 µg/µL, Fermentas); 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Die in Abbildung 62 A gezeigten Bandenmuster aus der methanogenen Kultur HWS1 wiesen in der Spur II und bis auf die zusätzliche Bande bei 200 bp in Spur III Übereinstimmungen der stärkeren Banden mit dem Typstamm *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (Abbildung 63 C) auf. Die helleren Banden in den Spuren II und III entsprachen dem Restriktionsmuster des Typstamms *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (Abbildung 63 D). Daher wurde diese Kultur in Minimalmedium 287 (Seite 84) ohne Reaktorfiltrat kultiviert, um *Methanobacterium* zu isolieren (siehe dazu Abbildung 36 B und Tabelle 31) und zum anderen in Medium 287 mit Acetat kultiviert um *Methanoculleus* anzureichern.

4.6.3.2 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung

Methanoculleus

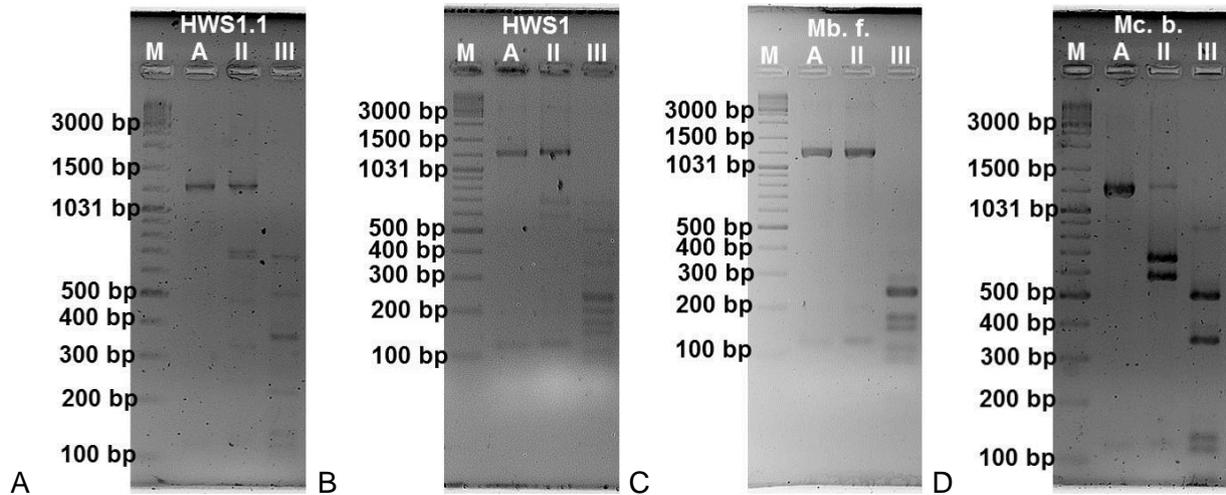


Abbildung 63: RFLP der Amplifikate aus der Kultur methanogener Archaea HWS1.1 (A), zum Vergleich HWS1 (B) sowie den Typstämmen *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (C) und *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (D) zum Vergleich; 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp außer bei B und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 5 µL GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (0,5 µg µL⁻¹, Fermentas); 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Das Bandenmuster der aus Kultur HWS1 entstandenen Kultur HWS1.1 zeigte mehr Banden, die mit dem Typstamm *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 übereinstimmten (Abbildung 63 A). Allerdings waren in Spur II wie in Spur III weitere Banden auf der Höhe von 700 bp zu sehen, die zu keinem der restringierten Typstämme passten. Die in Abbildung 63 D entstandene etwas größere Bande als die Markerbande 1200 bp in der Spur II des Typstamms *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 rührte vom nur partiellen Verdau des Restriktionsenzym HaeII aufgrund von zu hohem DNA-Gehalt in der Probe.

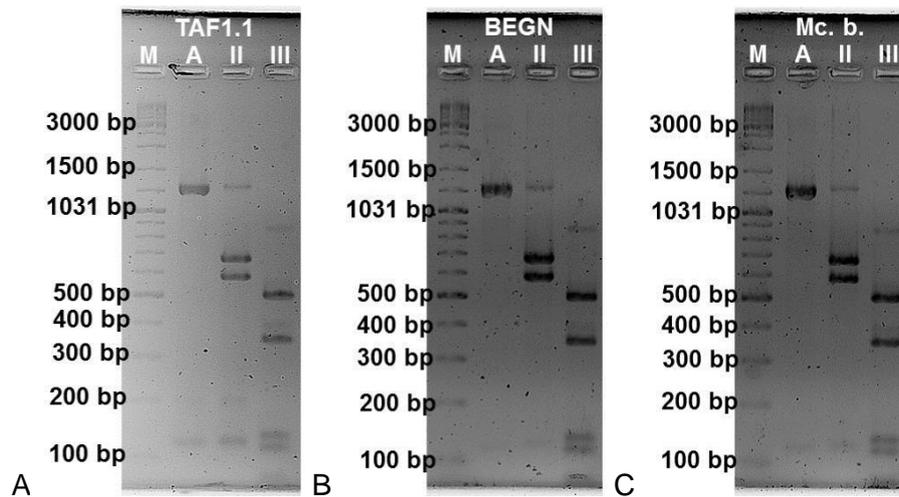


Abbildung 64: RFLP der Amplifikate aus den Kulturen methanogener Archaea A TAF1.1 B GEGN sowie dem Typstamm *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (C); 10 µL Plasmid-Amplifizierungsprodukt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Die Bandenmuster der Kulturen TAF1.1 (Abbildung 64 A) und BEGN, einer methanogenen Kultur aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glahn, (Abbildung 64 B) stimmten mit dem Muster des Typstamms *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 (Abbildung 64 C) exakt überein. Dieses Ergebnis bestätigte die Laufweite der einzigen Bande der Kultur TAF1.1 im DGGE-Gel (Abbildung 59), die vergleichbar weit wie die Bande des Typstamms *Methanoculleus bourgensis*^T DSM3045 aufgetrennt wurde.

4.6.3.3 Artspezifische Identifizierung eigenisolierter Kulturen der Gattung

Methanosarcina

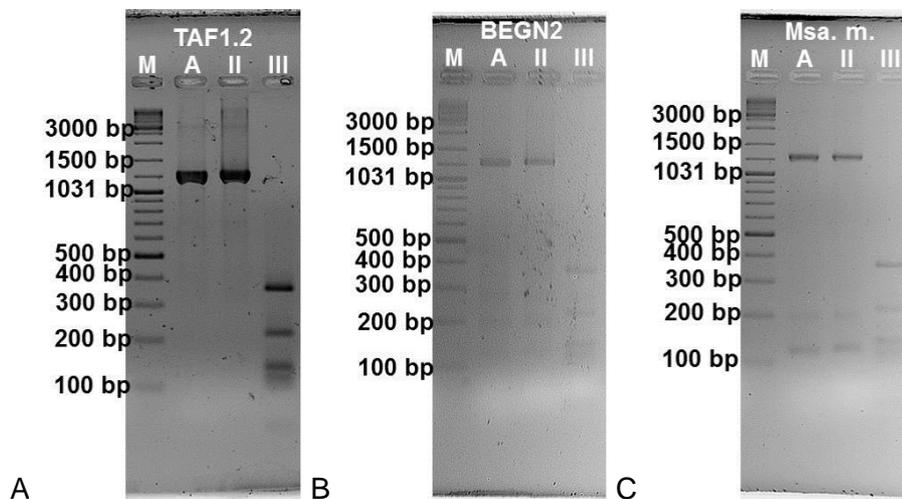


Abbildung 65: RFLP der Amplifikate aus den Kulturen methanogener Archaea A TAF1.2, B BEGN2 im direkten Vergleich mit dem Muster des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (B); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp außer bei A und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Das Bandenmuster des Eigenisolats TAF1.2 in Spur III der Abbildung 65 A entsprach dem Muster der Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Abbildung 65 C), wobei aufgrund eines höheren DNA-Gehalts in der Probe noch eine weitere Bande unter 100 bp zu sehen war. Aus dem gleichen Grund bildete sich in den Spuren ein gleichmäßiger Schatten aus, besonders in Spur II zu sehen. Aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glahn wurde eine weitere methanogene Kultur isoliert, BEGN2. Die RFLP dieser Kultur (Abbildung 65 B) wies ebenfalls das gleiche Bandenmuster auf wie der Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Abbildung 65 C).

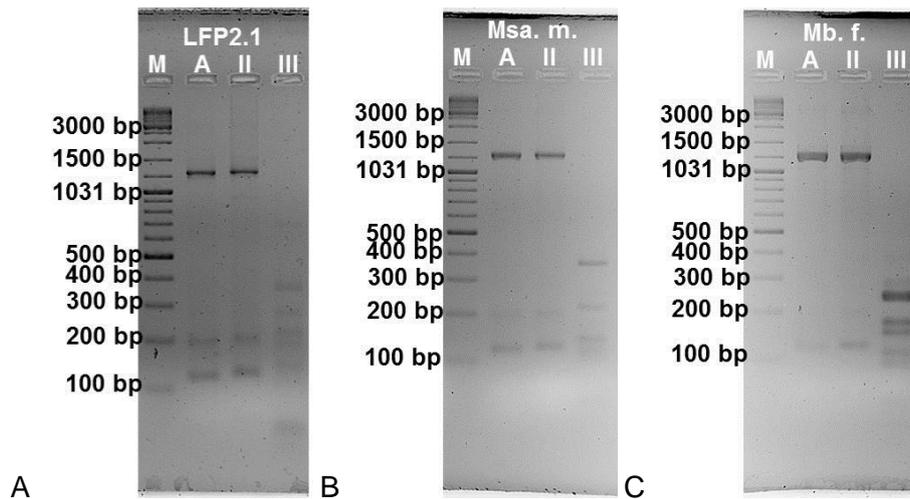


Abbildung 66: RFLP der Amplifikate aus der Kultur methanogener Archaea A LFP2.1 im Vergleich zu dem Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (B) und *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (C); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Die RFLP der Kultur LFP2.1 (Abbildung 66 A) aus einem mesophilen Laborfermenter hatte die größte Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Abbildung 66 B). Allerdings zeichnete sich auch ein weiteres schwaches Bandenmuster ab, das dem Typstamm *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 ähnelte. Dieses nicht eindeutige Bandenmuster sowie die zwei Banden in der DGGE (Abbildung 59) deuteten darauf hin, dass zum Zeitpunkt der durchgeführten DGGE und RFLP 16S rDNA mit unterschiedlichen Basenfolgen in dieser Kultur vorlagen.

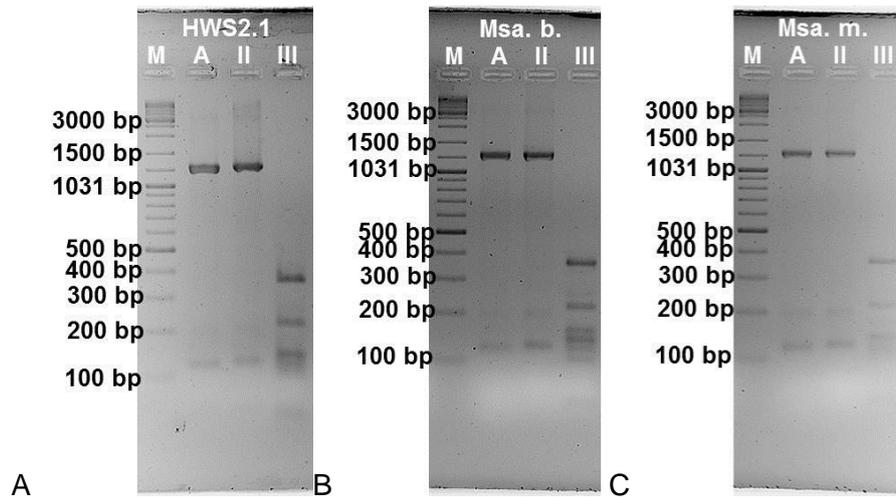


Abbildung 67: RFLP der Amplifikate aus der Kultur methanogener Archaea A HWS2.1 sowie den Typstämmen *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 (B) und *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (C); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Das in Abbildung 67 A dargestellte Bandenmuster des 16S rDNA Fragments aus Kultur HWS2.1 in Spur III glich der Bandenverteilung des Musters von Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (Abbildung 67 C) allerdings mit den Bandenstärken des Typstamms *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 (Abbildung 67 B). Die Banden in den Spuren II haben die gleiche Größe wie die nicht restringierte DNA in den Spuren A (Abbildung 67 A, B, C).

4.6.3.4 Artspezifische Identifizierung einer eigenisolierten Kultur der Gattung *Methanosaeta*

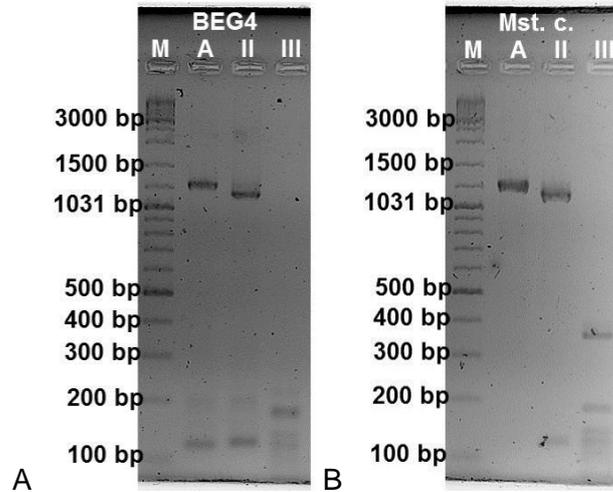


Abbildung 68: RFLP der -Amplifikate aus der Kultur methanogener Archaea A BEG4 sowie dem DSMZ-Stamm *Methanosaeta concilii* DSM2139 (B); 10 μ L Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und 100 bp und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 μ g GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Abbildung 68 zeigt das Bandenmuster der Kultur BEG4 (A) im Vergleich zu dem DSMZ-Stamm *Methanosaeta concilii* DSM2139. Außer der fehlenden Bande auf der Höhe von etwa 350 bp entsprach das Muster der Spur III dem des DSMZ-Stamms *Methanosaeta concilii* DSM2139.

4.6.3.5 Artspezifische Identifizierung einer eigenisolierten Kultur der Gattung

Methanomethylovorans

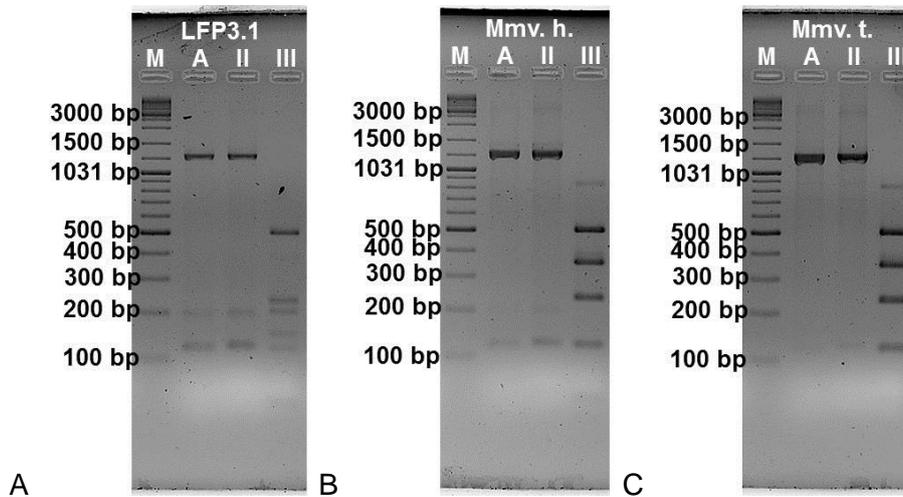


Abbildung 69: RFLP der Amplifikate aus der Kultur methanogener Archaea A LFP3.1 und die Typstämme *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (B), *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (C); 10 µL Plasmid-Amplifizierungs-Produkt ungeschnitten (A) mit Artefaktbanden bei 200 bp und knapp über 100 bp und geschnitten mit jeweils 5 U HaeII (II) und HaeIII (III), M = 2,5 µg GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331; 2,5 %iges Agarosegel mit 0,1 % einer 0,035 %igen Natronwasserglaslösung, angefärbt mit einer 7 %igen Ethidiumbromidlösung; Fotografie in Graustufen, Farben invertiert.

Spur III in Abbildung 69 A zeigt Banden auf der Höhe von 500 bp, knapp über 200 bp sowie 100 bp, die den Banden der Typstämme *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (Abbildung 69 B), *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (Abbildung 69 C) entsprachen. Die Spuren von HaeIII verdauter 16S rDNA der Typstämme zeigten jeweils eine Bande bei zwischen 800 bp und 900 bp. Diese Bande entstand durch partielle Restriktion aufgrund zu großer Mengen DNA in den Ansätzen. Da weniger DNA in den Ansätzen der 1155 bp langen Fragmente aus Kultur LFP3.1 enthalten war, entstand kein Restriktionsfragment zwischen den Markierungen 800 bp und 900 bp (Abbildung 69 A). Offenbar existierte keine Schnittstelle, die ein Restriktionsfragment mit einer vergleichbaren Länge ergab (multiple Alignment, siehe Abbildung 144). Vermutlich gründeten die Banden auf der Höhe von 200 bp und bei etwa 150 bp (Abbildung 69 A) auf einer für HaeIII schnittstellenbringenden Mutation der 16S rDNA aus Kultur LFP3.1 und somit keine Bande zwischen den Markierungen 300 bp und 400 bp in dem Eigenisolat existierte (siehe dazu Abbildung 71).

4.6.4 Zusammenfassung der identifizierten eigenisolierten methanogenen Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen

Die aufgereinigten Fragmente methanogener Gesamt-16S rDNA wurden an externe Firmen versendet, um von ihnen Sequenzierungen durchführen zu lassen. Die erhaltenen Sequenzen befinden sich in der Rohdaten CD ‚Molbiol_Analysen\Molbiol_Analysen_Methanogene‘ beziehungsweise ‚... \DGGE_Methanogene‘. Im Folgenden sind die Ergebnisse der paarweisen Alignierungen mit den Sequenzen der NCBI-Datenbank nach NawaRo-BGA's geordnet aufgeführt und erläutert.

Tabelle 48: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente aus den Reinkulturen methanogener Archaea aus den Fermentern der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (TAF)

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
TAF1	-	<i>Methanobacterium formicicum</i> ^T DSM1535	795 ¹ (793/1/976) ²	99
	TAF1a	<i>Methanobacterium formicicum</i> ^T DSM1535	318 ¹ (317/0/318) ²	99
	TAF1b	<i>Methanobacterium formicicum</i> ^T DSM1535	318 ¹ (315/0/315) ²	100
	TAF1c	<i>Methanobacterium formicicum</i> ^T DSM1535	358 ¹ (334/0/335) ²	99
TAF1.1	-	<i>Methanoculleus bourgensis</i> ^T DSM3045	491 ¹ (478/0/484) ²	99
	TAF1.1	<i>Methanoculleus bourgensis</i> ^T DSM3045	370 ¹ (278/0/278) ²	100
TAF1.2	-	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	872 ¹ (867/1/868) ²	99
	TAF1.2a	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	363 ¹ (323/0/324) ²	99
	TAF1.2b	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	365 ¹ (327/0/327) ²	100

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Die Identifizierungsergebnisse lieferten die Sequenzen der archaealen 16S rDNA Fragmente aus den Kulturen TAF1, TAF1.1 und TAF1.2 aus dem Fermenter der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (Tabelle 48). Die unterschiedlichen DGGE-Banden in Spuren der Kulturen TAF1 und TAF1.2 resultierten vermutlich durch Punktmutationen in einzelnen Fragmenten, welche nicht in den

digital erhaltenen Sequenzen liegen (multiple Alignierung TAF1a-c siehe Abbildung 141). Für Kultur TAF1.2 lieferten die Sequenzen die bereits angenommene Punktmutation.

```
TAF1.2a_Ar1000f      CTTCGTGCCCGTGTTCGAACCTGTGCTTTGCAAGGGGGGTTAAGTCGTACCAG 363
TAF1.2b_Ar1000f      CTTCGTGCCCGTGTTCGAACCTGTGCTTTGCAAGGGGGGTTAAGTCG-ACCAG 365
Ms.mazeiT_DSM2053    CTTCGTGCCCGTGT----- 373
** *****
```

Abbildung 70: Ausschnitt aus der multiplen Alignierung (Abbildung 142) der partiellen DGGE-Sequenzen a und b aus Kultur TAF1.2 mit dem Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053; Zeile der Punktmutation in partieller Sequenz TAF1.2a hellgrün markiert.

In einer multiplen Alignierung der DGGE-Sequenzen aus Kultur TAF1.2 (Abbildung 142) wurde eine Punktmutation zwischen zwei Pyrimidin-Basen von Thymin zu Cytosin ermittelt (Abbildung 70). Diese Punktmutation war vermutlich an dem im Vergleich zu den Fragmenten mit den Sequenzen TAF1.2b und des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 kürzeren Lauf im DGGE-Gel (Abbildung 59) beteiligt.

Die partiellen Sequenzen erreichten Übereinstimmungen von 99 bis 100 % und wurden somit der jeweilig gleichen Art zugeordnet. Wachstumstests mit unterschiedlichen Substraten (Tabelle 31) und fluoreszenzmikroskopische Überprüfungen (TAF1: Abbildung 36 A, TAF1.1: wie Abbildung 38, TAF1.2: Abbildung 39 A) bestätigten die Sequenzierungsergebnisse. Diese Kulturen aus der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR waren somit eigenisierte archaeale Reinkulturen. Die Sequenzen der partiellen 16S rDNA wurden daher in die NCBI-Datenbank eingetragen (TAF1: AN JN243315, TAF1.1: AN JN243316, TAF1.2: AN JN243317).

Tabelle 49: Molekularbiologisch analysierte Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente aus der eigenisierten methanogenen Kultur HWS1 und Reinkultur HWS2.1 aus den Fermentern der BGA Hubert Wagner und Sohn GbR (HWS)

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
HWS1	-	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	968 ¹ (966/1/969) ²	99
	HWS1a	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	370 ¹ (348/1/349) ²	99
	HWS1b	<i>Methanoculleus bourgensis</i> ^T DSM3045	359 ¹ (265/0/266) ²	99
HWS2.1	-	<i>Methanosarcina barkeri</i> ^T DSM800	839 ¹ (824/1/838) ²	98
		<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	(825/5/842) ²	
	HWS2.1	<i>Methanosarcina barkeri</i> ^T DSM800	356 ¹ (346/2/352) ²	98

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Die Sequenzierungsergebnisse der Fragmente aus dem DGGE Gel (Abbildung 59) bestätigten die RFLP der Kultur HWS1 (Abbildung 63 A), dass es sich bei dieser Kultur um eine Mischkultur der Arten *Methanobacterium formicicum* (Abbildung 63 C) und *Methanoculleus bourgensis* (Abbildung 63 D) handelte. Trotz dieses Umstands lieferte die 1254 bp lange Sequenz aus Kultur HWS1 die höchste Übereinstimmung mit dem Typstamm *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 (Tabelle 49). Dieser Mikroorganismus war somit die vorherrschende Art in der Kultur, welche mit fortgeführter Kultivierung in Minimalmedium rein isoliert wurde. In dieser Dissertation wurde mit Kultur HWS1.1 keine erneute molekularbiologische Analyse durchgeführt, da regelmäßige fluoreszenzmikroskopische Kontrollen eine stetig sinkende Kontamination mit fluoreszierenden Stäbchen bis zum Abschluss der praktischen Arbeiten zeigten. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Laufweite im DGGE-Gel (Abbildung 60 A) und der RFLP (Abbildung 67 A) war das Sequenzierungsergebnis der aus dem 1254 bp langen Fragment erhaltenen partiellen Sequenz der vorderen 2/3 der 16S rDNA aus der Kultur HWS2.1. Die Identität der Kultur lag zwischen zwei der Gattung *Methanosarcina* zugeordneten Arten mit gleicher prozentualer Übereinstimmung (Tabelle 49). Die 500 bp lange Sequenz aus dem DGGE-Gel (Abbildung 60 A) schloss auf, dass es sich bei dem methanogenen Archaeon in Kultur HWS2.1 um die Art *Methanobacterium barkeri* handelte, da die Basenfolge des letzten Drittels der 16S rDNA im Vergleich zu den ersten 2 Dritteln weniger konserviert war. Die Sequenzen der partiellen 16S rDNA wurden in die NCBI-Datenbank eingetragen (HWS1: AN JN24318, HWS2.1: AN JN243319), da sowohl die Überprüfung mit dem Fluoreszenzmikroskop (HWS1: Abbildung 36 B, HWS2.1: Abbildung 40 A) als auch die Substrattests die erwarteten Wachstumsverhalten ergaben (Tabelle 31).

Tabelle 50: Sequenzierungsergebnisse der 16S rDNA-Fragmente aus den eigenisolierten Reinkulturen BEG1, BEG3, BEG4 aus dem Fermenter und eigenisolierten Kulturen BEGN und BEGN2 aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glan (BEG)

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
BEG1	-	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	356 ¹ (346/2/352) ²	99
	BEG1a	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	328 ¹ (318/1/321) ²	99
	BEG1b	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	316 ¹ (305/0/308) ²	99
	BEG1c	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	354 ¹ (333/0/334) ²	99
BEG3	-	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	864 ¹ (862/0/862) ²	100
	BEG3a	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	354 ¹ (343/0/348) ²	99
	BEG3b	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	355 ¹ (313/3/316) ²	99
	BEG3c	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	356 ¹ (314/2/316) ²	99
BEG4	-	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	408 ¹ (398/2/408) ²	98
	BEG4a	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	356 ¹ (342/0/348) ²	98
	BEG4b	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	357 ¹ (347/0/351) ²	99
	BEG4c	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	354 ¹ (342/2/350) ²	98
BEGN	-	<i>Methanoculleus bourgensis</i> ^T DSM3045	604 ¹ (597/0/598) ²	99
BEGN2	-	<i>Methanosarcina siciliae</i> ^T DSM3028	752 ¹ (745/0/752) ²	
	-	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	(743/0/752) ²	99
	-	<i>Methanosarcina barkeri</i> ^T DSM800	(736/0/747) ²	

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge

Die Sequenzen der DGGE Fragmente aus Kultur BEG1 (Tabelle 50) zeigten, dass es sich bei den drei unterschiedlich separierten Banden um Mutationen der 16S rDNA derselben Art handelte, wie bei Kultur TAF1 (Tabelle 48). Die DGGE Bande BEG3a (Abbildung 59) aus der Kultur BEG3 wurde der Art *Methanosaeta concilii* mit höchster Übereinstimmung zugeordnet. Die Identifizierungen des 1254 bp langen Fragments aus Kultur BEG3 und der anderen beiden 500 bp zeigten, dass die hauptsächlich in dieser Kultur existierende Art *Methanobacterium mazei* war, was die geringe Stärke der Bande BEG3a im DGGE-Gel (Abbildung 59) bestätigte. Die Sequenzierungsergebnisse der Kultur BEG4 ergaben eindeutig, dass diese Kultur eine Reinkultur der Art *Methanosaeta concilii* war. Kultur BEGN aus dem Nachgärer der BGA BioEnergie Glahn wurde eindeutig als ein Stamm der Art *Methanoculleus bourgensis* identifiziert. Bei der ebenfalls aus dem Nachgärer der BGA stammenden Kultur BEGN2 wurde die Sequenz mit prozentual nicht differenzierbaren Unterschieden dem Typstamm *Methanosarcina siciliae*^T DSM3028 zugeordnet.

Sowohl fluoreszenzmikroskopisch (BEG1: Abbildung 36 C, BEG3: Abbildung 39 B, BEGN: Abbildung 38) als auch im Substrattest (Tabelle 31) wurden Eigenschaften der jeweiligen methanogenen Archaea ermittelt. Die Sequenzen der partiellen 16S rDNA der Stämme BEG1 (AN JN243320), BEG3 (AN JN243321), BEG4 (AN JN243322), BEGN (AN JX943602) und BEGN2 (AN JX943603) worden somit auch in die NCBI-Datenbank eingetragen, da es sich bei diesen eigenisolierten Kulturen um Reinisolate handelte. Die Sequenz der Kultur BEGN2 wurde nicht in die NCBI-Datenbank eingetragen, da weitere molekularbiologische Analysen mit der gesamten 16S rDNA durchgeführt werden müssen, um die Art der eigenisolierten Kultur BEGN2 eindeutig zu bestimmen.

Tabelle 51: Sequenzierungsergebnisse der archaealen 16S rDNA-Fragmente aus den eigenisolierten Reinkulturen LFP3.1 und LFP4.1 aus einem thermophilen Laborfermenter und der eigenisolierten Kultur LFP2.1 aus einem mesophilen Laborfermenter

Kultur	DGGE Bande	Bemerkung	Sequenzlänge [bp]	%
LFP2.1	-	<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	317 ¹ (312/0/317) ²	98
		<i>Methanosarcina barkeri</i> ^T DSM800	(312/0/317) ²	
LFP2.1a		kein Reamplifikat	n. a.	n. a.
LFP2.1b		<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	359 ¹ (313/1/315) ²	99
LFP2.1c		<i>Methanosarcina mazei</i> ^T DSM2053	359 ¹ (314/1/315) ²	99
LFP3.1	-	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> ^T DSM15978	994 ¹ (974/1/995) ²	98
LFP3.1		<i>Methanomethylovorans hollandica</i> ^T DSM15978	358 ¹ (347/1/354) ²	98
		<i>Methanomethylovorans thermophila</i> ^T DSM17232	(347/1/354) ²	
LFP4.1	-	<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	965 ¹ (963/1/966) ²	99
LFP4.1		<i>Methanobacterium formicum</i> ^T DSM1535	366 ¹ (330/0/330) ²	100

¹Gesamtsequenzlänge; ²Übereinstimmung/Lücken/verglichene Sequenzlänge; n. a.: nicht auswertbar

Aus dem mesophilen Laborfermenter (Klocke *et al.* 2007, 2009 a, b, Nettmann *et al.* 2010) wurde die Kultur LFP2.1 isoliert. Die Sequenz der ersten zwei Drittel dieser Kultur zeigte die gleich Übereinstimmung mit den Typstämmen *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 und *Methanosarcina barkeri*^T DSM800. Die Sequenzen der 500 bp langen Fragmente aus dem DGGE-Gel (Abbildung 59) ermöglichten eine eindeutige Zuordnung der Kultur LFP2.1 zum Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053, da diese Sequenz den hinteren, weniger konservierten Bereich der 16S rDNA kodierte. Aufgrund von fluoreszenzmikroskopisch erkennbaren Kontaminationen der Kokken mit fluoreszierenden Stäbchen (nicht gezeigt) und dem nicht eindeutigen Bandenmuster der RFLP (Abbildung 66 A), wurde die Sequenz der Kultur LFP2.1 in dieser Arbeit nicht in die NCBI-Datenbank eingetragen, auch wenn die Substrattests (Tabelle 31) ein Wachstumsverhalten wie die Gattung *Methanosarcina* zeigten. Bei Kultur LFP3.1 aus einem thermophil betriebenen Laborfermenter führte die Sequenz der ersten zwei Drittel im Gegensatz zu den Identifizierungen der Kulturen HWS2.1 (Tabelle 48) und LFP2.1 der 16S rDNA zu einer eindeutigen Zuordnung des

reinkultivierten Mikroorganismus zum Typstamm *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 (Lomans *et al.* 1999). Die Sequenz des einzigen Fragments aus dem DGGE-Gel (Abbildung 60 B) enthielt eine Kodierung, die den gleichen Abstand zu den beiden bekannten Typstämmen der Gattung *Methanomethylovorans* einnahm, was die andere Laufweite des DNA Fragments erklärte. Folgend ist ein Ausschnitt der multiplen Alignierung (siehe Abbildung 144) der Sequenzen aus verschiedenen Fragmenten der 16S rDNA aus Kultur LFP3.1 mit den partiellen Sequenzen der Typstämme *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 und *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 gezeigt. Mit Sequenz ‚LFP3.1_Ar1000f_1‘ wurde die Identifizierung des Mikroorganismus anhand der NCBI-Datenbank (Tabelle 51) durchgeführt.

```

                                     HaeIII
LFP3.1_Ar1000f_2                    -CTG-----GGGACAATGGGCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 41
LFP3.1_Ar1000f_1                    GGTACAATGACTGGGACAATGGGCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 145
LFP3.1_Ar1000f                      GGTACAATGACTGGGACAATGGGCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 141
Mmv.hollandicaT_DSM15978            GGTACAATGACTGGGACAATGGGCTCCTACCCCGAAAGGGGATGGTAATC 1200
Mmv.thermophilaT_DSM17232          GGTACAATGACTGGGACAATGGGCTCCTACCCCGAGAGGGGATGGTAATC 1143
LFP3.1_Met86f                      -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl           GGTACAATGACTGGGACAATGGGCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 183
** .                               ***** .***** .***** *****

```

Abbildung 71: Ausschnitt aus der multiplen Alignierung (Abbildung 144) der Sequenzen aus Reinkultur LFP3.1 mit den Typstämmen *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 und *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232; durch Punktmutation entstandene Schnittstelle für HaeIII in den Sequenzen aus Kultur LFP3.1 hellgrün markiert.

Die multiple Alignierung der 16S rDNA Sequenzen aus Kultur LFP3.1 mit den in der NCBI-Datenbank hinterlegten partiellen 16S rDNA Sequenzen der bekannten Typstämme des Genus *Methanomethylovorans* zeigte eine Punktmutation in der Basenfolge der Sequenzen der Kultur LFP3.1 auf (Abbildung 71). Diese Punktmutation hatte zur Folge, dass das Restriktionsenzym HaeIII eine weitere Schnittstelle erhielt, die zwei 205 bp und 182 bp große Fragmente hervorrief (Abbildung 69 A). Mithilfe der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz des Typstamms *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 wurden die Restriktionsfragmentlängen der Typstämme sowie des Fragments aus Kultur LFP3.1 ermittelt. Mit den erhaltenen Sequenzen der partiellen archaealen 16S rDNA wurde nicht aufgeklärt, welche Mutationen in den Fragmenten für die unterschiedlichen Laufweiten in den DGGE-Gelen (Abbildung 59 und Abbildung 60 A, B) verantwortlich waren.

Die Sequenz LFP3.1 wurde in die NCBI-Datenbank als *Methanomethylovorans* sp. (AN JN566058) eingetragen, da der Unterschied der 16S rDNA zu den beiden bekannten Arten der Gattung *Methanomethylovorans* für eine Bestimmung einer neuen Art zu gering war.

Tabelle 52: Schnittstellen des Enzyms HaeIII in der partiellen 16S rDNA der Reinkultur LFP3.1 und daraus resultierende Restriktionsfragmentlängen, ermittelt anhand der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz des Typstamms *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978

Schnittstellen LFP3.1	Restriktions- fragmentlänge	Schnittstellen DSM 15978	Restriktions- fragmentlänge
61 ¹		61 ¹	
>	231	>	231
292		292	
>	120	>	120
412		412	
>	41	>	41
453		453	
>	12	>	12
465		465	
>	503	>	503
968		968	
>	205		
1137		>	351
>	182		
1319 ²		1319 ²	

¹Sequenz des Oligonukleotids Met86f bei 61 bp des ungeschnittenen Fragments,

²Erkennungssequenz des Oligonukleotids Met1340r bei 1319 bp (siehe multiple Alignierung in Abbildung 144)

Die in Tabelle 52 aufgeführten, anhand der Sequenz des in der NCBI-Datenbank hinterlegten Typstammes *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 berechneten Restriktionsfragmentlängen stimmten mit den in Abbildung 69 A-C dargestellten Mustern im Vergleich zum Längenmarker überein.

4.6.5 Phylogenetische Stammbäume bakterieller und archaealer 16S rDNA anaerober Mikroorganismen

Phylogenetische Stammbäume geben visuell Aufschluss über die Beziehungen von Mikroorganismen untereinander innerhalb eines Systems wie syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen beziehungsweise methanogenen Archaea aus NawaRo-BGA's (Tabelle 18). Mit den durch molekularbiologischen Methoden erhaltenen Sequenzen (Kapitel 4.5) wurden multiple Alignierungen mit einer Auswahl in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen und einem entfernten Mikroorganismus als *out-group* durchgeführt, um auch kleine Unterschiede in den Sequenzen herauszuheben. Dafür wurde in dieser Dissertation das JavaScript unterstützte *online tool* ClustalW2 (EBI, UK) genutzt. Alignierungspositionen, die mit weniger als 50 % durch Sequenzen belegt waren, wurden manuell aus der Alignierung eliminiert (50 % Gewichtung). Für die Berechnung der Stammbäume wurde die *Software* Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA) verwendet. Stammbäume wurden mit der Methode *Maximum Parsimony* (Sober 1983) berechnet. Zur statistischen Absicherung wurden *Bootstrap*-Analysen (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979) durchgeführt, welche in % an den Verzweigungen angegeben sind. Jeweils 100 Baumkonstruktionen wurden dafür berechnet.

4.6.5.1 Phylogenetische Stammbäume partieller 16S rDNA von Bakterien aus syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen

Multiple Alignierungen mit den Oligonukleotidpaarungen Eubac5/Eubac3 beziehungsweise BSF8/BSR1541 reamplifizierten ersten zweidritteln der 16S rDNA Sequenzen aus den propionsäureabbauenden Mischkulturen Fp1a, Wp2a, Gp1 und Ap1a beziehungsweise deren Unterkulturen und einer Auswahl in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen durchgeführt, auf welche die Zuordnungen der bakteriellen Klon-Sequenzen fielen. Den Alignierungen partieller bakterieller 16S rDNA Sequenzen wurde die in der NCBI-Datenbank hinterlegten 16S rDNA Sequenz von *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 zugefügt (*out-group*), um die Beziehung nah verwandter Sequenzen herauszuheben.

4.6.5.1.1 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1 stammenden Bakterien

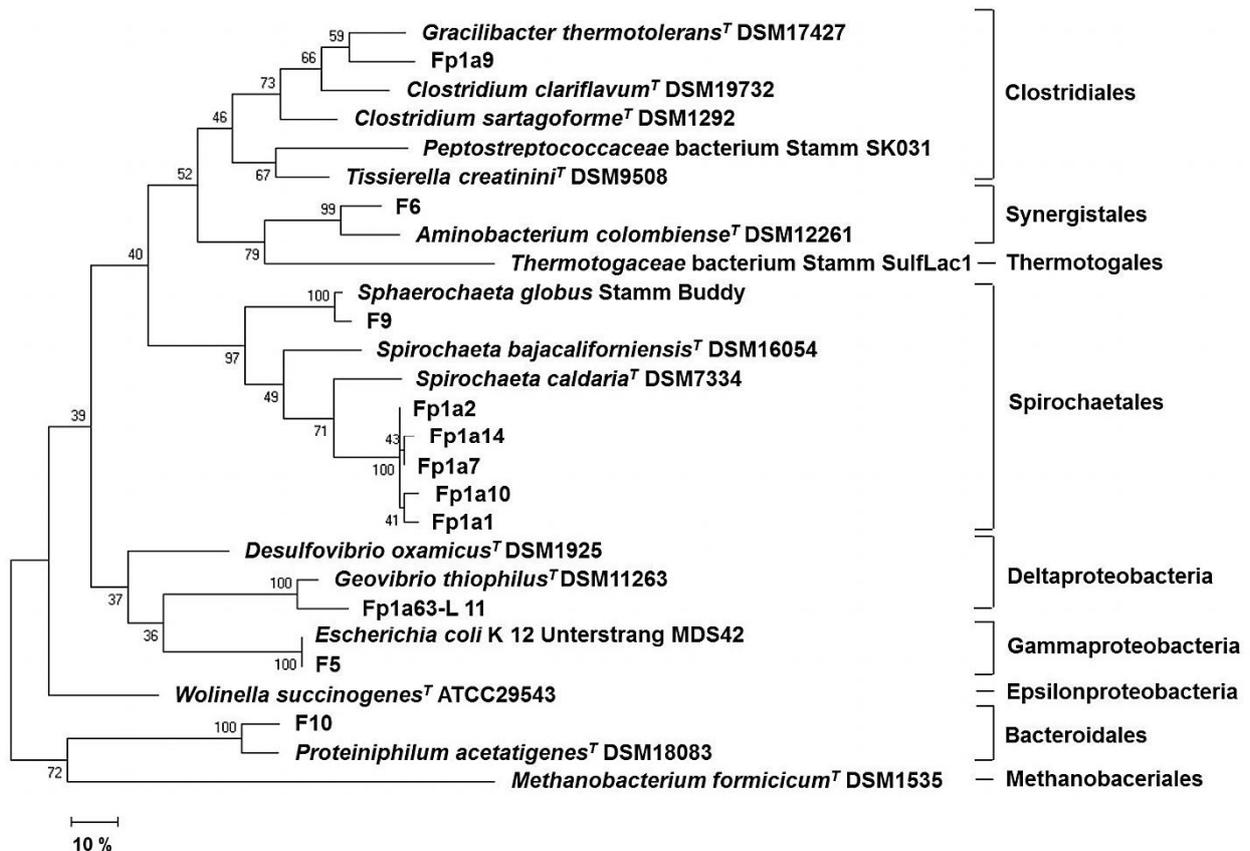


Abbildung 72: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen mit unterschiedlichen Restriktionsmustern aus der bakteriellen Gesamt-DNA der propionsäureabbauenden Mischkultur Fp1a und dessen Unterkulturen aus der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR und in der NCBI-Datenbank hinterlegte Sequenzen; multiple Alignment: *online tool* ClustaW2 (EBI, UK); Phylogenie Software: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

In der propionsäureabbauenden Kultur Fp1a wurde mit den ersten zweidritteln der partiellen bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen phylogenetisch (Abbildung 72) herausgehoben, dass in dieser Anreicherungskultur Vertreter der Ordnungen Clostridiales, Synergistales, Spirochaetales und Bacteroidales sowie der Klassen Delta- und Gammaproteobacteria lebten. Das zuvor erhaltene Ergebnis der sequenziell im gesamten Fermenter dominierenden Ordnung Clostridiales beziehungsweise des Phylums Firmicutes (Tabelle 32) wurde durch die molekularbiologischen Analysen der Mischkultur (Klone Fp1a1 bis Fp1a14, Abbildung 72) bestätigt und unter anderem durch die Analysen der Unterkulturen (Klone F5 bis F10 und Klon Fp1a63-L 11, Abbildung 72) erweitert. Der reinkultivierte zur Ordnung der Bacteroidales zugehörige Vertreter *Proteiniphilum*

acetatigenes Stamm Fp1a520 (Tabelle 46) wurde ebenfalls nicht mit den Oligonukleotidpaarungen BSF8/ BSR1541 erfasst.

4.6.5.1.2 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp2 stammenden Bakterien

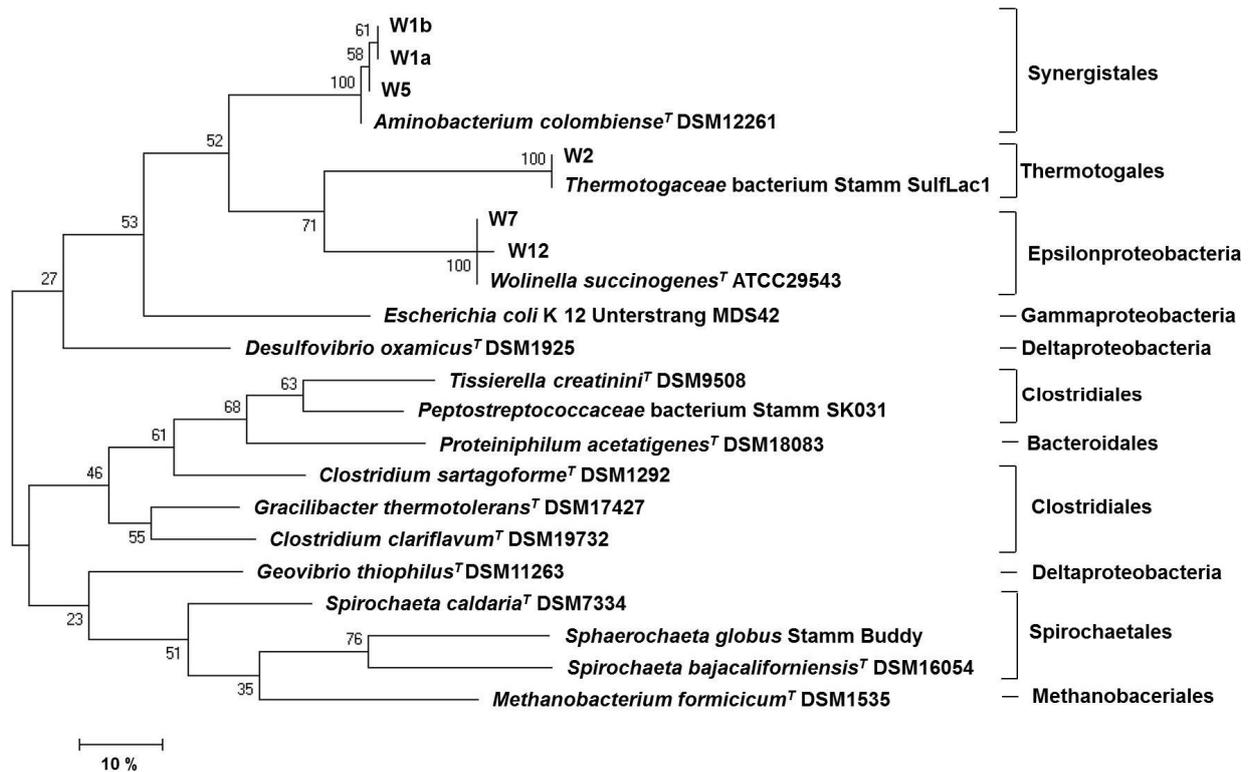


Abbildung 73: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen mit unterschiedlichen Restriktionsmustern aus der Gesamt-DNA der Unterkultur Wp2a1264 aus der BGA Hubert Wagner und Sohn GbR und in der NCBI-Datenbank hinterlegte Sequenzen; multiple Alignierung: *online tool* ClustaW2 (EBI, UK); Phylogenie Software: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

Obwohl durch die molekularbiologische Analyse der bakteriellen 16S Gesamt-rDNA des Fermenters Hubert Wagner & Sohn GbR (Tabelle 32) eine Klon-Sequenz des Genus *Clostridium* identifiziert wurde, enthielt Unterkultur Wp2a1264 aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Wp2a keine Mikroorganismen der Ordnung Clostridiales (Abbildung 73). Stattdessen wurden Arten der Ordnungen Synergistales und Thermotogales sowie der Klasse der Epsilonproteobacteria (Tabelle 40) angereichert.

4.6.5.1.3 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Gp1 stammenden Bakterien

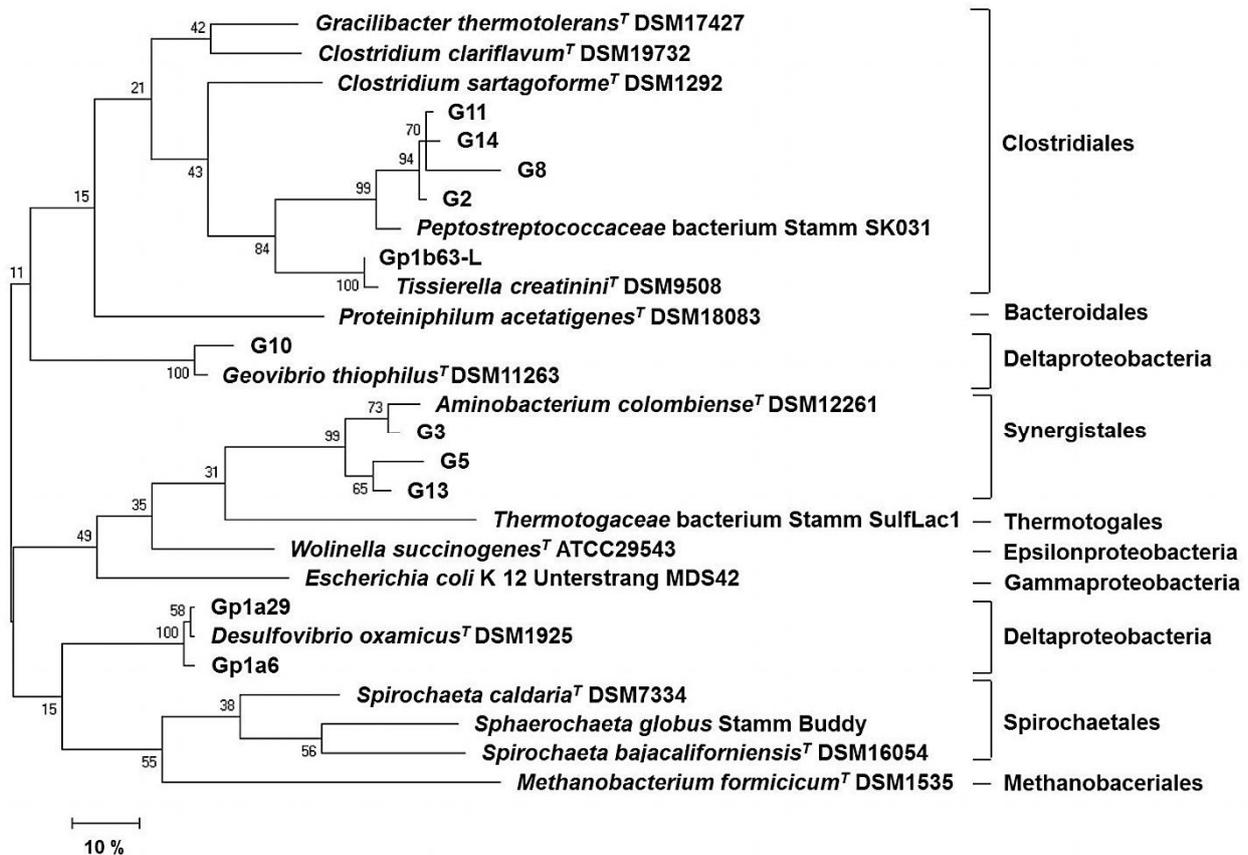


Abbildung 74: Phylogenetischer Stammbaum von Klonsequenzen partieller 16S rDNA der aus den ursprünglich aus der propionsäureabbauenden Anreicherungskultur Gp1 (BGA BioEnergie Glahn) stammenden Bakterien und ausgewählter in der NCBI-Datenbank hinterlegter Sequenzen; multiple Alignierung: *online tool* ClustaW2 (EBI, UK); Phylogenie *Software*: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

Die vorherrschende Gruppierung in der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1a gehörte zu den Deltaproteobacteria (Klone Gp1a6 und Gp1a29, Abbildung 74). In der Unterkultur Gp1b1264 dominierten die Vertreter der zu den Clostridiales zähligen Familie *Peptostreptococcaceae* (Klone G2, G8, G11 und G14, Abbildung 74). Die 16S rDNA Sequenzen dieser Mikroorganismen wurden im Fermenter (Abbildung 44) sowie in der Unterkultur Gp1b1264 molekularbiologisch (Abbildung 53) identifiziert. Des Weiteren wurden Mikroorganismen der Ordnung Synergistales (Klone G3, G5 und G13, Abbildung 74) und der Klasse der Deltaproteobacteria (Klon G10, Abbildung 74) in Unterkultur Gp1b1264 angereichert. In DSMZ-Medium 63-L wurde ein weiterer Vertreter der Clostridiales (Klon Gp1b63-L, Abbildung 74) angereichert und identifiziert.

4.6.5.1.4 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA von aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1 stammenden Bakterien

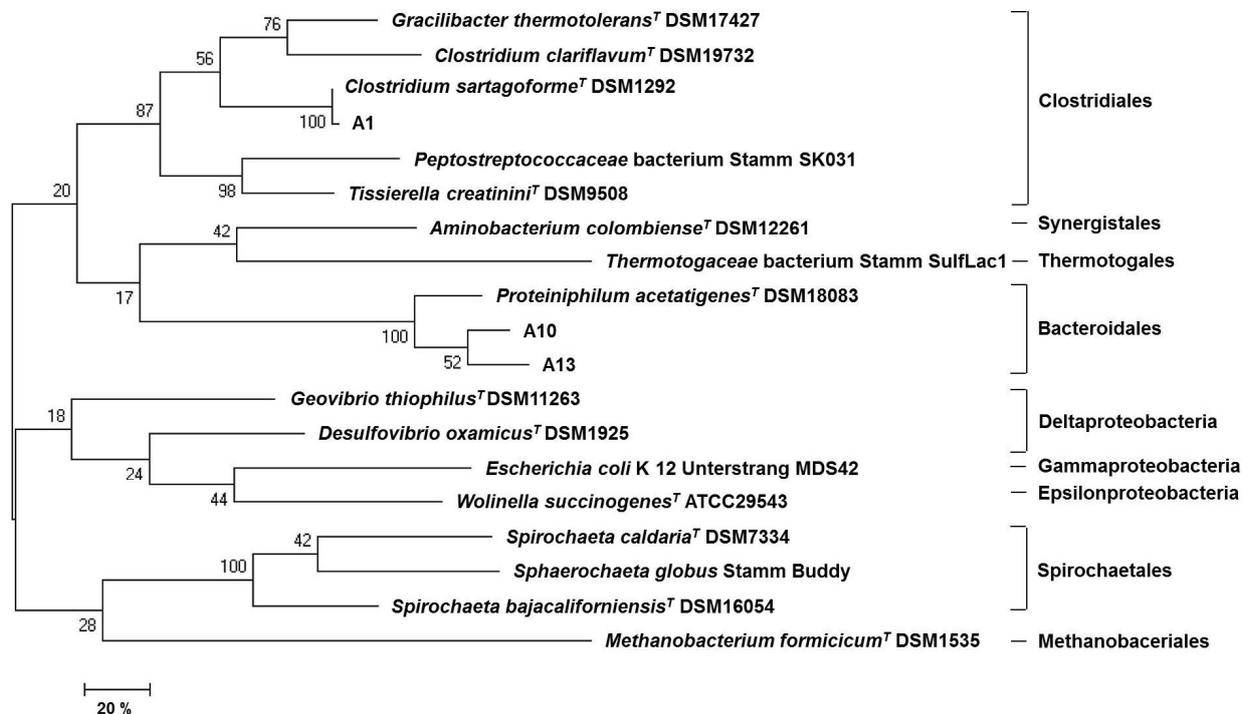


Abbildung 75: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen mit unterschiedlichen Restriktionsmustern aus der jeweiligen Gesamt-DNA der Unterkultur Ap1a1264 aus der BGA Arenrath GmbH & Co KG und in der NCBI-Datenbank hinterlegte Sequenzen; multiple Alignierung: *online tool* ClustalW2 (EBI, UK); Phylogenie Software: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

Die Unterkultur Ap1a1264 zeigte im Vergleich zu den anderen Unterkulturen (Abbildung 72 bis Abbildung 74) die geringste Mikroorganismendiversität aus zwei verschiedenen Ordnungen: Clostridiales (Klon A1, Abbildung 75) und Bacteroidales (Klone A10 und A13, Abbildung 75), von welchen das zur Ordnung der Clostridiales zugehörige Bakterium *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 reinisoliert wurde (Tabelle 46).

4.6.5.2 Phylogenetische Stammbäume partieller 16S rDNA methanogener Archaea

Die verwandtschaftlichen Beziehungen der eigenisolierten Kulturen methanogener Archaea wurden ebenfalls phylogenetisch analysiert. Die Durchführung glich der mit bakteriellen Sequenzen bis auf die Zufügung der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz des Typstamms *Methanopyrus kandleri*^T DSM5324, um die nahe Verwandtschaft der eigenisolierten methanogenen Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen zu verdeutlichen.

4.6.5.2.1 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA nach einer DGGE aus der Gesamt-DNA von Eigenisolaten methanogener Archaea

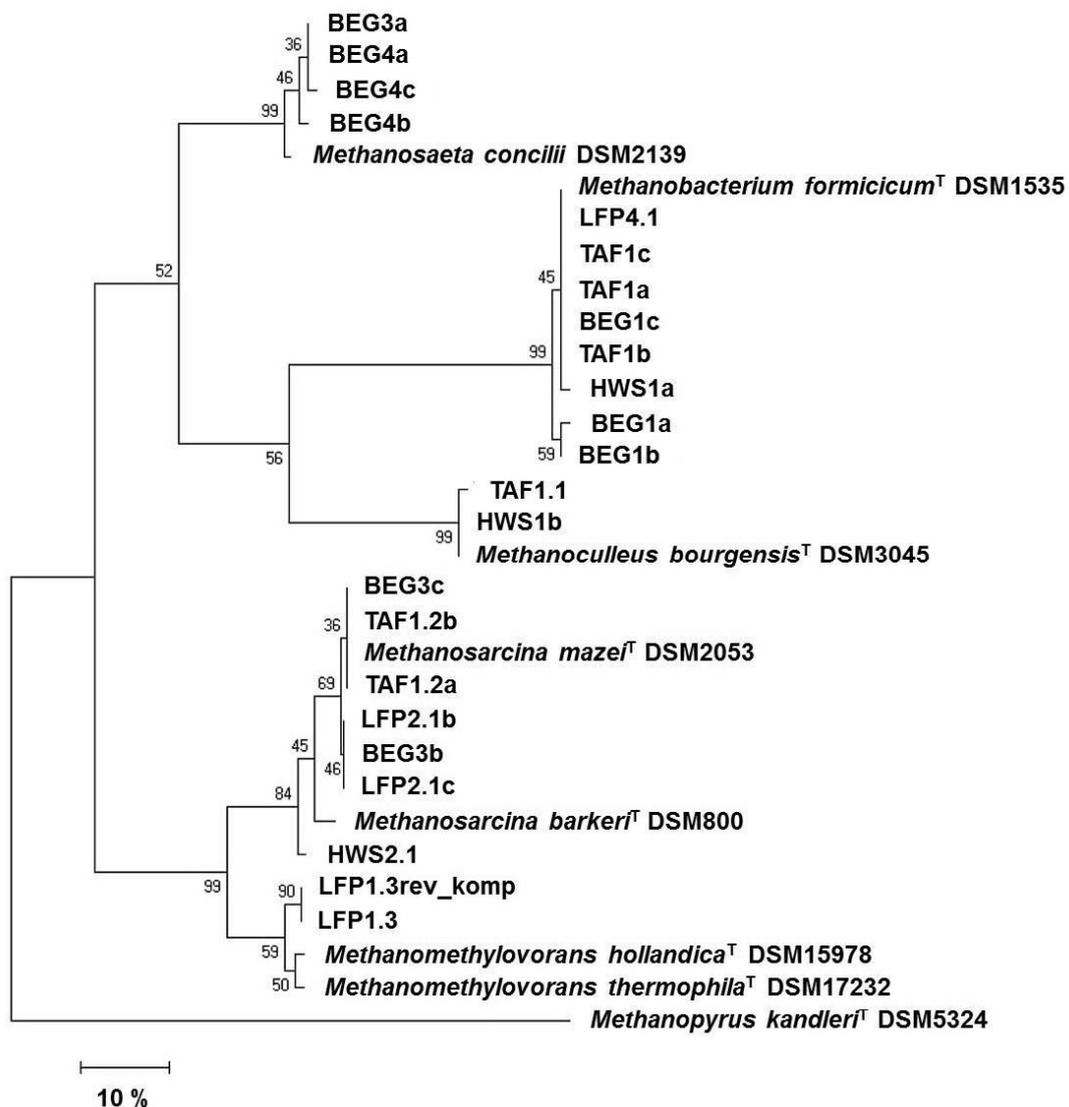


Abbildung 76: Phylogenetischer Stammbaum der DGGE-Sequenzen aus der jeweiligen 16S rDNA eigenisolierter Kulturen methanogener Archaea, deren Typstämme und teilweise in der NCBI-Datenbank hinterlegten Typstamm-Sequenzen; multiple Alignment: *online tool* ClustalW2 (EBI, UK); Phylogenie Software: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

Die Stammbaumberechnung (Abbildung 76) der mit der Oligonukleotidpaarung Ar1000f/ Ar1500r reamplifizierten insgesamt 500 bp großen DGGE-Fragmente spiegelte die Zuordnungen der eigenisolierten methanogenen Archaea mit der NCBI-Datenbank auch im Fall der Reinkultur LFP3.1 (Tabelle 51) wieder. Der hintere Teil der partiellen 16S rDNA des methanogenen Archaeons

wurde in gleicher Übereinstimmung den beiden Typstämmen des Genus *Methanomethylovorans* zugeordnet.

4.6.5.2.2 Phylogenetischer Stammbaum partieller 16S rDNA aus der Gesamt-DNA von Eigenisolaten methanogener Archaea

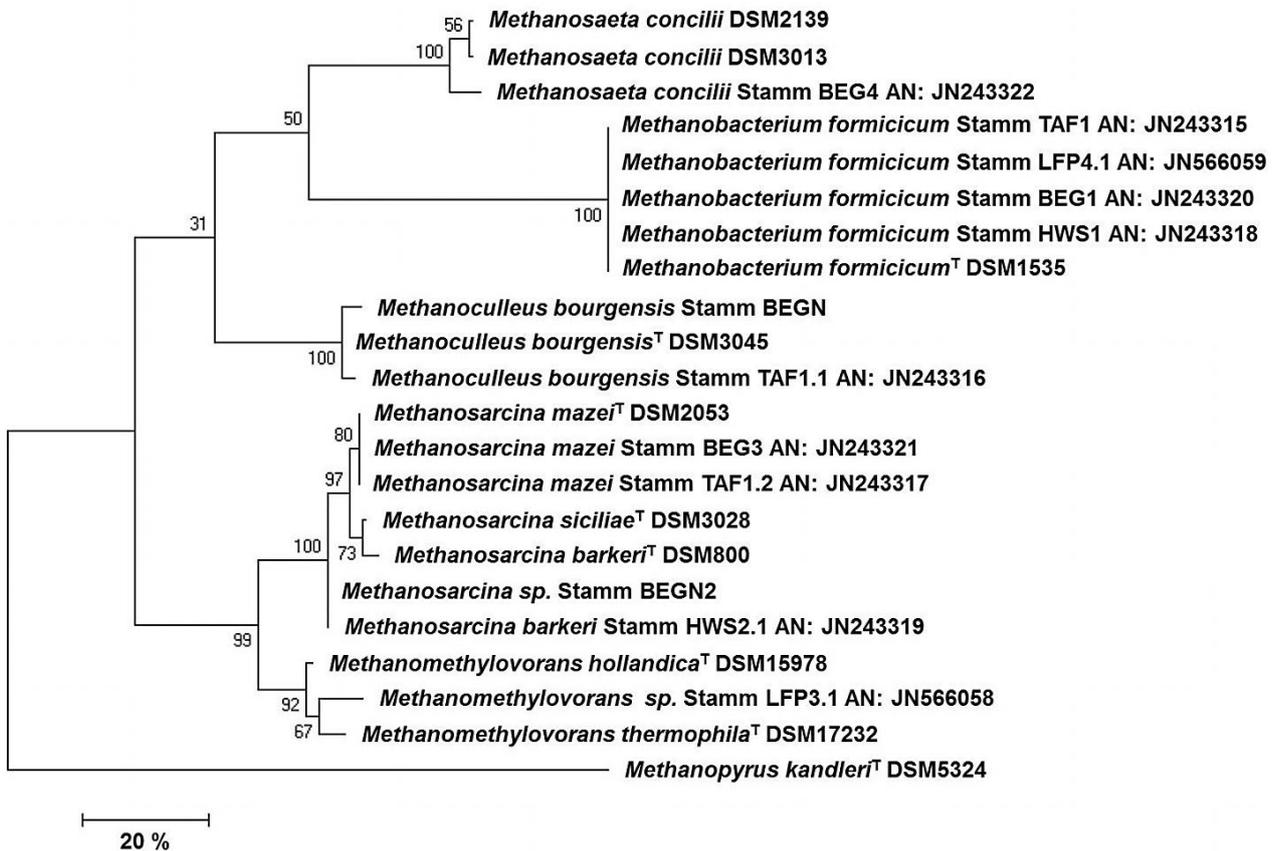


Abbildung 77: Phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen aus der jeweiligen partiellen 16S rDNA eigenisolierter Kulturen methanogener Archaea und in der NCBI-Datenbank hinterlegte Typstamm-Sequenzen; multiple Alignment: *online tool* ClustalW2 (EBI, UK); Phylogenie *Software*: Mega 4.1 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA); Berechnung: *Maximum Parsimony* (Sober 1983), 100 Baumkonstruktionen mit 50 % Regelung; Statistische Absicherung: *Bootstrap* (Efron und Tibshirani 1994, Efron 1979), 100 Baumkonstruktionen; Differenzmaßstab in %.

Die mit der Oligonukleotidpaarung Met86f/ Met1340r amplifizierten partiellen 16S rDNA-Sequenzen wurden mit eindeutigen Übereinstimmungen von bis zu 100 % Arten methanogener Archaea zugeordnet (Kapitel 4.6), was die Berechnung des Stammbaums methanogener Archaea (Abbildung 77) bis auf zwei Sequenzen bestätigte. Die archaeale partielle 16S rDNA aus Kultur BEGN2 wurde beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank *Methanosarcina siciliae*^T DSM3028 zugeordnet, wohingegen die Stammbaumberechnung die größte Übereinstimmung der partiellen Sequenz mit *Methanosarcina barkeri*^T DSM800 zeigte. In der paarweisen Alignment (Tabelle 51)

wurde die partielle 16S rDNA-Sequenz des insgesamt 1254 bp langen Fragments aus der Reinkultur LFP3.1 geringfügig näher dem Typstamm *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 zugeordnet. Bei der auf einer multiplen Alignierung beruhenden Berechnung des Stammbaums zu *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232 (Abbildung 77).

4.7 Substrate und Produkte anaerober Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen

Der Umsatz der organischen Säuren, Propionsäure (Propionat), Fumarsäure (Fumarat), Bernsteinsäure (Succinat) und Essigsäure (Acetat) der von Herrn Dr. Dröge (PFI) zur Verfügung gestellten propionsäureabbauenden Anreicherungskulturen (Tabelle 14) aus laufenden NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) sowie Stämmen von der Deutschen Stammsammlung (DSMZ, Tabelle 17) wurden mit der *high-performance liquid chromatography* (HPLC, Kapitel 3.6.1) gemessen. Die Produktion von Methan durch eigenisolierte methanogene Archaea wurde gaschromatographisch (GC, Kapitel 3.6.2) detektiert.

4.7.1 Propionsäureoxidation anaerober Anreicherungskulturen

Die Konzentrationen von Propionat und Acetat im zellfreien Kulturüberstand propionsäureabbauender Anreicherungskulturen Fp1, Gp1, Wp1, Wp2, Ap1 und Ap3 (Tabelle 14) wurden mit einem HPLC-System (Kapitel 2.1, Seite 70) mit einem UV-Vis-Detektor gemessen.

Die Kulturen mit dem deutlichsten Abbau von Propionsäure sind in Abbildung 78 bis Abbildung 82 graphisch aufgeführt und erläutert. Die Rohdaten der graphisch gezeigten Messungen sind digital auf der Rohdaten CD ‚Dissertation Kerstin Seyfarth\Chemische Analyse\HPLC Messungen Propionsaeure\Propionsaeureabbauende Kulturen2\Fp1, ...Gp1, ...Ap1 und ...Ap3‘ einsehbar.

4.7.1.1 Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Fp1

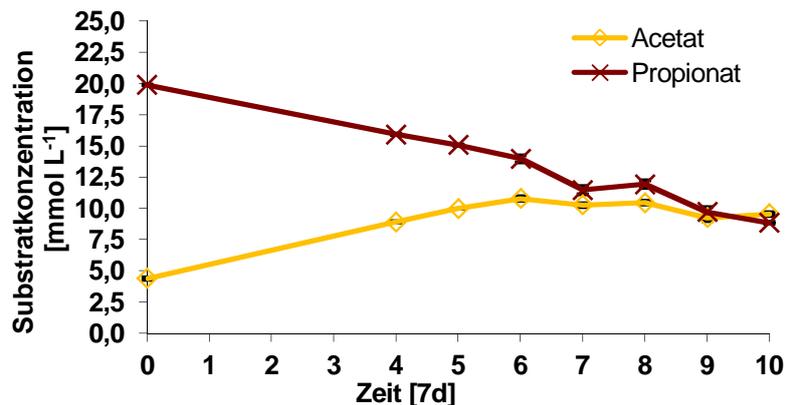


Abbildung 78: Propionsäure- (braun) und Acetatgehalt (orange) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Anreicherungskultur Fp1 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Anreicherungskultur Fp1 (Abbildung 78) aus einem Fermenter der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (Tabelle 18) zeigte während den ersten sechs Inkubationswochen einen gleichmäßigen Abbau der dem Medium PI (Kapitel 2.6, Seite 83) zugesetzten Propionsäure (19,9 mmol L⁻¹) auf 14,0 mmol L⁻¹ in Woche 6, bei erwarteter Anreicherung (Kapitel 1.7.2) von Acetat von 4,4 mmol L⁻¹ auf 10,8 mmol L⁻¹. Zwischen Woche 7 und 8 stagnierte der Propionsäureabbau, wurde ab Woche 7 wieder aufgenommen (Endkonzentration Propionsäure 8,9 mmol L⁻¹), wobei Acetat ab Woche 6 (10,8 mmol L⁻¹) nicht im gleichen Maß akkumulierte sondern der Gehalt sich auf 9,6 mmol L⁻¹ verringerte.

Die Kultur Fp1 in PI-Medium ohne Reaktorfiltrat (Fp1P) zeigte keine Reduktion von Propionsäure im zellfreien Kulturüberstand. Die Messungen wurden daher vorzeitig abgebrochen (siehe Rohdaten CD \Chemische Analyse\HPLC Messungen Propionsaeure\Propionsaeureabbauende Kulturen2\Fp1P).

4.7.1.2 Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Gp1

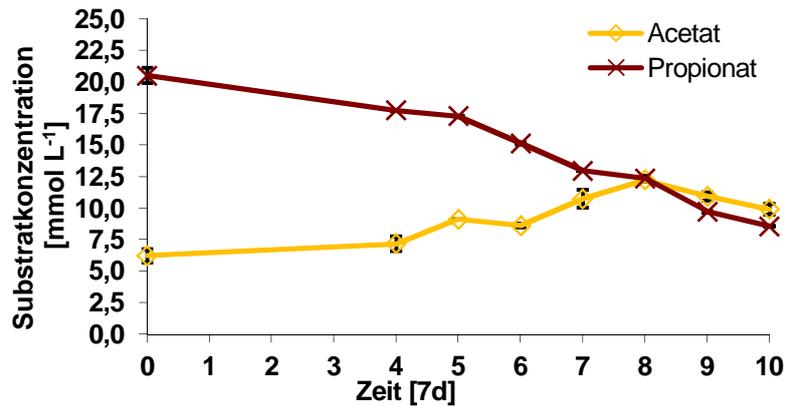


Abbildung 79: Propionsäure- (braun) und Acetatgehalt (orange) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Anreicherungskultur Gp1 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Die in Abbildung 79 dargestellten Konzentrationen in Abhängigkeit der Inkubationszeit von Propionat und Acetat der Kultur Gp1 aus der BGA BioEnergie Glahn (Tabelle 18) zeigen, dass die Erhöhung des Acetatgehalts mit Woche 4 einsetzte, obwohl seit der Beimpfung der Anreicherungskultur Gp1 in PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) die Propionatkonzentration von 20,5 mmol L⁻¹ auf 17,8 mmol L⁻¹ in Woche 4 gesunken war. Daher ergänzen sich die Graphen der beiden organischen Säuren nicht deckungsgleich. Obwohl Propionsäure weiterhin von Woche 8 (12,3 mmol L⁻¹) bis zum Ende des Messzeitraums von der Kultur Gp1 auf 8,6 mmol L⁻¹ abgebaut wurde, sank der Acetatgehalt von 12,3 mmol L⁻¹ auf 9,9 mmol L⁻¹.

Kultur Gp1P zeigte ohne Reaktorfiltrat im Medium keine Aktivität beim Propionsäureabbau. Die Messreihe wurde daher vorzeitig beendet (siehe Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\HPLC_Messungen_Propionsaeure\Propionsaeureabbauende_Kulturen2\Gp1P).

4.7.1.3 Syntrophe Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Gp1 mit der Reinkultur TAF1

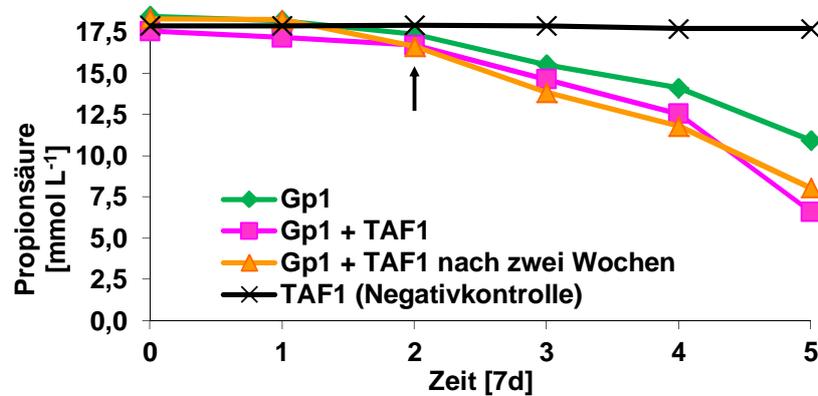


Abbildung 80: Propionsäuregehalt [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Anreicherungskultur Gp1 (grün), mit *Methanobacterium formicicum* TAF1 (pink), mit Zuimpfung von *Methanobacterium formicicum* TAF1 (orange) nach 2 Wochen Inkubation (Pfeil) und *Methanobacterium formicicum* TAF1 (schwarz) in PI-Medium über einen Messzeitraum von 5 Wochen [7d].

Zugabe des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 zur propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1 erzielte eine Verstärkung des Abbaus der Propionsäure (Abbildung 80) im Vergleich zur Mischkultur ohne ein zusätzliches methanogene Archaeon. Eine Zuimpfung des hydrogenotroph Methan produzierenden *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 nach 2 Wochen bewirkte keinen bedeutenden Unterschied zur Beimpfung direkt zu Beginn der Inkubation der anaerob propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1. Zur Kontrolle wurde *Methanobacterium formicicum* TAF1 einzeln in PI-Medium inkubiert, wobei ein stabiler Propionsäuregehalt ermittelt wurde (schwarze Linie in Abbildung 80).

4.7.1.4 Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Ap1

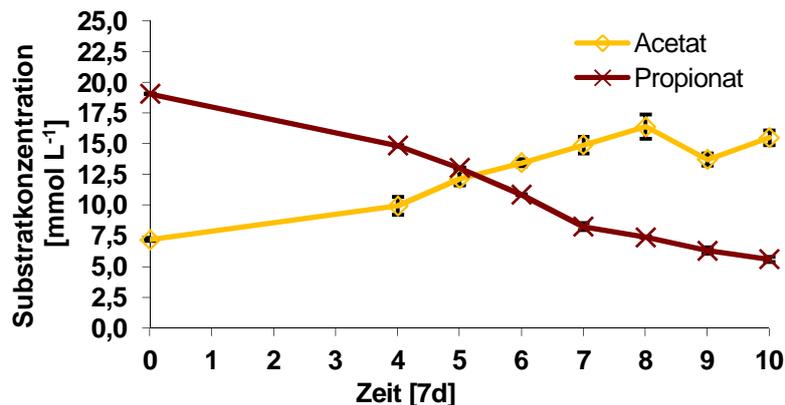


Abbildung 81: Propionsäure- (braun) und Acetatgehalt (orange) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Anreicherungskultur Ap1 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Anreicherungskultur Ap1 aus der BGA Arenrath GmbH & Co KG baute relativ regelmäßig über den gesamten Messzeitraum Propionsäure von 19,1 mmol L⁻¹ auf 5,6 mmol L⁻¹ ab. Der Abbau von Propionsäure von Woche 8 bis zum Ende der Messungen bewirkte keinen äquivalenten Anstieg des Acetats im filtrierten Medium der Kultur. Der Acetatgehalt fiel zunächst in Woche 8 von dem Wert 16,4 mmol L⁻¹ auf 13,7 mmol L⁻¹ und stieg bis Woche 10 wieder auf den Gehalt von 15,5 mmol L⁻¹. Kultur Ap1 baute das Acetat nicht konstant ab wie Kultur Gp1.

4.7.1.5 Propionsäureoxidation der anaeroben Anreicherungskultur Ap3

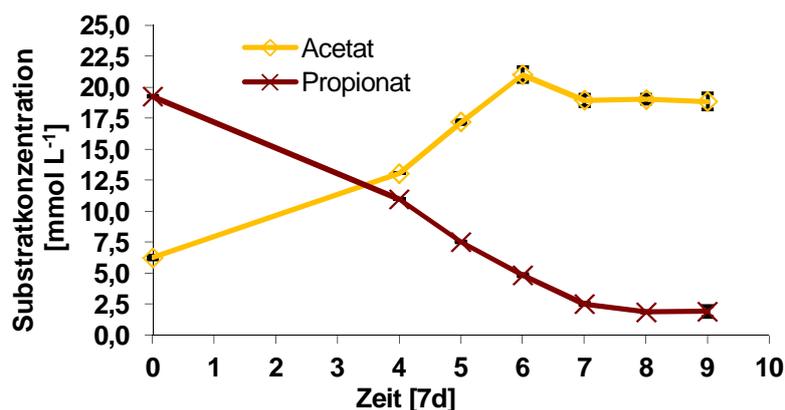


Abbildung 82: Propionsäure- (braun) und Acetatgehalt (orange) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Anreicherungskultur Ap3 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Abbildung 82 stellt den Verlauf des Propionsäure- und Acetatgehalts des Kulturüberstandes der Kultur Ap3 dar. Der Acetatgehalt fiel in Woche 6 mit 21,0 mmol L⁻¹ auf 19,0 mmol L⁻¹ in Woche 7 und stagnierte um die 19 mmol L⁻¹, sobald der Propionsäuregehalt in Woche 7 auf 2,5 mmol L⁻¹

gesunken war. Die Messungen der Kultur Ap3 wurden in Woche 9 abgebrochen. Das Abbauverhalten der Anreicherungskultur Ap3 wies in den Grundzügen ein vergleichbares mit Anreicherungskultur Ap1 auf. Propionsäure wurde gleichmäßig abgebaut und der Acetatgehalt blieb nach dem Abbau einer bestimmten Menge Propionat auf einem Level. Der Unterschied zwischen den Kulturen Ap1 und Ap3 kam durch die höhere Aktivität der letztgenannten Kultur zustande.

Die Kulturen Wp1, Wp1P und Wp2P aus der BGA Hubert Wagner und Sohn GbR zeigten keine Aktivität und sind daher nicht weiter erläutert (Rohdaten siehe unter RohdatenCD\Chemische Analyse\HPLC_Messungen_Propionsaeure\Propionsaeureabbauende_Kulturen1\Wp1, ...\Wp2, ...\Wp1P und ...\Wp2P)

4.7.2 Propionsäureoxidation anaerober Mischkulturen mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

Zur weiteren Prüfung des Substratverhaltens der propionsäureabbauenden Mischkulturen wurden etwa 10 Wochen alte Kulturen Fp1, Wp1, Wp2, Gp1 Ap1 und Ap3 in PI-Medium mit 40 mmol L^{-1} Fumarsäure (Kulturenbenennung = KulturnameF), sowie 40 mmol L^{-1} Fumarsäure und 5 mmol L^{-1} Bromoethansulfonsäure (BrES Kulturenbenennung = KulturnameBF) (Kapitel 3.3.1) mit jeweils 10-facher Verdünnung angeimpft. Mit den Proben wurde verfahren wie bei den vorherigen Messungen. Gemessen wurden diese Proben mit dem gleichen HPLC-System (Kapitel 2.1, Seite 70) mit einem RI-Detektor (Einstellungen siehe Kapitel 3.6.1). Auf den folgenden Seiten sind die Konzentrationen [mmol L^{-1}] während der 10wöchigen Messung der organischen Säuren Propionsäure (Propionat), Fumarsäure (Fumarat), Bernsteinsäure (Succinat) und Acetat graphisch dargestellt und erläutert (Rohdaten [g L^{-1}] siehe Rohdaten CD\Chemische Analyse\HPLC Messungen Propionsaeure\Propionsaeureabbauende Kulturen3\entsprechende Kultur').

4.7.2.1 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Fp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

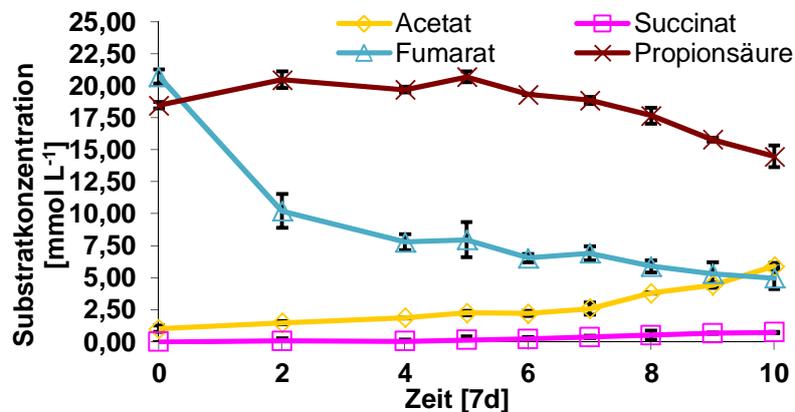


Abbildung 83: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Fp1 in PI-Medium mit Fumarsäure (Fp1F) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

In Kultur Fp1F nahm innerhalb der ersten Zwei Wochen des Messzeitraums der Gehalt des Fumarats um die Hälfte ab (Abbildung 83). Zu welchem Produkt Fumarat anaerob umgesetzt wurde, ließ sich mit diesen Messungen nicht verdeutlichen, da sich nicht wie erwartet (Kapitel 3.3.1) Succinat im Medium anreicherte. Der Propionsäuregehalt war in Woche 2 leicht angestiegen. Der Gehalt an Propionsäure verringerte sich ab Woche 5, wobei der Acetatgehalt invers stieg.

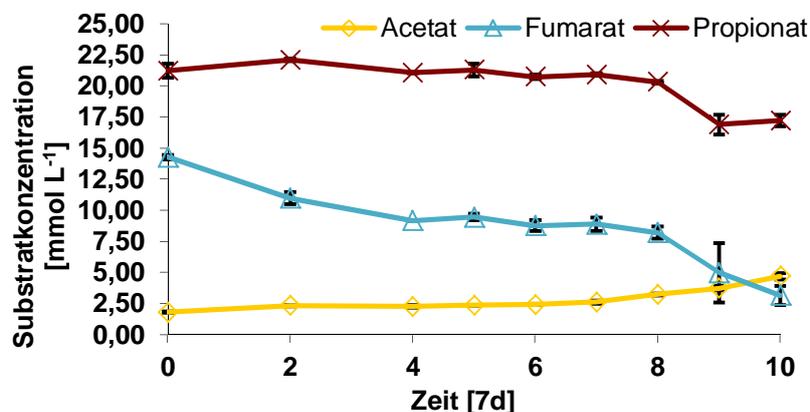


Abbildung 84: Propionat (braun), Acetat (orange) und Fumarat (hellblau) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Fp1 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Fp1FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Succinat wurde in Mischkultur Fp1FB nicht detektiert, da Bromoethansulfonsäure (BrES) zur gleichen Retentionszeit wie Succinat ein Signal im RI-Detektor erzeugte und somit das Signal des Succinats überlagerte. Aufgrund der Konzentrationen der organischen Säuren Propionat, Fumarat und Acetat in Abbildung 84 wies Kultur Fp1FB ein zur Kultur Fp1F (Abbildung 83) vergleichbares Substratverhalten auf. Innerhalb der ersten zwei Wochen nahm der Fumaratgehalt im filtrierten

Medium auf etwa den gleiche Gehalt ($11,0 \text{ mmol L}^{-1}$) wie in Kultur Fp1F ($10,3 \text{ mmol L}^{-1}$) ab. Auch hier war der Propionsäuregehalt in Woche 2 leicht gestiegen. In Woche 8 war der Fumaratgehalt auf $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ gesunken als der Abbau von Propionsäure einsetzte. Entsprechend hatte der Fumaratgehalt der Kultur Fp1F einen Fumaratgehalt von $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ als der Abbau von Propionsäure in Woche 5 einsetzte.

4.7.2.2 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Wp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

Kultur Wp1F wies keinen Substratabbau auf. Die Kultur wurde daher nicht weiter berücksichtigt. In Tabelle 53 sind die errechneten Werte der Einfachmessung in mmol L^{-1} aufgeführt.

Tabelle 53: Acetat, Succinat, Fumarat und Propionat [mmol L^{-1}] (Mittelwerte) der Kultur Wp1F in PI-Medium mit Fumarsäure als Zusatz während des Messzeitraums über 10 Wochen [7d]

Woche	Acetat [mmol L^{-1}]	Succinat [mmol L^{-1}]	Fumarat [mmol L^{-1}]	Propionat [mmol L^{-1}]
0	1,05	0,00	13,27	18,14
2	n. d.	0,00	12,11	20,14
4	1,19	0,00	12,81	19,42
5	0,00	0,00	11,50	19,31
6	0,87	0,00	11,14	18,57
7	1,17	0,00	10,45	18,03
8	1,11	0,00	11,85	19,20
9	1,15	0,00	12,00	18,73
10	0,60	0,00	11,33	18,70

n. d. = nicht detektierbar

Der Gehalt der Propionsäure in Kultur Wp1F schwankte in Woche 2 gering nach oben, um in Woche 4 in Etwa wieder auf die Ausgangskonzentration zu sinken. Diese Schwankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit oft während *Lag*-Phasen Propionsäure abbauender Kulturen beobachtet.

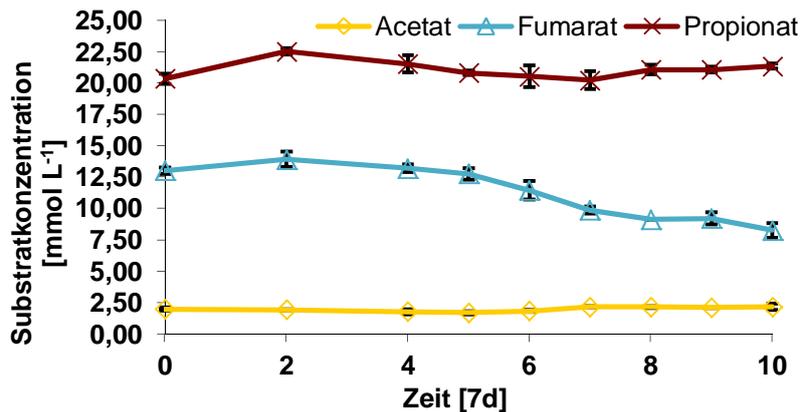


Abbildung 85: Propionat (braun), Acetat (orange) und Fumarat (hellblau) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Wp1 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Wp1FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Auch in Mischkultur Wp1FB wurde kein Succinat detektiert, da die Bromoethansulfonsäure (BrES) zur gleichen Retentionszeit wie Succinat ein Signal im RI-Detektor erzeugte und das Signal des Succinats überlagerte. Während des 10-wöchigen Messzeitraums wurde von Kultur Wp1FB keine Propionsäure Abgebaut (Abbildung 85). Genauso erfuhr der Gehalt des Acetats keine signifikanten Änderungen. Ab Woche 5 setzte der Fumaratabbau ein. Es zeigte sich in Kultur Wp1FB wieder ein leichter Anstieg des Propionsäuregehalts von der Beimpfung des Mediums bis zur zweiten Woche.

4.7.2.3 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Wp2 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

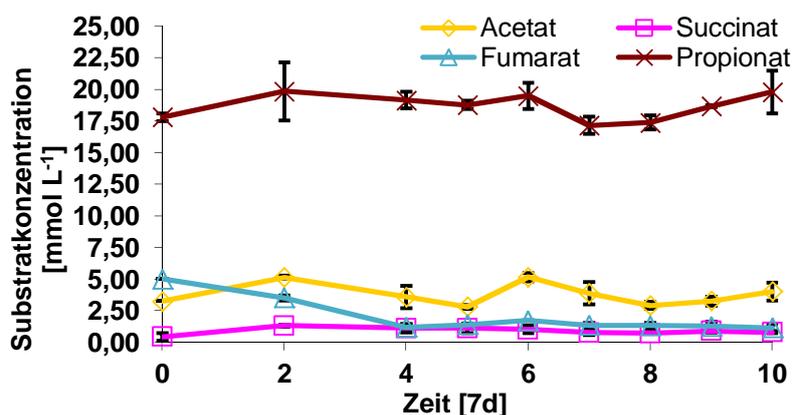


Abbildung 86: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Wp2 in PI-Medium mit Fumarsäure (Wp2F) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Wie bei Kultur Wp1FB (Abbildung 85) wurde in Kultur Wp2F keine Propionsäure abgebaut, was in Abbildung 86 dargestellt ist. Zwischen Woche 2 und 4 wurde Fumarat bis zu einem Minimum abgebaut, was keine Auswirkungen auf den Succinatgehalt hatte. Der Acetatgehalt (orange) schwankte während der Inkubationszeit ohne Tendenz zwischen Abbau und Akkumulation.

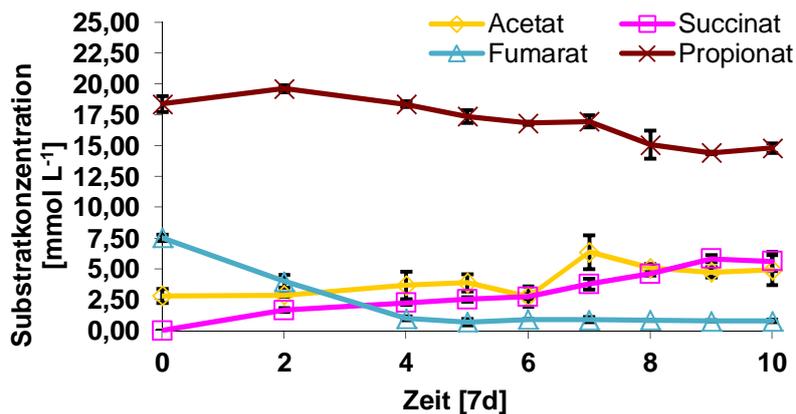


Abbildung 87: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Wp2 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Wp2FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Der zellfreie Kulturüberstand der Mischkultur Wp2FB zeigte ab Woche 4 den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Propionsäureabbau mit Succinatbildung, nachdem Fumarat bis Woche 4 zu einem Minimum abgebaut worden war (Abbildung 87). Acetat akkumuliert in geringem Maß im Medium PI mit Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure. Auch in Kultur Wp2FB stieg der Propionsäuregehalt bis Woche 2 geringfügig an.

4.7.2.4 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Gp1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

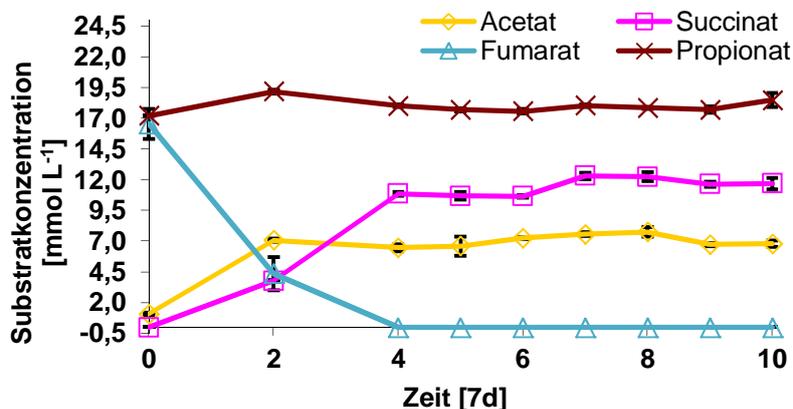


Abbildung 88: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Gp1 in PI-Medium mit Fumarsäure (Gp1F) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Der Wert des Propionsäuregehalts (Abbildung 88) stieg auch in Kultur Gp1F bis Woche 2 leicht und sank bis Woche 4 wieder auf den Ausgangswert. Die Zugabe von Fumarat bewirkte bei Kultur Gp1F, dass keine Propionsäure abgebaut, sondern Fumarat bis Woche 4 vollständig abgebaut wurde. Dabei akkumulierten in den ersten zwei Wochen Succinat und Acetat im PI-Medium. Der Acetatgehalt blieb ab Woche 2 stabil. Zwischen Woche 2 und 4 stieg der Succinatgehalt so lange,

bis Fumarat vollständig abgebaut worden war und reicherte sich bis zum Ende der Messungen nicht weiter deutlich an.

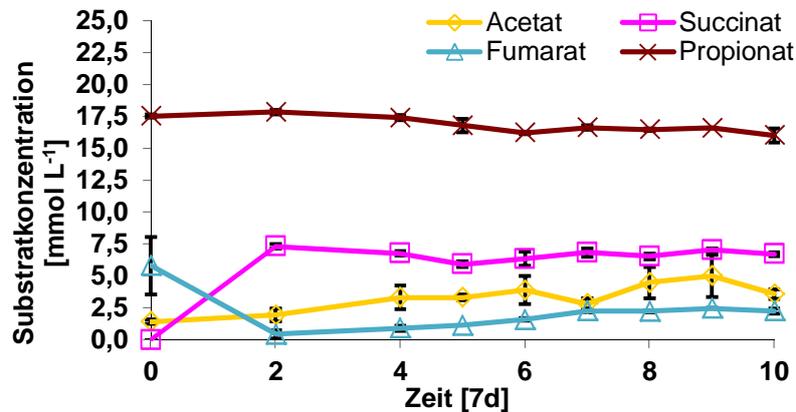


Abbildung 89: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Gp1 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Gp1FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Kultur Gp1FB baute bis Woche 2 Fumarat auf ein Minimum ab, wobei im Gegensatz zu Kultur Gp1F die Succinatkonzentration im Medium PI, jedoch nicht der Gehalt von Acetat stieg (Abbildung 89). Es wurde über den gesamten Zeitraum keine deutliche Veränderung der Propionsäurekonzentration gemessen.

4.7.2.5 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Ap1 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

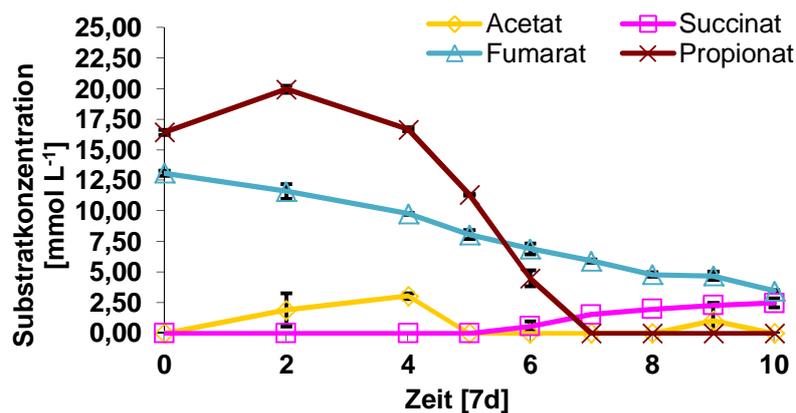


Abbildung 90: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Ap1 in PI-Medium mit Fumarsäure (Ap1F) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

In Abbildung 90 ist das Substratverhalten von Kultur Ap1F graphisch dargestellt. Während des gesamten Messzeitraums wurde Fumarat stetig abgebaut. Dabei reicherte sich bis Woche vier Acetat im Medium PI an, welches nach einer weiteren Woche wieder abgebaut wurde und bis zur

letzten Messung der Woche 10 auf dem Niveau verblieb. Sobald Acetat in Woche 5 abgebaut war, setzte ein geringer Anstieg Succinatakkumulation ein. Nach einer Anreicherung von Propionsäure bis Woche 2 wurde Propionsäure parallel zum einsetzenden Acetatabbau ab Woche 4 von Kultur Ap1F innerhalb fünf Wochen (bis Woche 7) vollständig abgebaut.

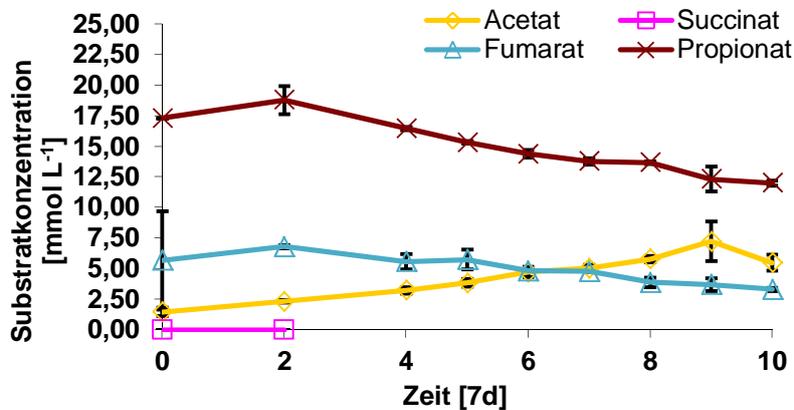


Abbildung 91: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Ap1 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Ap1FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Propionsäure wurde parallel zu Fumarat durch Kultur Ap1FB abgebaut (Abbildung 91), wobei die Aktivität geringer ausfiel als die von Kultur Ap1F. Gleichzeitig akkumulierte Acetat bis Woche 8 und der Gehalt stagnierte bis zum Ende des Messzeitraums. Der Gehalt von Succinat konnte ab der zweiten Woche nicht mehr detektiert werden, da das Signal der Bromoethansulfonsäure das Signal des Succinats überlagerte.

4.7.2.6 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkultur Ap3 mit Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

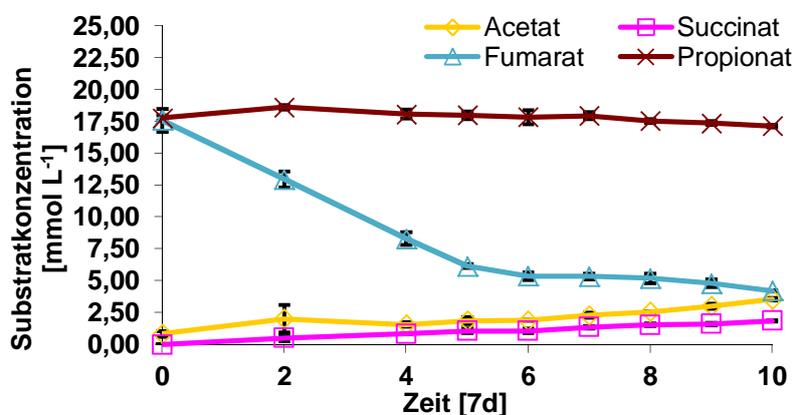


Abbildung 92: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Ap3 in PI-Medium mit Fumarsäure (Ap3F) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Kultur Ap3F baute innerhalb der ersten fünf Wochen Fumarat ab (Abbildung 92). Der Fumaratabbau stagnierte ab Woche 5 bis Woche 10. Zu keiner Zeit wurde Propionsäure abgebaut und keine deutliche Anreicherung von Acetat sowie Succinat wurde im Medium detektiert.

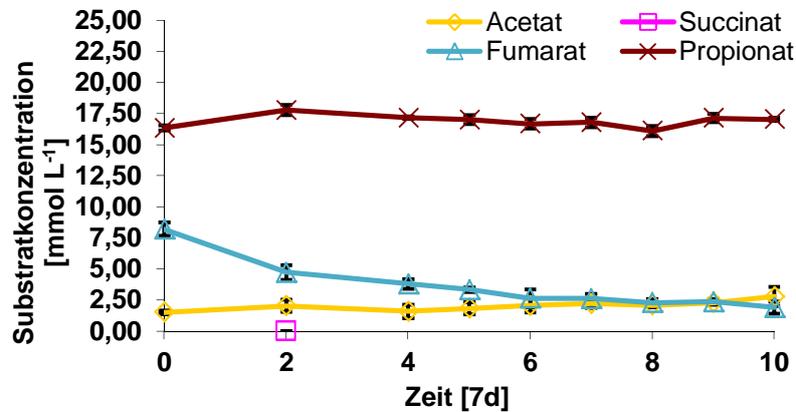


Abbildung 93: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus Mischkultur Ap3 in PI-Medium mit Fumarsäure und BrES (Ap3FB) über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Kultur Ap3FB zeigte ein vergleichbares Substratverhalten wie Ap3F. Keine Änderungen des Gehalts von Propionsäure durch Kultur Ap3FB wurden detektiert. Der Fumaratgehalt sank über die gesamte Messdauer. Acetat erfuhr wie Propionat keine Konzentrationsänderungen während der 10-wöchigen Inkubation der Kultur Ap3FB. Succinat wurde nur in Woche 2 gemessen, da das Signal der übrigen Messpunkte von Bromoethansulfonsäure überlagert wurde.

Um die effektivsten Kulturen auszuwählen, wurden die oben erläuterten Mischkulturen mit Fumarat beziehungsweise Fumarat und Bromoethansulfonsäure nach den HPLC Messungen in 9 mL frisches PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) 1:10 überimpft und das Substratverhalten wie zuvor beschrieben erneut über 10 Wochen ermittelt.

4.7.3 Propionsäureoxidation anaerober Mischkulturen nach Zugabe von Fumarsäure und Bromoethansulfonsäure

Die Kulturen wurden zum besseren Verständnis von ‚Kultur‘F und ‚Kultur‘FB in ‚Kultur‘a und ‚Kultur‘b umbenannt (Tabelle 14). Es folgen die Graphen der Substratkonzentrationen der Nachfolgekulturen in PI-Medium mit Propionsäure als einzige C-Quelle (Abbildung 94 bis Abbildung 99) nach Inkubation mit Fumarat beziehungsweise Fumarat und Bromoethansulfonsäure (Rohdaten [g L⁻¹] siehe Rohdaten CD Dissertation Kerstin Seyfarth\Chemische Analyse\HPLC Messungen Propionsaeure\Propionsaeureabbauende Kulturen4\entsprechende Kultur‘).

4.7.3.1 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Fp1a und Fp1b

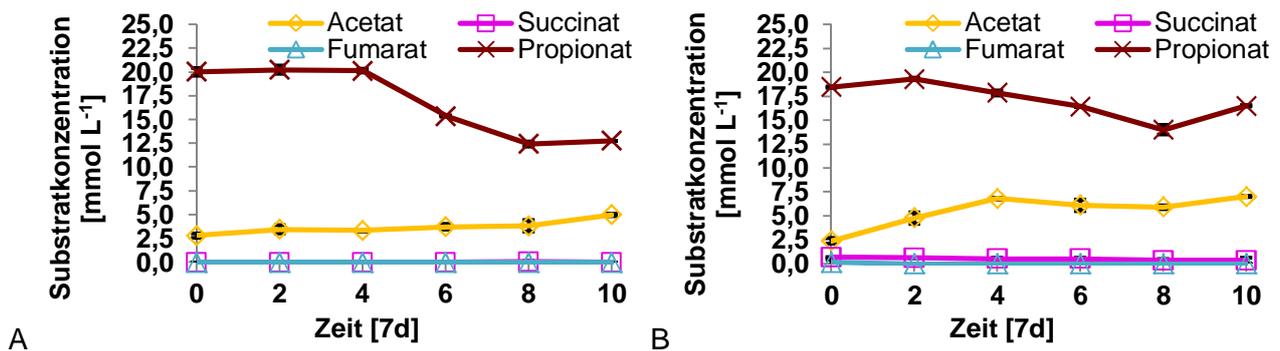


Abbildung 94: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Fp1a und B Fp1b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Im filtrierten Medium der Kultur Fp1a (Abbildung 94 A) wurde Propionsäure von Woche 4 (20,1 mmol L⁻¹) bis Woche 8 (12,5 mmol L⁻¹) umgesetzt. Der Propionsäuregehalt stabilisierte sich bis Woche 10 bei 12,8 mmol L⁻¹. Keine des Propionatabbaus gleichförmige Akkumulation von Acetat wurde festgestellt. Der Acetatgehalt stieg von 2,8 mmol L⁻¹ auf 5 mmol L⁻¹ über den Messzeitraum von 10 Wochen. Abbildung 94 B zeigt die im Vergleich zu Fp1a (Abbildung 94 A) weniger aktive Kultur Fp1b. Diese Kultur baute Propionat von Woche 2 bis Woche 8 von 18,5 mmol L⁻¹ auf durchschnittlich 16,4 mmol L⁻¹ ab. Der Propionsäuregehalt stieg von Woche 8 zu Woche 10 auf 16,5 mmol L⁻¹. Die Acetatkonzentration erhöhte sich ab der Beimpfung bis Woche 4 von 2,4 mmol L⁻¹ auf 6,8 mmol L⁻¹, was sich nicht mit dem zeitlichen Ablauf des Propionsäureabbaus deckte. Im weiteren Verlauf pendelte sich der Acetatgehalt auf 7,1 mmol L⁻¹ in Woche 10 ein. In beiden Kulturen (Abbildung 94 A und B) wurden keine Veränderungen in den Konzentrationen von Fumarat und Succinat detektiert.

4.7.3.2 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Wp1a und Wp1b

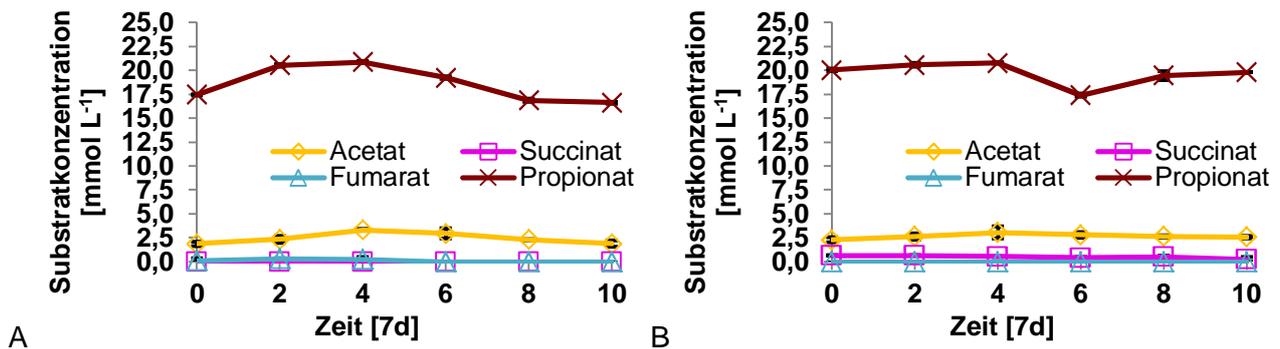


Abbildung 95: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Wp1a und B Wp1b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Der Propionsäuregehalt der Mischkultur Wp1a (Abbildung 95 A) steigerte sich bis Woche 4 von anfänglich 17,5 mmol L⁻¹ auf 20,9 mmol L⁻¹ und verringerte sich bis Woche 8 auf 16,9 mmol L⁻¹. Mit dem Ende der Messperiode hatte das filtrierte Medium der Mischkultur Wp1a einen Propionsäuregehalt von 16,6 mmol L⁻¹, der unwesentlich niedriger lag als der Ausgangswert. Acetat stieg nur geringfügig von 1,9 mmol L⁻¹ auf 3,3 mmol L⁻¹ in Woche 4 und verringerte sich wieder auf 1,9 mmol L⁻¹. Der Propionsäuregehalt im Medium der Kultur Wp1b (Abbildung 95 B) senkte sich von Woche 4 auf Woche 6 von 20,8 mmol L⁻¹ auf 17,4 mmol L⁻¹ und stieg bis Woche 8 auf 19,5 mmol L⁻¹. Der Gehalt von Acetat veränderte sich nicht wesentlich im Vergleich zur Ausgangskonzentration von 2,3 mmol L⁻¹. Am Ende der Messungen betrug die Konzentration 2,6 mmol L⁻¹. Die Fumarat- und Succinatwerte erfuhren in beiden Kulturen keine Veränderungen während der 10-wöchigen Inkubation.

4.7.3.3 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Wp2a und Wp2b

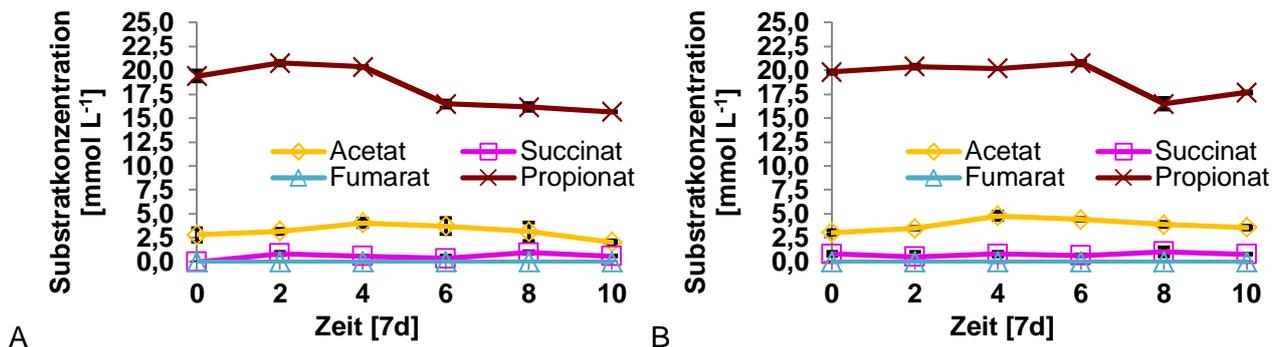


Abbildung 96: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Wp2a und B Wp2b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Mischkulturen Wp2a (Abbildung 96 A) und Wp2b (Abbildung 96 B) verhielten sich mit einem Ähnlichen Muster bei der Umsetzung der kurzkettigen organischen Säure Propionat, wobei Kultur Wp2a aktiver war als Wp2b. Kultur Wp2a baute das meiste Propionat von Woche 4 auf Woche 6 ab (von 20,4 mmol L⁻¹ auf 16,5 mmol L⁻¹). Bis zum Schluss verringerte sich der Propionsäuregehalt auf 15,7 mmol L⁻¹. Bei Betrachtung der Acetatkurve, fällt auf, dass die Acetatkonzentration nicht äquivalent zum Propionsäureabbau stieg. Der Acetatgehalt schwankte ab der Beimpfung bis Woche 4 von 2,8 mmol L⁻¹ auf 4,1 mmol L⁻¹ und von Woche 4 bis zur letzten Messung in Woche 10 auf 2,1 mmol L⁻¹. Kultur Wp2b (Abbildung 96 B) verringerte in den Wochen 6 bis 8 20,8 mmol L⁻¹ auf 16,5 mmol L⁻¹, zwei Wochen später als Kultur Wp2a (Abbildung 96 A). Der Acetatgehalt wuchs unabhängig vom Propionsäureabbau wie im filtrierten Medium der Kultur Wp2a bis Woche 4 von 3,1 mmol L⁻¹ auf 4,8 mmol L⁻¹ und verkleinerte sich bis Woche 10 auf 3,6 mmol L⁻¹. Bei beiden Kulturen wurden keine signifikanten Veränderungen im Succinatgehalt und zu keiner Zeit Fumarat detektiert.

4.7.3.4 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Gp1a und Gp1b

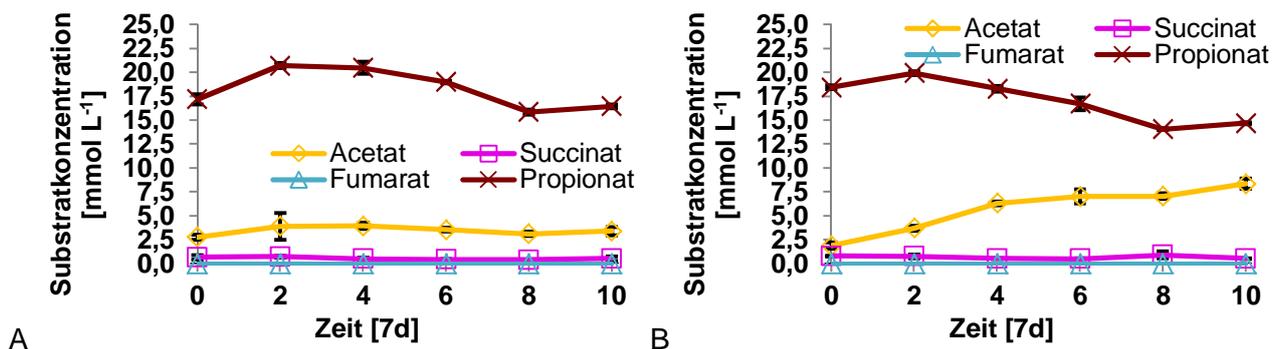


Abbildung 97: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Gp1a und B Gp1b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Durch die HPLC-Messungen des filtrierten Mediums von Mischkultur Gp1a (Abbildung 97 A) wurde gezeigt, dass Propionsäure nach einer kurzzeitigen Anreicherung von 17,2 mmol L⁻¹ zu Beginn auf 20,7 mmol L⁻¹ in Woche 2 zwischen den Wochen 4 bis 8 von 20,5 mmol L⁻¹ auf 15,9 mmol L⁻¹ dezimiert wurde. Acetat akkumulierte dabei nicht. Mischkultur Gp1b (Abbildung 97 B) baute Propionsäure von Woche 2 bis Woche 8 von 20,0 mmol L⁻¹ auf 14,1 mmol L⁻¹ unter Anreicherung von Acetat im PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) von 3,7 mmol L⁻¹ auf 8,3 mmol L⁻¹ ab. Der Succinatgehalt änderte sich über den Messzeitraum in beiden Kulturen nicht deutlich. Fumarat wurde auch hier in beiden Kulturen bei keiner Messung detektiert.

4.7.3.5 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Ap1a und Ap1b

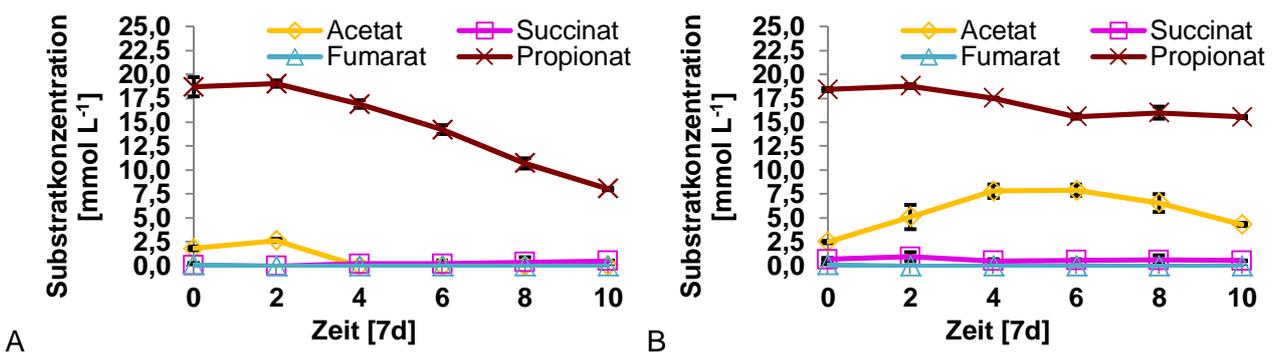


Abbildung 98: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Ap1a und B Ap1b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Ein gleichmäßiger Propionsäureabbau durch Mischkultur Ap1a wird in Abbildung 98 A dargestellt. Von Woche 2 bis Woche 10 verringerte sich der Propionsäuregehalt von 19,1 mmol L⁻¹ auf 8,1 mmol L⁻¹. Eine Anreicherung von Acetat wurde nicht gemessen. Stattdessen reduzierte sich der

Gehalt von Acetat von anfänglich $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ über $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ in Woche 2 auf null bis Woche 4. Im filtrierten Medium der Mischkultur Ap1b (Abbildung 98 B) verkleinerte sich der Propionsäuregehalt von Woche 2 $18,8 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $15,6 \text{ mmol L}^{-1}$ in Woche 6. Die Konzentration von Acetat wurde bis Woche 4 von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ zu Beginn auf $7,8 \text{ mmol L}^{-1}$ erhöht. Ab Woche 6 fiel der Acetatgehalt auf $4,3 \text{ mmol L}^{-1}$ in Woche 10, wobei der Propionsäuregehalt stabil auf der Konzentration von Woche 6 blieb. Succinat, sowie Fumarat verweilten auf ihren Anfangswerten während der 10-wöchigen Inkubation.

4.7.3.6 Propionsäureoxidation der anaeroben Mischkulturen Ap3a und Ap3b

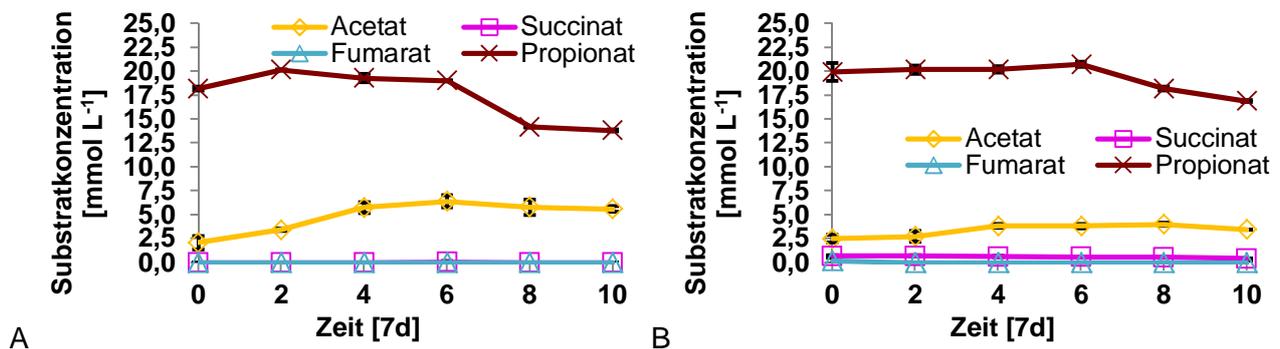


Abbildung 99: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus den Mischkulturen A Ap3a und B Ap3b in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen.

Der Propionsäuregehalt verringerte sich im filtrierten Medium der Mischkultur Ap3a (Abbildung 99 A) am Stärksten zwischen Woche 6 und Woche 8 von $19,0 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $14,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Bis Woche 10 sank die Konzentration von Propionsäure gering bis auf $13,8 \text{ mmol L}^{-1}$. Der Acetatgehalt stieg ohne deutlichen Propionsäureabbau ab der Beimpfung (Messpunkt 0) bis Woche 4 von $2,1 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $5,7 \text{ mmol L}^{-1}$ und erreichte sein Maximum in Woche 6 mit $6,4 \text{ mmol L}^{-1}$. In Woche 10 sank der Acetatgehalt auf einen Wert von $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Mischkultur Ap3b (Abbildung 99 B) wies eine schwächere Aktivität beim Propionsäureabbau auf als Kultur Ap1a. Propionsäure wurde ab Woche 6 von $20,7 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $16,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (Messpunkt Woche 10) abgebaut. Der Acetatgehalt stieg im Vergleich zur Kultur Ap3a (Abbildung 99 A) geringer von anfänglich $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ in Woche 4 und verringerte sich ab Woche 8 bis zum letzten Messpunkt vom Maximalwert $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ zu $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Die effektivsten propionsäureabbauenden Mischkulturen Fp1a und Wp2a wurden in PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) in bis zu 200 mL Medium und Gp1b und Ap1a bis zu 500 mL Medium kultiviert. Die anderen Mischkulturen wurden verworfen.

Aufgrund der molekularbiologischen Analysen der propionsäureabbauenden Kulturen (Kapitel 4.5.1) wurden Stämme von der Deutschen Stammsammlung (DSMZ, Braunschweig) bestellt, die in den propionsäureabbauenden Mischkulturen häufig identifiziert worden waren.

4.7.4 Substrate und Produkte definierter Mischkulturen anaerober Mikroorganismen und methanogener Archaea

Bei den von der DSMZ erstandenen Mikroorganismen handelte es sich um *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292, welcher in Unterkulturen von Ap1a in DSMZ-Medium 1264 (Tabelle 44) molekularbiologisch identifiziert und in Medium 520 eigenisoliert (Tabelle 46) worden war, *Wolinella succinogenes*^T DSM1740, der sowohl in Kultur Wp1 (Tabelle 38) als auch Wp2a (Tabelle 39) in DSMZ-Medium 1264 identifiziert worden war, *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 der in den Unterkulturen, Fp1a (Tabelle 34), Wp2a (Tabelle 39) und Gp1b (Tabelle 43) in DSMZ-Medium 1264 molekularbiologisch nachgewiesen worden war und der in Unterkultur Gp1b1264 identifizierte und in Kultur Fp1a63-L angereicherte *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 (Tabelle 42 und Kapitel 4.5.2.1). Jeweils 9 mL PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) wurde mit in der stationären Phase befindlichen Kulturen von *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292, *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 beziehungsweise *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 5-fach 1:10 beimpft, um das Substratverhalten mit Propionsäure als einzige Kohlenstoff-Quelle zu erforschen. Bei jeweils einer der Einzel-Beimpfungen wurde die Gasphase wöchentlich während der Versuchslaufzeit mit einer Begasungsanlage (Dräger) mit 0,5 bar Überdruck N₂ ausgetauscht, bei der zweiten Einzel-Beimpfung nicht. Den weiteren Beimpfungen wurden jeweils einer der beiden Eigenisolate *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 und *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 beziehungsweise *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 (nicht gezeigt) ebenfalls aus der stationären Phase 1:10 zugeimpft, um den Wasserstoffpartialdruck in den Kulturen gering zu halten. Um die Wasserstoff verwertenden Mikroorganismen zu unterstützen, wurden die Gasphasen der Co-Kulturen mit frischem N₂ (0,5 bar Überdruck) gespült. Als Negativkontrollen wurden 2-fach *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263, sowie die Eigenisolate *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 und *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 je 10⁻¹ verdünnt in PI-Medium geimpft. Dabei wurden die Gasphasen über den Negativ-Kulturen der zweiten Beimpfung ebenfalls wöchentlich ausgetauscht. Die Probenvorbereitungen für die HPLC-Messungen der organischen Säuren Acetat, Fumarat, Succinat und Propionat wurden durchgeführt wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Es wurde das gleiche HPLC-System (Kapitel 2.1, Seite 70) verwendet, wie bei den vorherigen Messungen. Die Gemessenen Werte wurden wie oben mit einem Tabellenbearbeitungsprogramm (Excel, Microsoft) von g L⁻¹ in mmol L⁻¹ umgerechnet und graphisch visualisiert. Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse der HPLC-Messungen der bakteriellen Typstämme und deren Co-Kulturen sowie der Negativkontrollen mit Erläuterungen (Rohdaten in g L⁻¹ siehe Rohdaten CD

Dissertation Kerstin Seyfarth\Chemische Analyse\HPLC Messungen Propionsaeure\Typstaemme in PI-Medium\('entsprechende Kultur').

4.7.4.1 Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292

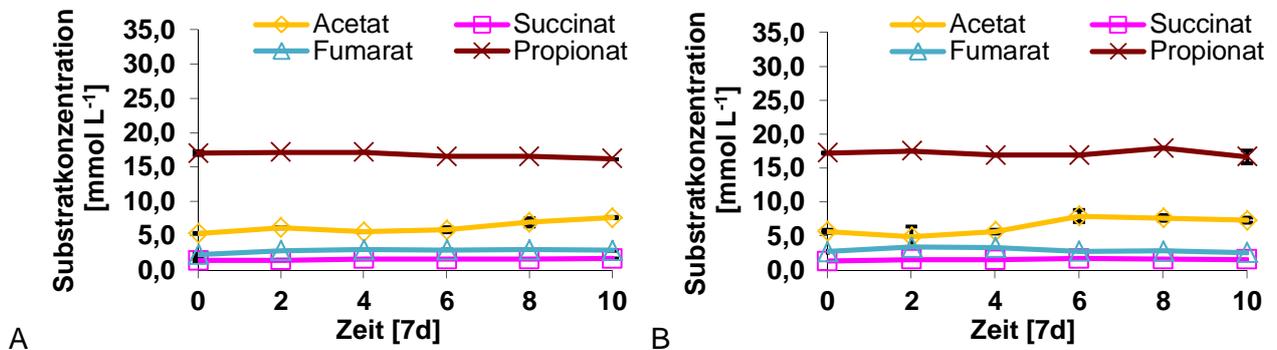


Abbildung 100: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gasphase nicht ausgetauscht, B Gasphase ausgetauscht.

Die Konzentrationen der organischen Säuren Fumarat, Succinat und Propionat schwankten in der Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 ohne Gasphasenaustausch während der gesamten Messzeit um ihre Ausgangswerte (Abbildung 100 A). In Abbildung 100 B wird eine leichte Steigerung des Acetatgehalts in Woche 6 von 5,7 mmol L⁻¹ auf 7,9 mmol L⁻¹ gezeigt, der bis Woche 10 stagnierte. Der Gehalt von Propionsäure stieg von 16,9 mmol L⁻¹ in Woche 6 bis 17,9 mmol L⁻¹ in Woche 8 leicht und sank bis Woche 10 auf 16,7 mmol L⁻¹.

Die Co-Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 zeigte keinen Umsatz der organischen Säuren und ist daher nicht gezeigt.

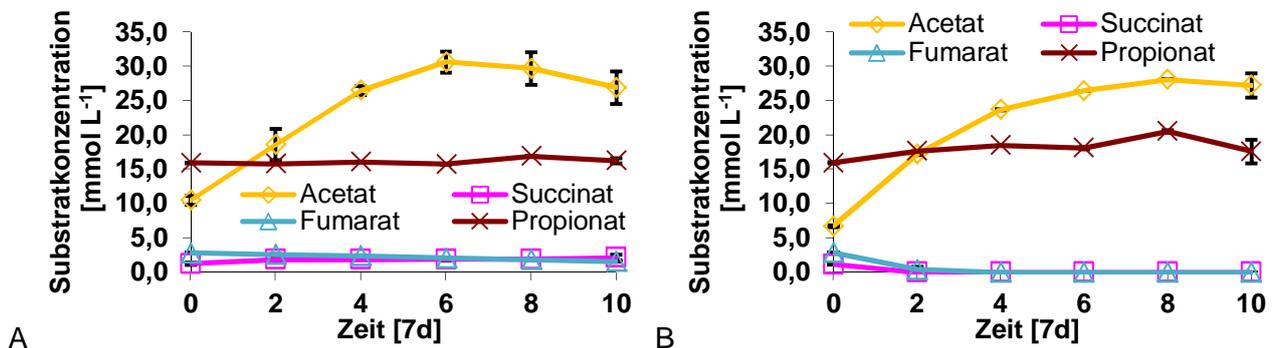


Abbildung 101: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Co-Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1, B mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1.

Die Co-Kultivierung von *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1, sowie mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 bewirkte eine Anreicherung von Acetat von 10,5 mmol L⁻¹ und 6,7 mmol L⁻¹ in Medium PI (Abbildung 101 A, B) auf Maximalwerte von 30,6 mmol L⁻¹ und 28,1 mmol L⁻¹. Die Konzentrationen von Propionat, Fumarat und Succinat änderten sich in Co-Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 (Abbildung 101 A) nicht. In Co-Kultur *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 wurden Fumarat, wie auch Succinat bis Woche 2 des Messzeitraums von (Abbildung 101 B) vollständig abgebaut.

4.7.4.2 Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit *Wolinella succinogenes*^T DSM1740

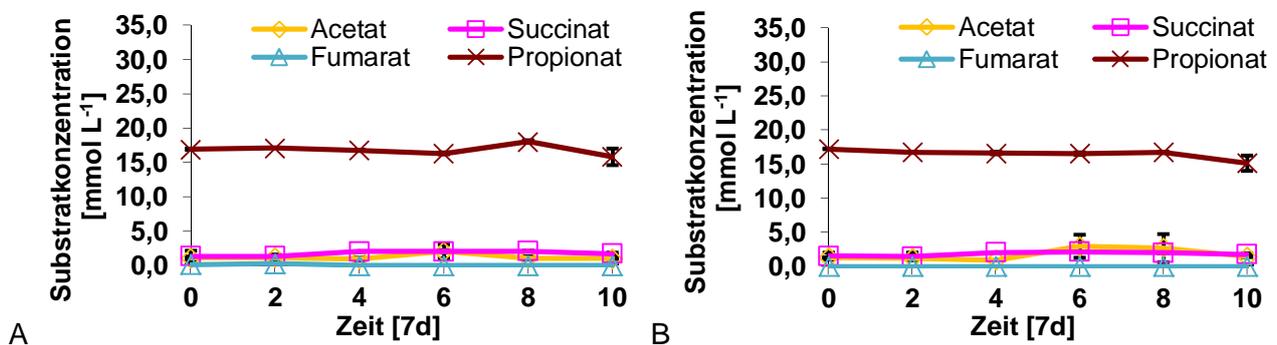


Abbildung 102: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gasphase nicht ausgetauscht, B Gasphase ausgetauscht.

Die Konzentrationen von Acetat, Fumarat und Succinat veränderten sich, sowohl in Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 ohne Gasaustausch (Abbildung 102 A) als auch in Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit Gasaustausch (Abbildung 102 B) über den gesamten Messzeitraum nicht. Propionat wurde in beiden Kulturen nicht abgebaut. In Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 ohne Gasaustausch erhöhte sich der Propionsäuregehalt leicht zwischen Woche 6 und 8 und sank bis Woche 10 wieder auf die Ausgangskonzentration.

Keine Abbildung der Co-Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 wird gezeigt, da kein Substratumsatz anhand der vier Säuren detektiert wurde.

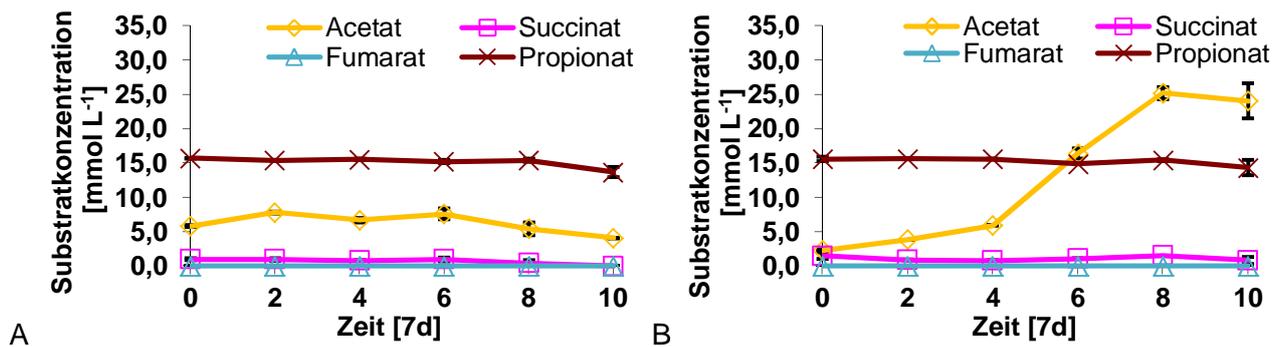


Abbildung 103: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Co-Kultur *Wolinella succinogenes*^T in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1, B mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1.

Propionsäure, Fumarat und Succinat wurden weder in der in Abbildung 103 A gezeigten Co-Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 noch in der in Abbildung 103 B gezeigten Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 umgesetzt. Die Graphen der organischen Säuren verlaufen wie die in Abbildung 102 A und B dargestellten Graphen der Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit Gasaustausch. In der Co-Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit dem Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 stieg der Acetatgehalt von 2,3 mmol L⁻¹ bis Woche 4 auf 5,9 mmol L⁻¹ leicht an, akkumulierte bis Woche 8 auf 25,2 mmol L⁻¹ im Medium PI und stagnierte bis Woche 10 (durchschnittlich 24,0 mmol L⁻¹) in etwa der Konzentration von Woche 8. Bei Co-Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit dem Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 verlief der Acetatgehalt wie in Kultur *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit Gasaustausch (Abbildung 102 B) bei einer höheren Ausgangskonzentration des Acetats von 5,8 mmol L⁻¹.

4.7.4.3 Substrate und Produkte definierter Mischkulturen mit *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261

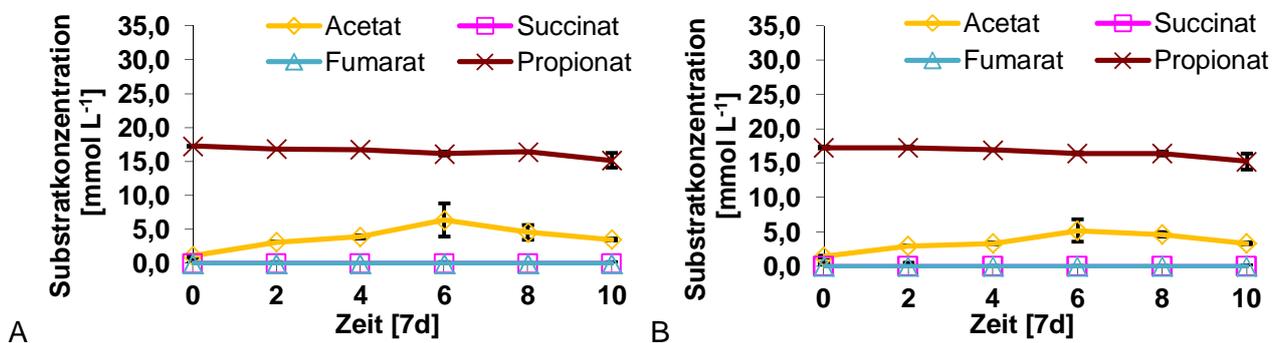


Abbildung 104: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gasphase nicht ausgetauscht, B Gasphase ausgetauscht.

Die Kulturen *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit und ohne Gasaustausch setzten kein Propionat (durchschnittliche Ausgangskonzentrationen 17,3 mmol L⁻¹), Fumarat und Succinat um (Abbildung 104 A und B). Acetat (1,2 mmol L⁻¹ und 1,4 mmol L⁻¹ Ausgangskonzentrationen) reicherte sich bis Woche 6 leicht an auf 6,4 mmol L⁻¹ und 5,2 mmol L⁻¹ und nahm bis Woche 10 wieder ab auf 3,6 mmol L⁻¹ und 3,3 mmol L⁻¹.

Die Co-Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 zeigte einen mit den Einzelkulturen vergleichbaren Substratumsatz (Abbildung 104) und ist daher nicht abgebildet.

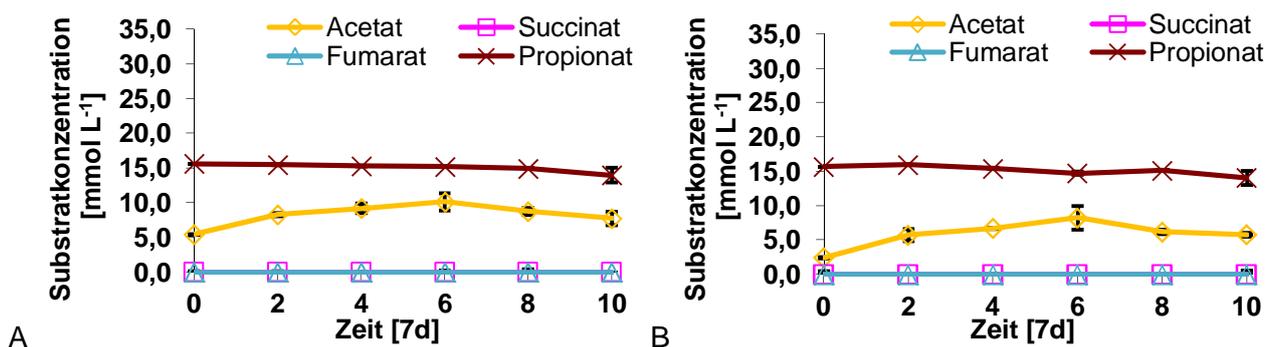


Abbildung 105: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Co-Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1, B mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1.

In Abbildung 105 A und B sind die Graphen des Acetat-, Fumarat-, Succinat- und Propionatgehalts von Co-Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1, sowie mit Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 über 10 Wochen Messzeitraum gezeigt. Der Konzentrationsverlauf der organischen Säuren entsprach dem Verlauf der Kulturen *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit und ohne Gasaustausch, wobei die Ausgangskonzentration des Acetats im Medium PI der Co-Kulturen mit 5,4 mmol L⁻¹ und 2,4 mmol L⁻¹ höher lagen und die des Propionats etwas niedriger (15,6 mmol L⁻¹ und 15,7 mmol L⁻¹) angesetzt waren.

4.7.4.4 Substrate und Produkte methanogener Eigenisolate und *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 (Negativkontrollen)

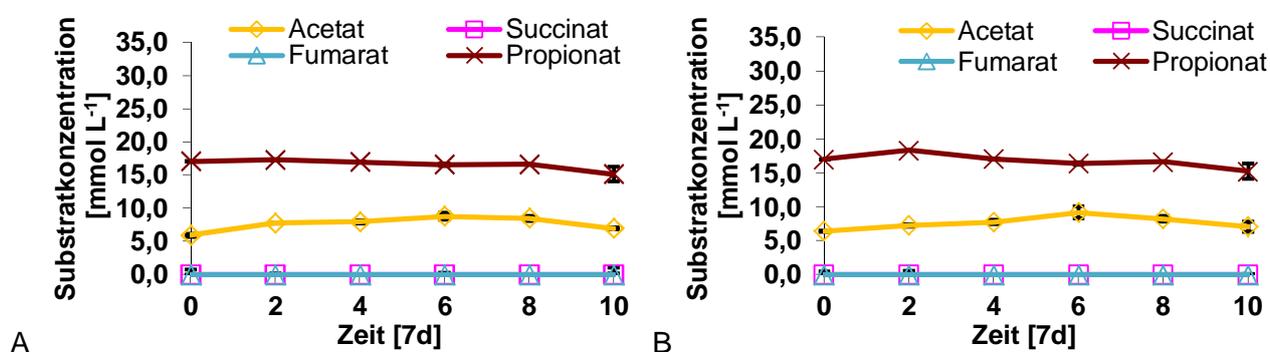


Abbildung 106: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes des Eigenisolats *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gaspase nicht ausgetauscht, B Gaspase ausgetauscht.

In der eigenisolierten Reinkultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 ohne Gasaustausch befand sich bei der Beimpfung 6,0 mmol L⁻¹ Acetat im Medium (Abbildung 106 A). Bis Woche 6 reicherte sich der Acetatgehalt auf 8,8 mmol L⁻¹ an und wurde bis zum Ende der Messungen auf 7,0 mmol L⁻¹ verringert. Zu keiner Zeit wurde die Anwesenheit von Fumarat und Succinat nachgewiesen. Der Graph der Propionsäure beschreibt ein leichtes Fallen über den gesamten Messzeitraum von 10 Wochen von anfänglich 17,1 mmol L⁻¹ auf 15,1 mmol L⁻¹ am Ende der Messungen, was nicht auf einen Abbau zurückgeführt wurde. Abbildung 106 B zeigt das Substratverhalten des Eigenisolats *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 mit Gasaustausch, welches vergleichbar mit dem Substratverhalten der in Abbildung 106 A ist. Ebenfalls wurde weder Fumarat, noch Succinat detektiert und die Propionsäure beschreibt einen ähnlich fallenden Graphen während des Messzeitraums von 17,1 mmol L⁻¹ auf 15,3 mmol L⁻¹. Die Ausgangskonzentration des Acetats im Medium der Kultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 mit Gasaustausch lag bei vergleichbaren 6,4 mmol L⁻¹. Acetat stieg bis Woche 6 auf 9,2 mmol L⁻¹ und wurde bis zum Ende der Messungen auf 7,1 mmol L⁻¹ dezimiert.

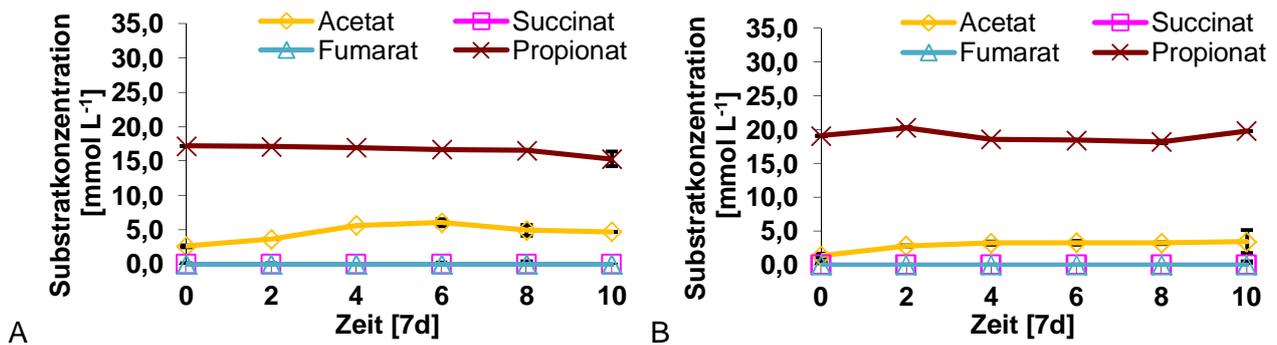


Abbildung 107: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gasphase nicht ausgetauscht, B Gasphase ausgetauscht.

Der Gehalt von Propionsäure fiel im Medium PI der Kultur des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 ohne Gasaustausch (Abbildung 107 A) wie in den Kulturen *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 mit und ohne Gasaustausch (Abbildung 106 A und B) von 17,3 mmol L⁻¹ auf 15,3 mmol L⁻¹. Acetat erfuhr eine leichte Erhöhung bis Woche 6 auf 6,1 mmol L⁻¹, wobei die Ausgangskonzentration von 2,6 mmol L⁻¹ niedriger lag als bei den Kulturen *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 mit und ohne Gasaustausch. Mit wöchentlichem Austausch der Gasphase über Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 schwankte der Gehalt der Propionsäure um die Ausgangskonzentration von 19,1 mmol L⁻¹ auf maximal 20,3 mmol L⁻¹ in Woche 2 und minimal 18,2 mmol L⁻¹ in Woche 8 (Abbildung 107 B). Auch die Konzentration von Acetat stieg nur unwesentlich von 1,4 mmol L⁻¹ auf 3,3 mmol L⁻¹ bis Woche 6 und verweilte auf dem Stand bis Woche 10 (3,4 mmol L⁻¹). Auch in dieser Kultur waren weder Fumarat noch Succinat im Medium vorhanden.

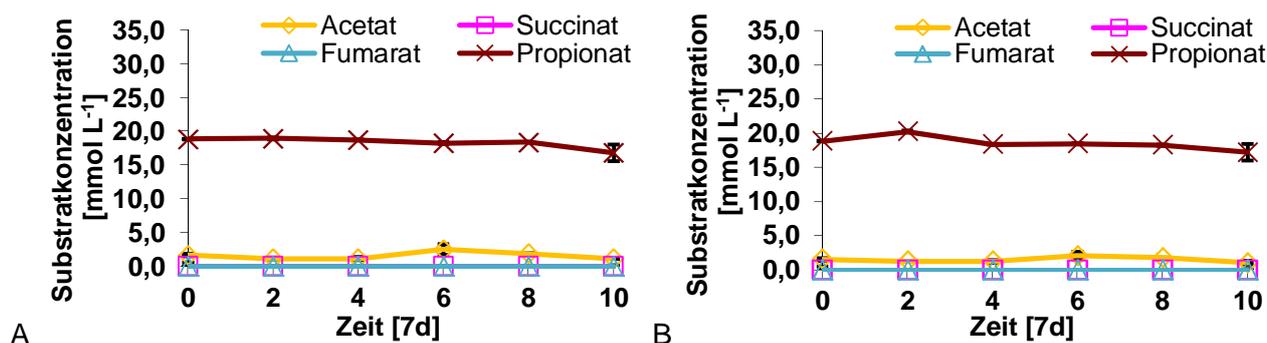


Abbildung 108: Propionat (braun), Acetat (orange), Fumarat (hellblau) und Succinat (pink) [mmol L⁻¹] des zellfreien Kulturüberstandes aus der Kultur *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 in PI-Medium über einen Messzeitraum von 10 Wochen [7d] mit Standardabweichungen; A Gasphase nicht ausgetauscht, B Gasphase ausgetauscht.

Die Kulturen *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 mit und ohne Gasaustausch setzten während der HPLC-Messungen keine Propionsäure um (Abbildung 108 A und B). In Abbildung 100 B stieg der Propionsäuregehalt kurzzeitig von 18,9 mmol L⁻¹ auf 20,1 mmol L⁻¹ bis Woche 2 und fiel wieder bis Woche 4 auf 18,4 mmol L⁻¹, worauf sich der Propionsäuregehalt bis zum Ende der Messungen stabil hielt. Wieder wurden kein Fumarat und kein Succinat im filtrierten Medium PI der Kultur gemessen. Der Acetatgehalt erhöhte sich bis Woche 6 geringfügig von 1,6 mmol L⁻¹ mmol L⁻¹ und 1,5 mmol L⁻¹ auf 2,5 mmol L⁻¹ und 2,1 mmol L⁻¹ und verringerte sich bis Woche 10 wieder auf jeweils 1,1 mmol L⁻¹.

4.7.5 Methanbildung durch methanogene Archaea

Das Methanbildungsverhalten Methan bildender Archaea, wurde in dieser Arbeit mit einem Gaschromatographie-System (Kapitel 3.6.2) ermittelt. Ebenfalls wurde das Wachstum Methan bildender Archaea mit diesem System regelmäßig kontrolliert. Auch die Methanproduktion in propionsäureabbauenden Mischkulturen und in den definierten Co-Kulturen bakterieller DSMZ Typstämme mit methanogenen Archaea wurde überprüft. Das Messsystem wurde auf einen externen Standard eingestellt, der aus gasförmigem Methan bestand. Rohdaten siehe ‚Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\Methanstandards‘.

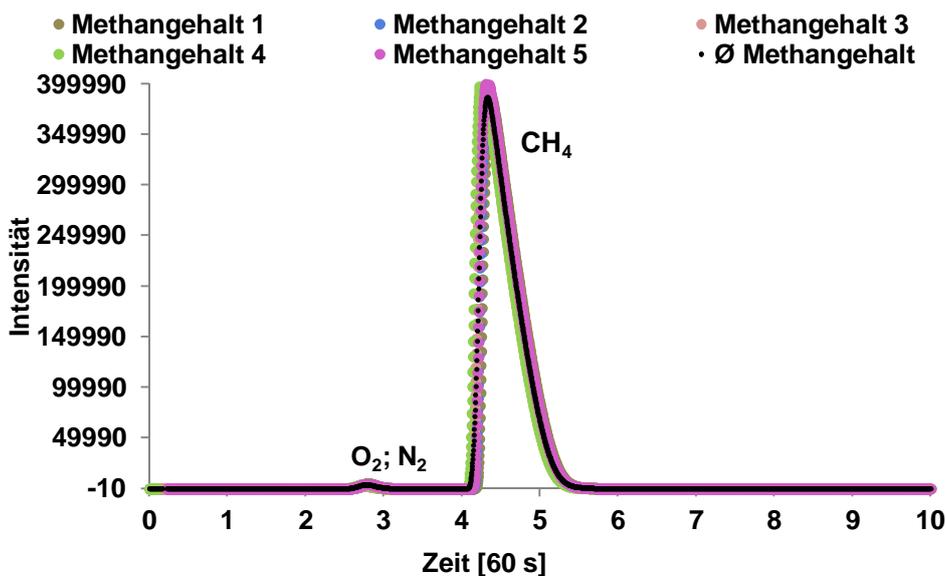


Abbildung 109: Gemittelter Methanstandard (Ø Methangehalt; schwarze Punkte) aus der Intensität von fünf Methanmessungen mit reinem Methan (Methangehalt 1-5) gegen die Messdauer in Minuten.

Aus den Messwerten der Proben wurden Mittelwerte gebildet, anhand Formel 33 die Methankonzentrationen berechnet und die Standardabweichungen (Formel 32) bestimmt.

4.7.5.1 Methanbildung syntroph propionsäureoxidierender Mischkulturen

Propionsäureabbauende Kulturen wurden nach 10 Wochen Inkubation auf ihren Methangehalt gaschromatographisch analysiert (Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\P_abbauer').

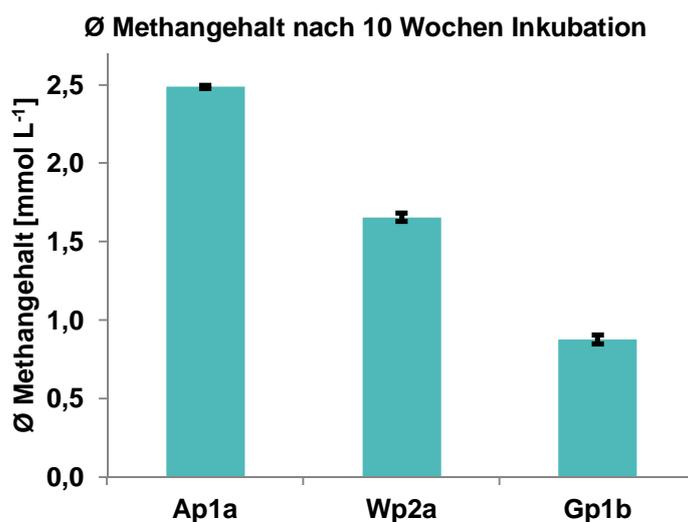


Abbildung 110: Durchschnittlicher Methangehalt nach 10 Wochen Inkubation ohne Gasaustausch in [mmol L⁻¹] der Kulturen Ap1a, Wp2a und Gp1b mit Standardabweichung.

Methanmessungen von propionsäureabbauenden Kulturen zeigten einen geringen Methangehalt (Abbildung 110). Mischkultur Ap1a wies den höchsten Methangehalt vor, was die hohen Ergebnisse der Umsetzung von kurzkettigen Fettsäuren (Kapitel 4.7.1) im Vergleich zu den anderen propionsäureabbauenden Kulturen bestätigte. Auch in den Mischkulturen Wp2a und Gp1b waren geringe Mengen Methan gaschromatographisch detektierbar, obwohl in DNA-Analysen keine archaeale 16S rDNA amplifiziert wurde (Kapitel 4.6).

4.7.5.2 Methanbildung definierter Mischkulturen anaerober Bakterien mit methanogenen Archaea

Kulturen der DSMZ Typstämme *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261, *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 und *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292, sowie definierte Co-Kulturen dieser Typstämme mit eigenisolierten methanogenen Archaea *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 sowie *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 beziehungsweise *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 wurden ebenfalls gaschromatographisch auf den Methangehalt analysiert. Die Rohdaten befinden sich auf der Rohdaten CD mit dem Pfad ‚Chemische_Analyse\GC_Messungen\bakT_CoKult‘.

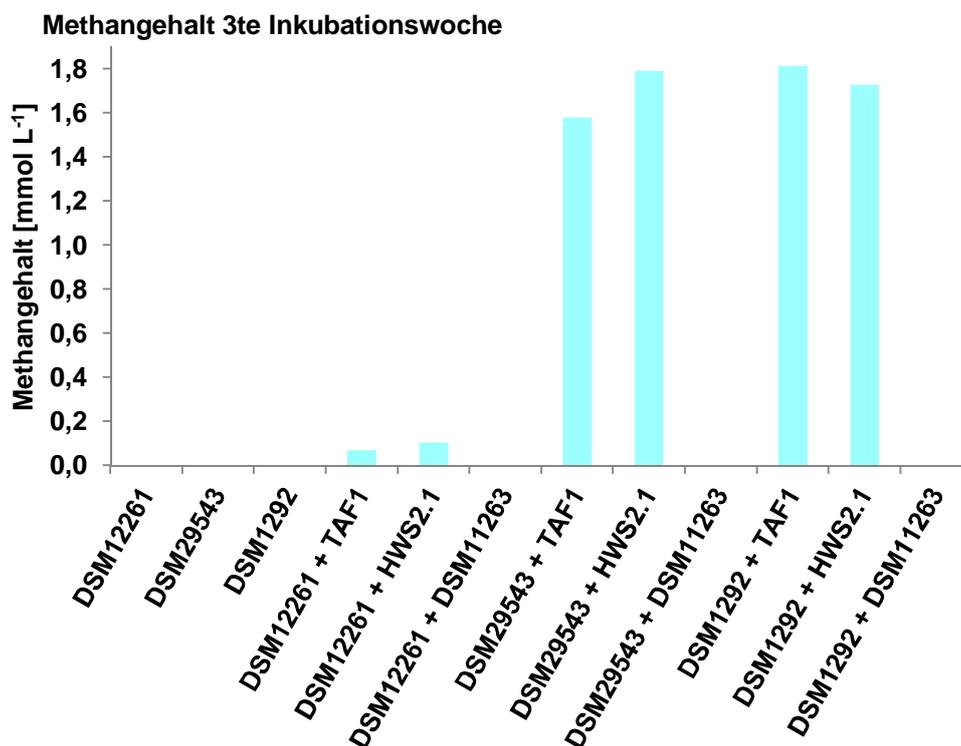


Abbildung 111: Methangehalt [mmol L⁻¹] der 3ten Inkubationswoche der bakteriellen DSMZ-Typstämme *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261, *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 und *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 einzeln beziehungsweise in Co-Kultur mit den Eigenisolaten *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1, *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 sowie *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 in PI-Medium vor dem Gasaustausch.

In der 3ten Inkubationswoche der definierten Co-Kulturen von DSMZ Typstämmen mit eigenisolierten methanogenen Archaea wurde innerhalb einer Woche produziertes Methan in geringen Mengen gaschromatographisch ermittelt (Abbildung 111). Dabei waren die Co-Kulturen des bakteriellen Typstammes *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit eigenisolierten methanogenen Archaea in Woche 3 im Vergleich zu den Co-Kulturen der DSMZ Typstämme *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 sowie *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 um mehr als 15fach weniger aktiv. Dies bestätigte die geringen Werte des Stoffwechsels kurzkettiger Fettsäuren der Kulturen mit *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261, die mit dem HPLC-System gemessen wurden (Abbildung 105). Die Gasphasen der Kulturen ohne methanogene Archaea enthielten kein Methan.

Ebenfalls digital sind die Rohdaten der Methanmessungen der Kulturen *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1, *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 und *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 in PI-Medium dieser Arbeit beigefügten CD digital gespeichert („Rohdaten_CD \Chemische_Analyse\GC_Messungen\bakT_CoKultG_ther ...\HWS2_1_in_PI ...\TAF1_in_PI“).

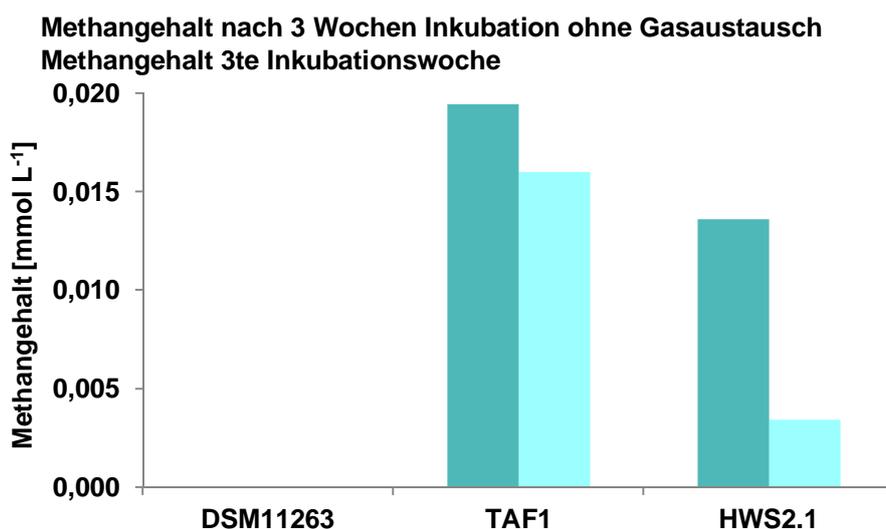


Abbildung 112: Methangehalt nach 3 Wochen Inkubationszeit (blaugrüne Säulen) sowie in der 3ten Inkubationswoche (türkise Säulen) in [mmol L⁻¹] der Kulturen *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263, *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 und *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 in PI-Medium.

Abbildung 112 zeigt, dass die produzierten Methanmengen der Kulturen *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 respektive *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 im Vergleich zu den definierten Co-Kulturen mit *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 um eine Potenz geringer waren (Abbildung 111). Der mit wöchentlichem Gasaustausch behandelte hydrogenotrophe *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 bildete innerhalb der dritten Woche den größten Teil Methan, was der Methangehalt der Kultur des gleichen Stamms innerhalb der 3 wöchigen Gesamtdauer der Inkubation zeigte. TAF1 in PI-Medium zeigte zudem innerhalb einer Woche einen

höheren Stoffwechsel als der hydrogenotroph/acetoklastisch/methylotrophe *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 (türkise Säulen in Abbildung 112). Der gasförmige Kulturüberstand des Typstamms *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 enthielt in beiden Fällen kein Methan.

4.7.5.3 Methanbildung eigenisolierter Reinkulturen und Typstämmen methanogener Archaea

Methanogene Eigenisolate sowie Typstämmen wurden für gaschromatographische Messungen in 100 mL Serumflaschen mit durch Aluminiumkappen fixierten Butylstopfen in 18 mL Medium (Kapitel 2.6, Seite 84) ohne Acetat 1:10 verdünnt beimpft und inkubiert. Das Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ diente als Substratquelle für die hydrogenotrophe Methanogenese, außer für die Kultur *Methanosaeta concilii* BEG4, welche ausschließlich auf acetoklastischem Weg Methan herstellte (Kapitel 4.4). Der Titer bei frisch beimpften Kulturen des Archaeon *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 lag durchschnittlich bei 10¹⁰ Zellen · L⁻¹ und der von Kulturen des Mikroorganismus *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 durchschnittlich bei 10¹¹ Zellen · L⁻¹. Um das Substratverhalten von H₂ und CO₂ unterschiedlicher methanogener Stämme in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu charakterisieren, wurden die täglich maximale Methanproduktion pro Liter sowie der maximale Methangehalt pro Liter als vergleichbare Werte herangezogen. Um die Anzahl der Detektionswerte ‚n‘ abzugrenzen, wurde ‚k‘ als die Anzahl der verwendeten Tagesmittelwerte zur Berechnung des gemittelten Maximalwerts der Methanproduktion eingeführt. Messwerte der Methanproduktion verschiedener Kulturen gleicher Stämme in Abhängigkeit der Inkubationszeit wurden nicht zusammengefasst analysiert, da das zeitlich abhängige Produktionsverhalten der einzelnen Kulturen zu große Unterschiede zeigte (Abbildung 116). Die tägliche Methanproduktion pro Zelle wurde bei der hydrogenotrophen Kultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 (Abbildung 119) bestimmt, da aufgrund des Vorliegens einzelner Zellen bei dieser Kultur das Zählen der Zellen in einer Toma-Kammer durchgeführt wurde (Kapitel 3.4.1.2). Dabei wurde ‚l‘ als die Anzahl der Zellen bestimmt, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der stationären Phase gezählt worden waren.

4.7.5.3.1 Methanbildung des Typstamms *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535

Eine Kultur des Typstamms *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 wurde beimpft und die Gasphase nach der Erreichung des Maximalgehalts von Methan nach den Messungen ausgetauscht (‚Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\Mb_formicicum\Mb_f‘).

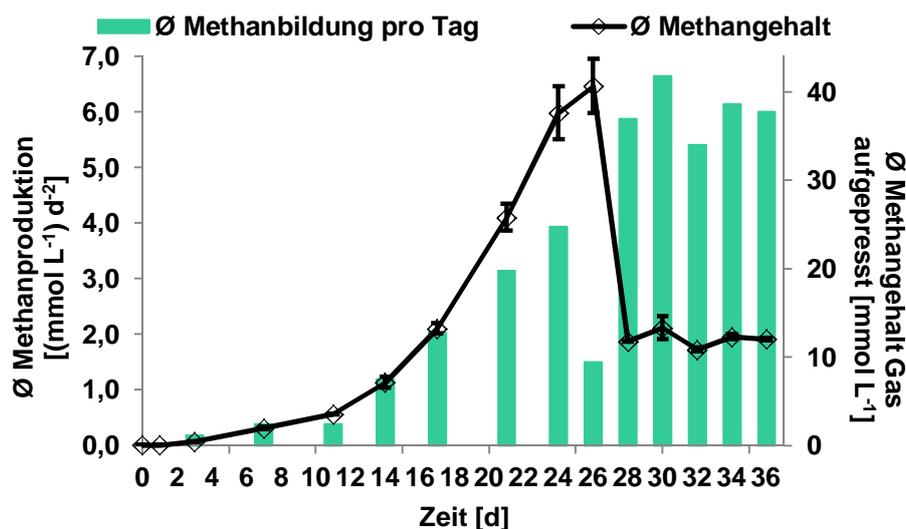


Abbildung 113: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Die Kultur *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 produzierte zwischen Inkubationstag 17 und 24 durchschnittlich $3,54 \pm 0,398$ mmol L⁻¹ ($k = 2$) hydrogenotroph Methan pro Tag (Abbildung 113). Ab dem Zeitpunkt, seit dem die Gasphase nach jeder Messung ausgetauscht wurde, produzierte die Kultur durchschnittlich $6,02 \pm 0,399$ mmol L⁻¹ ($k = 5$) Methan am Tag. Die Methanmenge in der Gasphase lag an den entsprechenden Messtagen durchschnittlich bei $12,04 \pm 0,8$ mmol L⁻¹. Die Substrate CO₂ und H₂ für die hydrogenotrophe Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.1) des Typstammes lagen somit im Überschuss vor.

Kulturen des Typstamms *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 wurden parallel inkubiert. Bei einer Kultur des Typstamms wurde die Gasphase nach jeder Messung mit einem Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ ausgetauscht und bei der anderen Kultur nicht. Zunächst täglich beziehungsweise alle zwei Tage wurden gaschromatographische Messungen durchgeführt (siehe ‚Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\Mb_formicicum\Mb_f_parallel‘).

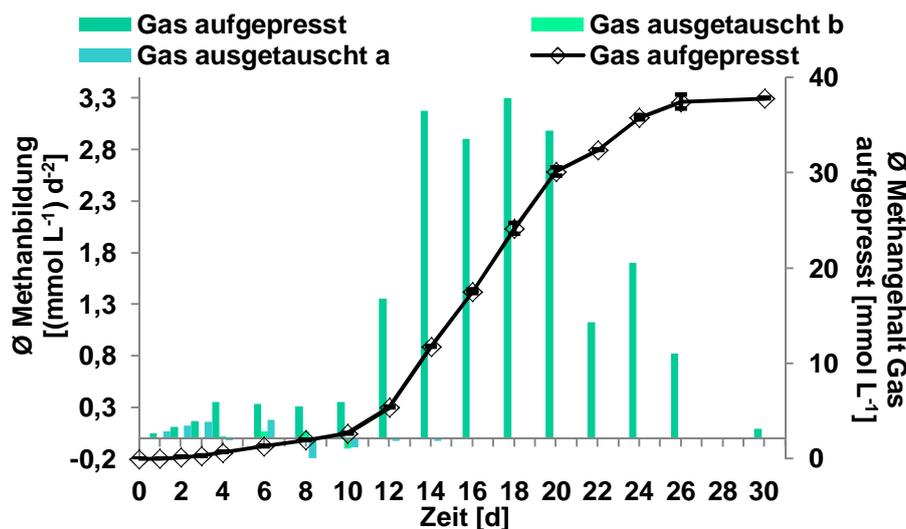


Abbildung 114: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 gegen die Inkubationszeit in Tagen; Gas ausgetauscht a (türkise Balken) Abbruch der Messungen nach 16 Tagen; Gas ausgetauscht b (helltürkise Balken); Abbruch der Messungen nach 14 Tagen.

Die Kultur, die keinen Gasaustausch nach jeder Messung erfuhr (Abbildung 114, türkise Säulen), bildete nach einer 4 tägigen Ruhephase und einer darauffolgenden 8 tägigen Anlaufphase kontinuierlich Methan mit einer durchschnittlichen Methanproduktion von $3,1 \pm 0,16$ mmol L⁻¹ ($k = 4$) bis zum 20ten Inkubationstag. Dieser durchschnittliche Maximalwert der Methanbildung bestätigte den Wert der Kultur gleichen Stamms in Abbildung 113. Aufgrund der zunehmenden Sättigung der Gasphase (Abbildung 113) mit Methan verringerte sich daraufhin die Methanproduktion pro Tag. Am Tag 30 wurde dieses Experiment beendet, da in der Gasphase der Kultur nur noch Methan vorlag. Die Parallelkultur, welche nach jeder Messung einem Gasaustausch unterzogen wurde, zeigte eine rückläufige Methanproduktion, weshalb die Inkubation nach 16 Tagen beendet und die Kultur verworfen wurde. Der parallel kultivierten Typstämme *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 nachgeschaltet, wurde eine weitere Kultur beimpft und mit dem Gasaustausch nach jeder Messung behandelt. Auch diese zeigte keine steigende Methanproduktion, woraufhin auch diese Kultur nach 14tägiger Inkubation verworfen wurde.

4.7.5.3.2 Methanbildung des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1

Während der Inkubation einer aus einem Laborfermenter (Klocke *et al.* 2007) eigenisierte Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 wurde nach jeder Messung die Gasphase ausgetauscht. Der Auswertung zu Grunde liegende Daten befinden sich auf der Rohdaten CD ‚Chemische_Analyse\GC_Messungen\LFP4_1\LFP4_1gasausgetauscht‘.

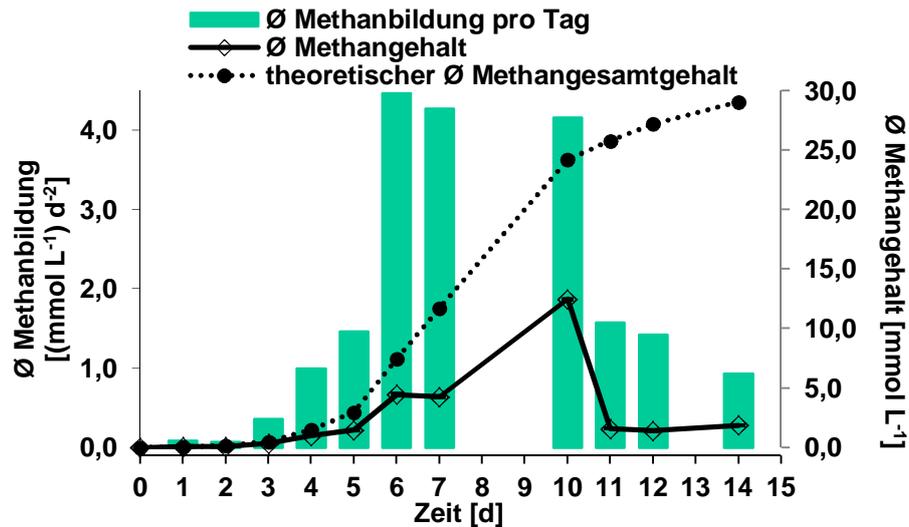


Abbildung 115: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) und den daraus errechneten Werten des theoretischen Methangesamtgehalts (gepunktete Linie mit Berechnungswertpunkten) der Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

In Abbildung 115 ist der durchschnittliche Methangehalt (Rauten) der Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 und die daraus resultierende Methanproduktion pro Tag (Balken) gezeigt. Nach jeder Messung wurde die Gasphase über der Kultur durch ein Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ ersetzt. Die methanogene Kultur LFP4.1 zeigte zu Beginn der Messreihe eine Ruhe-Phase von 2 Tagen. Beginnend mit dem 3ten Inkubationstag befand sich die Kultur in einer 5 tägigen Anlaufphase und bildete vom 6ten bis zum 10ten Inkubationstag konstant durchschnittlich $4,3 \pm 0,12$ mmol L⁻¹ ($k = 3$) Methan. Bis Tag 14 verringerte sich die Methanproduktion der Kultur stetig, daher wurde die Messreihe mit diesem Tag beendet und die Kultur in frisches Medium überimpft.

Zwei weitere Kulturen des Mikroorganismus *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 wurden zu unterschiedlichen Zeiten inkubiert und der Methangehalt zu unterschiedlichen Zeitpunkten gaschromatographisch überprüft („Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\LFP4_1“).

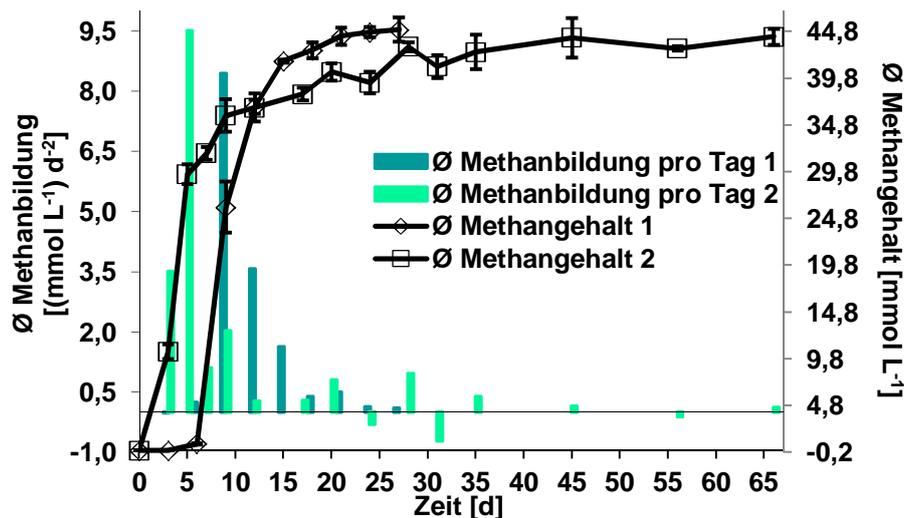


Abbildung 116: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (blaugrüne Säulen, erste Kultur LFP4.1; helltürkise Säulen, zweite Kultur LFP4.1) mit dem durchschnittlichen Methangehalt der Kulturen [mmol L^{-1}] (Rauten mit Standardabweichung, erste Kultur LFP4.1; mit Quadrate mit Standardabweichung, zweite Kultur LFP4.1) der Kulturen des Mikroorganismus *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 gegen die Inkubationszeit in Tagen; Ende der Inkubation Tag 27, erste Kultur LFP4.1, Tag 66, zweite Kultur LFP4.1.

Das Methanproduktionsverhalten der beiden über unterschiedliche Zeitintervalle inkubierten Kulturen des Mikroorganismus *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 wurde in Abbildung 116 graphisch zusammengefasst. Kultur 1 wies eine 6 tägige Ruhephase der Methanproduktion nach der Überimpfung auf, wohingegen Kultur 2 ohne Ruhephase direkt nach der Überimpfung die Methanproduktion steigerte. Die erste Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 produzierte täglich höchstens $8,4 \text{ mmol L}^{-1}$ Methan zwischen dem 6ten und 9ten Tag, wobei die zweite Kultur des Stamms eine tägliche Höchstproduktion mit $9,1 \text{ mmol L}^{-1}$ innerhalb 2 Tagen zwischen dem 3ten und 5ten Inkubationstag erzielte. Die Messreihe der ersten Kultur wurde aus diesem Grund nach 27 Tagen beendet und die Kultur in frisches Medium überimpft. Kultur 2 wurde weiterführend inkubiert, bis sich der Methangehalt der Gasphase dieser Kultur dem bei 1 bar Überdruck maximal möglichen Wert angenähert hatte. Im Gegensatz zum Methanbildungsverhalten des Typstammes *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535 lag die tägliche maximale Methanbildungsrate des Stamms LFP4.1 höher als die Gasphase nicht nach jeder Messung ausgetauscht wurde.

4.7.5.3.3 Methanbildung des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1

Eine Reinkultur des Eigenisolats *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 aus dem ersten Fermenter der BGA Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR (Tabelle 18) wurde 21 Tage mit begleitenden Methanmessungen (alle 3 Tage) inkubiert („Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\TAF1“).

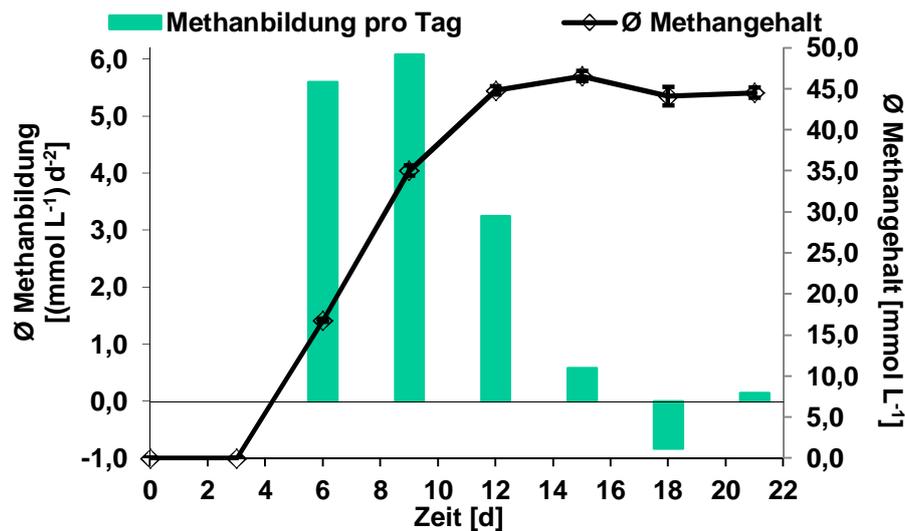


Abbildung 117: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Nach einer Ruhephase der Methanproduktion von 3 Tagen nach Beimpfung der Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 wurde pro Tag durchschnittlich $5,84 \pm 0,24$ mmol L⁻¹ ($k = 2$) bis einschließlich Tag 9 produziert. Die maximale Methanproduktionsrate der Kultur TAF1 lag somit zwischen den Werten des Typstammes (Abbildung 113 und Abbildung 114) und des Stammes LFP4.1 (Abbildung 116).

4.7.5.3.4 Methanbildung des Eigenisolats *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1

Die aus der Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 entstandene hydrogenotrophe Reinkultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 wurde mit einer Zellzahl von $1,3 \cdot 10^{10}$ Zellen L⁻¹ beimpft und parallel die Zellzahl und der Methangehalt bestimmt. Die Auswertung gründet auf den Messdaten, welche sich auf der Rohdaten CD unter dem Pfad ‚Chemische_Analyse\GC_Messungen\TAF1_1‘ befinden.

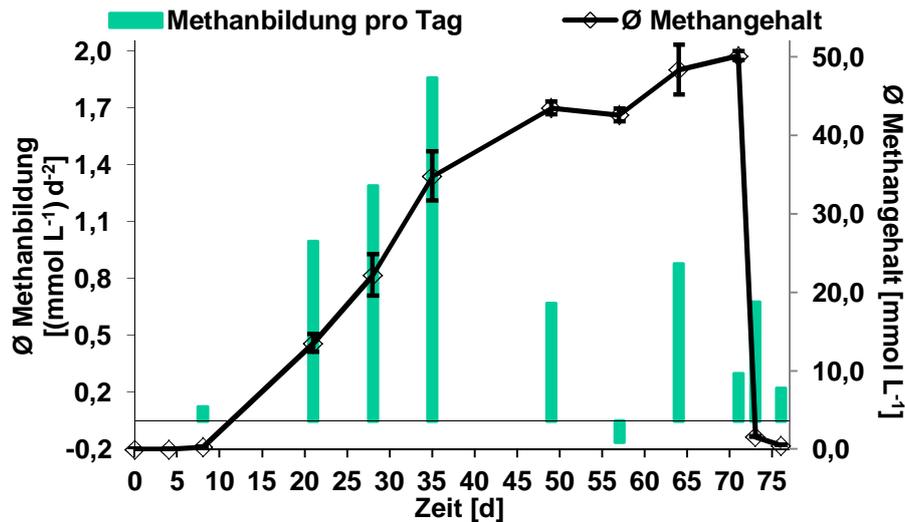


Abbildung 118: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Die Methanproduktion durch die Reinkultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 verlief nach einer 2 tägigen Ruhephase, gefolgt von einer 20 tägigen Anlaufphase diskontinuierlich bis zur Erreichung des maximal möglichen Methangehalts über der Kultur an Tag 71 (Abbildung 118). Nachdem der maximale Methangehalt erreicht war, wurde auch hier die Gasphase ausgetauscht. Diese Maßnahme erbrachte nach kurzem Anstieg der Methanproduktion wieder eine Verringerung der Methanherstellung, daher wurde das Experiment nach Tag 76 beendet und die Kultur in frisches Medium überführt.

Unter Einbeziehung der Zellzahl der Kultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 über die Inkubationszeit, wurde die Methanproduktion pro Zelle berechnet.

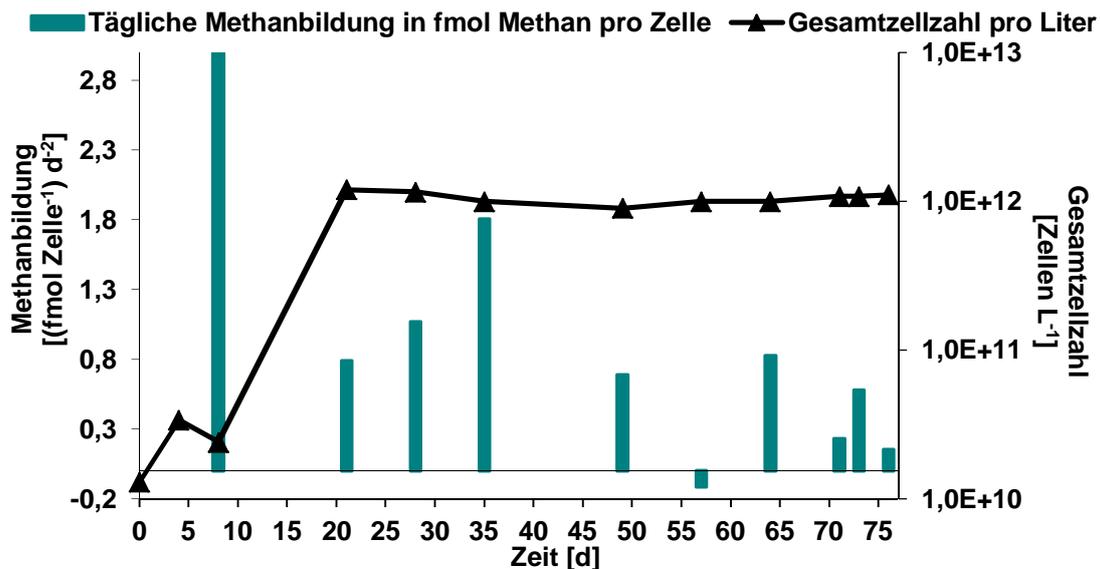


Abbildung 119: Durchschnittliche Methanbildung pro Zelle am Tag der Kultur *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 (Säulen) mit Zellzahl pro Liter (Dreiecke) gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Abbildung 119 zeigt, dass sich die tägliche Methanproduktion pro Zelle (blaugüne Säulen) und die Steigerung der Gesamtzellzahl *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 (mit schwarzer Linie verbundene Dreiecke) gegenläufig zueinander verhalten. Während des Wachstums der Kultur (Messpunkte 2, Tag 4 und 4, Tag 21), wurde weniger Methan gebildet als bei Stagnation der Zellzahl (Messpunkte 3, Tag 8, 5, Tag 28 und 6, Tag 35). Zellen in geringerer Dichte (Messpunkte 3, Tag 8, $2,4 \cdot 10^{10}$ fmol Zelle⁻¹) wiesen mit $2,99$ fmol Zelle⁻¹ eine höhere Methanproduktion auf im Vergleich zu den Zellen mit finaler Zelldichte (ab Messpunkt 4, 21ter Inkubationstag, durchschnittlich $1,06 \cdot 10^{12} \pm 8,8 \cdot 10^{10}$ Zellen, $I = 9$). Die Kultur befand sich ab dem 4ten Messpunkt (Tag 21) in der stationären Phase des Zellwachstums. Die berechnete Teilungsrate v (Kapitel 1.5.1.3) zwischen Beimpfung und stationärer Phase betrug durchschnittlich $0,029$ h⁻¹, woraus eine durchschnittliche Generationszeit g (Kapitel 1.5.1.3) von umgerechnet $1,44$ d für den Stamm *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 resultierte. Der Maximalwert der täglichen Methanproduktion pro Zelle in der stationären Phase betrug $1,81$ fmol · Zelle⁻¹ am 6ten Messpunkt (Tag 35). Wie in Abbildung 118 ist auch in dieser graphischen Darstellung (Abbildung 119) die diskontinuierliche Methanproduktion der Kultur TAF1.1 zu sehen. Der Austausch der Gasphase nach den Methanmessungen ab Messpunkt 10 (Tag 71) induzierte kein weiteres Zellwachstum.

4.7.5.3.5 Methanbildung des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053

Der Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 wurde ebenfalls in Medium ohne Acetat und mit dem Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ als Substratquelle für die hydrogene Methanogenese kultiviert und der Methangehalt zunächst wöchentlich gemessen. Das Gasgemisch wurde nach

jeder Messung bis auf einen Überdruck von 1 bar aufgepresst, um den Substratgehalt im Überschuss zu gewährleisten.

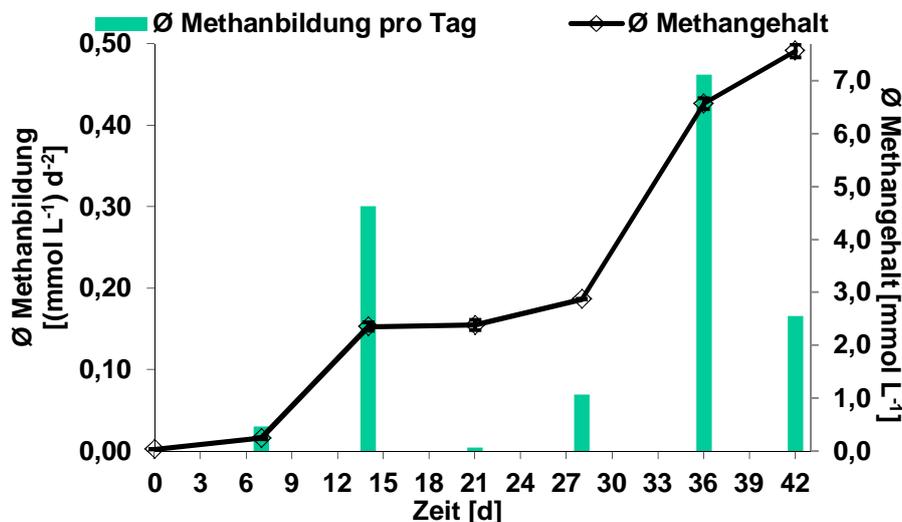


Abbildung 120: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Während 42 tägiger Inkubationsdauer produzierte der Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 mit schwankender Rate Methan (Abbildung 120). Nach einer Ruhe- beziehungsweise geringen Anlaufphase zeigte der Typstamm eine Methanproduktionsrate von 0,3 mmol L⁻¹ zwischen den Inkubationstagen 7 bis 14. In der darauffolgenden Woche stagnierte die Methanproduktion bis Tag 21 (Messpunkt 4) und steigerte sich zunächst leicht bis Messtag 28 und bis Tag 36 wieder verstärkt mit einer durchschnittlichen Maximalproduktion von 0,46 mmol L⁻¹ Methan pro Tag. Aufgrund erneutem Abfall der täglichen Methanproduktionsrate bis Messtag 42 und Verringerung der Autofluoreszenz der Zellen (Kapitel 3.4.1) wurde die Messreihe beendet und die Kultur in frisches Medium überimpft. Der finale Methangehalt im Gasüberstand der Kultur betrug $7,57 \pm 0,012$ mmol L⁻¹, was deutlich unter dem berechneten maximal möglichen Methangehalt (100 % Methan) von 38,9 mmol L⁻¹ lag.

4.7.5.3.6 Methanbildung des Eigenisolats *Methanosarcina mazei* Stamm BEG3

Der Stamm BEG3 des Mikroorganismus *Methanosarcina mazei* aus dem Fermenter der BGA BioEnergie Glahn (Tabelle 18) wurde ebenfalls hydrogenotroph mit nach jeder Messung aufgepresstem Substrat kultiviert. Die gaschromatographischen Messdaten befinden sich digital archiviert auf der Rohdaten CD „Chemische_Analyse\GC_Messungen\BEG3“.

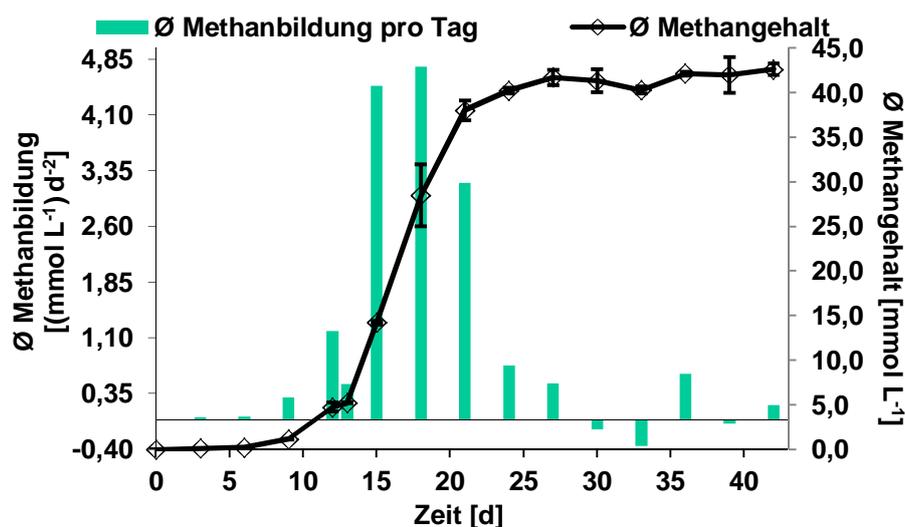


Abbildung 121: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanosarcina mazei* Stamm BEG3 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Nach der Beimpfung ruhte die Kultur *Methanosarcina mazei* Stamm BEG3 bis zum 6ten Inkubationstag (Messpunkt 3, Abbildung 121). Zwischen Inkubationstag 15 und 18 produzierte die Reinkultur nach einer unregelmäßigen Anlaufphase innerhalb von 3 Tagen durchschnittlich 4,75 mmol L⁻¹, was die maximal mögliche Produktionsrate dieser Kultur darstellte. Im Vergleich zu der maximalen Produktionsrate des Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053 (0,46 mmol L⁻¹, Abbildung 120) lag die Rate dieses Eigenisolats gleicher Art aus einer Biogasanlage um ein 10faches höher. Auch die Produktionsgeschwindigkeit der Kultur BEG3 war höher als die des dazugehörigen Typstamms. Die tägliche Methanproduktionsrate flachte aufgrund der Anreicherung des Methangehalts in der Gasphase über der Kultur bis zum finalen Wert von 42,628 ± 0,647 mmol L⁻¹ Methan (Messtag 42) ab.

4.7.5.3.7 Methanbildung des Eigenisolats *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1

Aus dem Fermenter der BGA Hubert Wagner & Sohn GbR (Tabelle 18) wurde in dieser Arbeit unter anderen die Kultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 isoliert. Diese Kultur wurde über 57 Tage mit 80 % H₂ und 20 % CO₂ als Substrat für gaschromatographischen Messungen mit Aufpressen des Gasgemisches nach jeder Messung auf 1 bar Überdruck inkubiert (Rohdaten siehe ‚Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\HWS2_1‘).

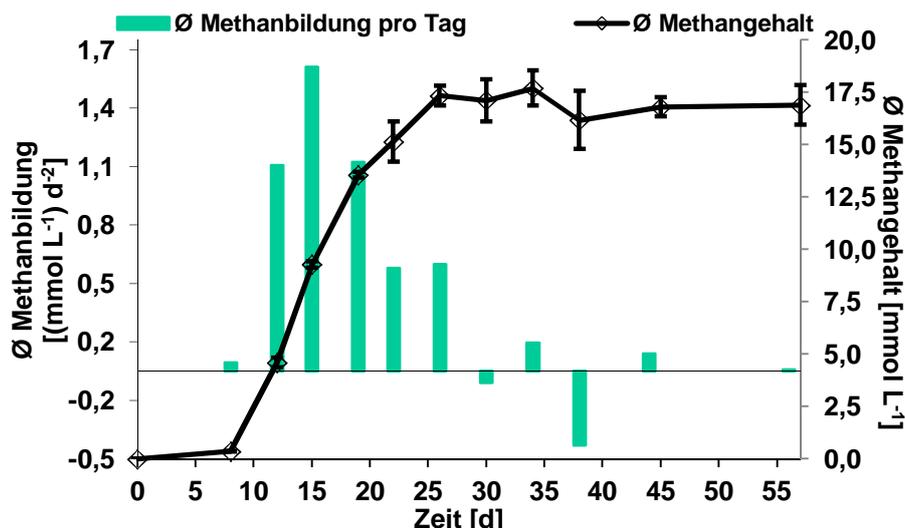


Abbildung 122: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Die hydrogenotroph wachsende Kultur *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 hielt nach der Beimpfung eine 8 tägige Ruhephase mit geringer Methanproduktion ein, bevor die Methanherstellung gesteigert wurde (Abbildung 122). Zwischen den Inkubationstagen 12 und 15 erreichte die Kultur ihren täglichen Maximalwert der Methanproduktion von 1,56 mmol L⁻¹, welche aufgrund des langsameren Stoffwechsels (Tabelle 5) niedriger lag als die maximalen Produktionsraten der hydrogenotroph wachsenden Kulturen (Abbildung 113 bis Abbildung 119). Am Inkubationstag 26 war ein Maximalmethangehalt von 17,35 ± 0,49 mmol L⁻¹ erreicht. Dieser Maximalgehalt lag niedriger als der theoretisch maximal mögliche Gehalt an Methan (38,9 mmol L⁻¹) jedoch höher als der des zur gleich Gattung zugeordneten Typstamms *Methanosarcina mazei*^T DSM2053.

4.7.5.3.8 Methanbildung des Eigenisolats *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4

Eine weitere Reinkultur aus dem Fermenter der BGA BioEnergie Glahn, *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4 (Tabelle 18), wurde mit gaschromatographischen Messungen begleitet (Rohdaten siehe ‚Rohdaten CD\Rohdaten_CD\Chemische_Analyse\GC_Messungen\BEG4‘). Diese Kultur wurde im modifizierten Medium 287 (Kapitel 2.6, Seite 84) mit Acetat als Quelle für die acetoklastische Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2) kultiviert, da *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4 kein Wachstum mit anderen Substraten zeigte (Tabelle 31).

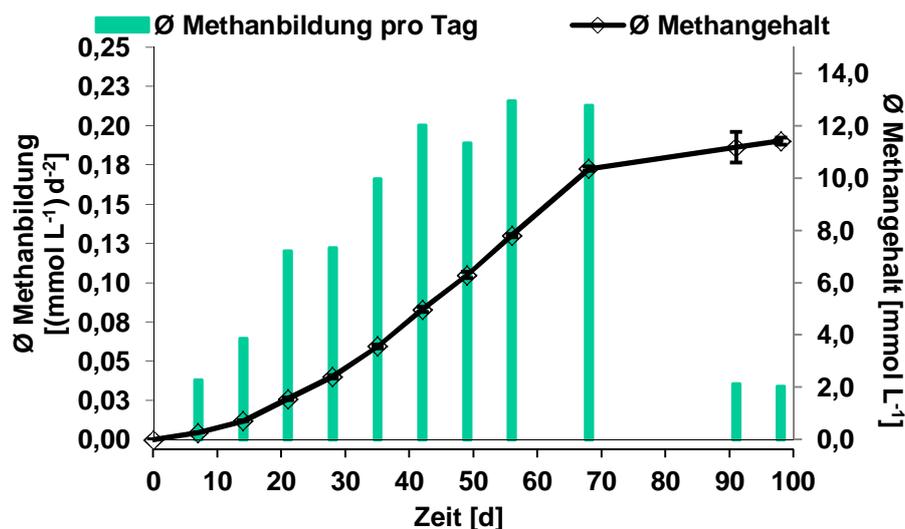


Abbildung 123: Durchschnittliche Methanbildung in mmol pro Liter pro Tag (Säulen) mit dem durchschnittlichen Methangehalt [mmol L⁻¹] (Rauten mit Standardabweichung) der Kultur *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4 gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Mit stetig steigender Rate produzierte die eigenisierte Reinkultur *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4 Methan (Abbildung 123). Zwischen den Inkubationstagen 49 und 68 erreichte die Kultur ihre maximale Methanproduktionsrate von täglich $0,215 \pm 0,001 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-2}$ ($k = 2$). Insgesamt bildete *Methanosaeta concilii* Stamm BEG4 $11,4 \pm 0,143 \text{ mmol L}^{-1}$ Methan, was nach Berücksichtigung der Reaktionsgleichung der acetoklastischen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2) der eingesetzten Menge Acetat (Kapitel 2.6, Seite 86) entsprach.

4.8 Zusammensetzung des Reaktorfiltrats

Reaktorfiltrat wurde im PI-Medium (Kapitel 2.6) benötigt, um Propionsäure durch propionsäureabbauende Mischkulturen zu reduzieren (Kapitel 4.7.1, Seiten 197 und 201). Einigen Medien für methanogene Archaea wurde Reaktorfiltrat als Wachstumsbeschleuniger zugegeben (Kapitel 3.3.2). Um gelöste Nährstoffe zu identifizieren, wurde die liquide Phase des Reaktorfiltrats mit Dünnschichtchromatographie (Kapitel 2.5.7 und 3.7.1) und einem HPLC-System (Kapitel 2.5.6 und 3.7.2) auf die Anwesenheit von kurzkettigen organischen Säuren, Aminosäuren und mit einem weiteren HPLC-System (Kapitel 2.5.6 und 3.7.2) auf Zucker und Zuckerderivate überprüft.

4.8.1 Pflanzenpartikel im Reaktorfiltrat

Mikroskopisch visualisierbare Pflanzenpartikel (Abbildung 35 D) enthielt das Reaktorfiltrat, die unlösliche Cellulose enthalten. Lösliche Stoffe dienen ebenfalls als Nährstoffe.

4.8.2 Acetat im Reaktorfiltrat

Messungen kurzkettiger organischer Säuren im unbeimpften beziehungsweise frisch beimpften PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) zeigten einen Acetatgehalt von circa $1\text{-}7\text{ mmol L}^{-1}$ (Abbildung 81, Tabelle 53). Dieses Acetat stammte aus dem Reaktorfiltrat (10 %), da dem PI-Medium (Kapitel 2.6, Seite 83) kein Acetat zugegeben wurde. Dies ergab einen Acetatgehalt von $10\text{-}70\text{ mmol L}^{-1}$ in unverdünntem Reaktorfiltrat.

4.8.3 Aminosäuren im Reaktorfiltrat

Das Reaktorfiltrat (Kapitel 2.6) wurde in verschiedenen Verdünnungen zum einen unfiltriert und zum anderen durch einen 3000 K-PES-Filter zentrifugiert auf eine Silikaplatte (Merck, Darmstadt) aufgetragen und einer Dünnschichtchromatographie unterzogen (Kapitel 3.7.1).

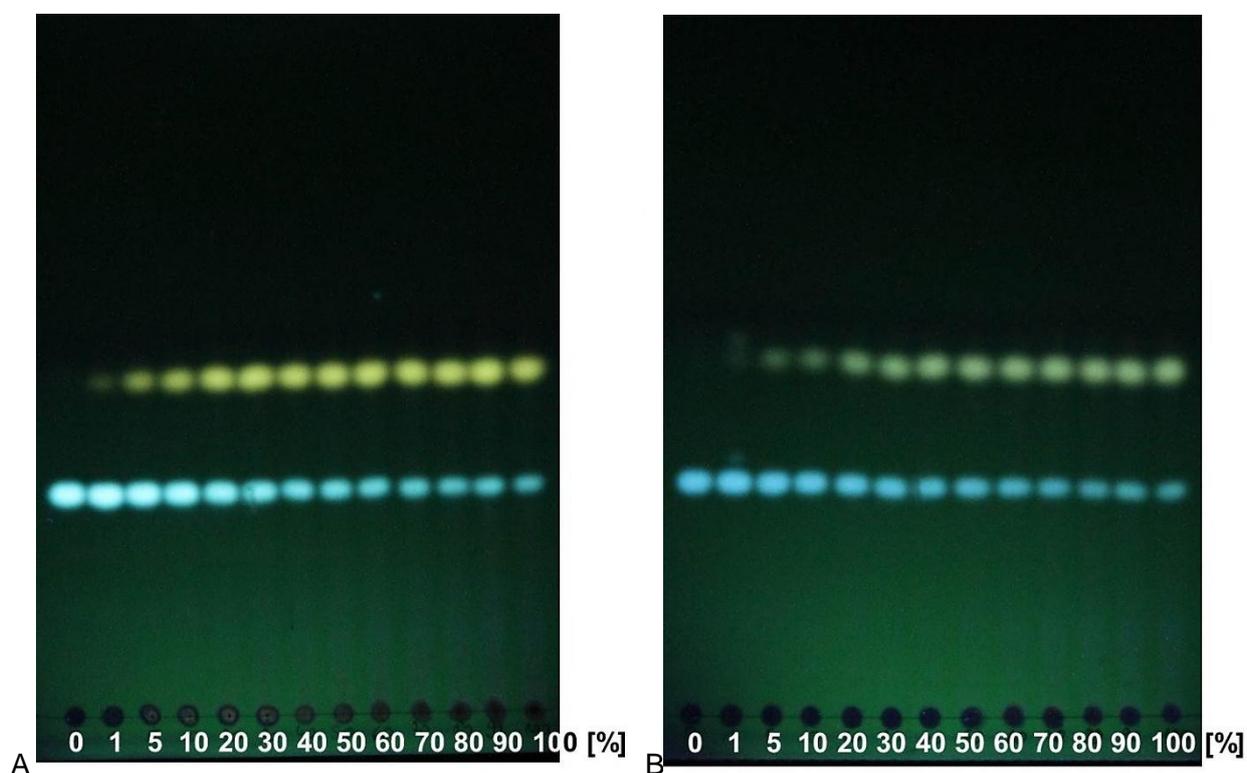


Abbildung 124: Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Reaktorfiltrats in verschiedenen Verdünnungen [%], blau = Dansylchlorid, gelb = Aminosäure, A unfiltriertes Reaktorfiltrat, B filtriertes Reaktorfiltrat, Farbfotografie unter UV-Licht.

Die Lauffront betrug $13,7\text{ cm}$. Das Dansylchlorid lief bei $6,0\text{ cm}$ (blau, Abbildung 124). Im Reaktorfiltrat ist eine Aminosäure enthalten, sofern keine andere Aminosäure bei dieser eindimensionalen Dünnschichtchromatographie das gleiche Laufverhalten aufwies. Die mit Dansylchlorid markierte Aminosäure lief $9,0\text{ cm}$ (gelb, Abbildung 124). Aus der Laufstrecke der Aminosäure dividiert durch die Lauffrontstrecke wurde der RF-Wert dieser Aminosäure der

angewendeten Dünnschichtchromatographie (Kapitel 3.7.1) von 0,657 berechnet. Beim Vergleich der Intensitäten wies das unfiltrierte Reaktorfiltrat eine höhere Leuchtkraft auf als die Proben des filtrierten Reaktorfiltrats. Die Filtration durch einen 3000K PEP-Filter hielt also kleine lösliche Moleküle teilweise zurück, was die Konzentration der Aminosäure jedoch nicht unter die Empfindlichkeitsgrenze dieser chemischen Analyse sinken ließ. Mit aufsteigender Konzentration des Reaktorfiltrats in der Probe, stieg auch die Intensität der Aminosäure, wobei die Leuchtkraft des Dansylchlorids entsprechend zurückging (Abbildung 124). Um weiterführend die Identität der Aminosäure zu ermitteln, wurde auf die chemische Analyseverfahren der HPLC zurückgegriffen, da mit der Methode der Dünnschichtchromatographie kein exaktes qualitatives Ergebnis ermittelt wurde.

Durch einen 3000 K-PES-Filter zentrifugiertes Reaktorfiltrat wurde mit Dansylchlorid inkubiert und mit einem HPLC-System für Aminosäuren (Kapitel 2.5.6, Seite 70 und 3.7.2) die nach den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie im Reaktorfiltrat befindliche Aminosäure identifiziert.

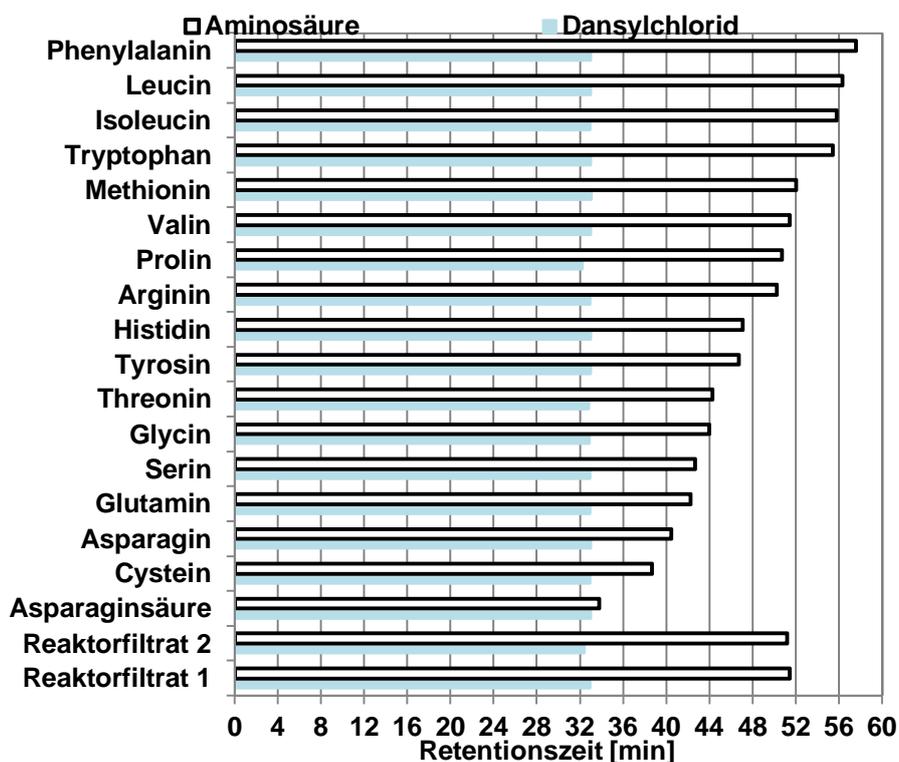


Abbildung 125: Retentionszeiten [min] von Aminosäuren (weiß) und Reaktorfiltraten im Vergleich zu den Retentionszeiten von Dansylchlorid (hellblau).

Zur Überprüfung der Messgenauigkeit wurden die Retentionszeiten des für die Aminosäureanalyse benötigten Dansylchlorids aller gemessenen Proben herangezogen (Abbildung 125, hellblaue Balken). Der Mittelwert der Retentionszeiten des Dansylchlorids betrug $32,93 \text{ min} \pm 0,208$ ($k = 19$), was für stabile Messungen sprach. Die Reaktorfiltratproben erzeugten neben dem Peak des Dansylchlorids einen weiteren Peak, was die Vermutung aufgrund der Ergebnisse aus der Dünnschichtchromatographie (Abbildung 124) bestätigte, dass sich im Reaktorfiltrat eine

Aminosäure befindet. Der Mittelwert der Retentionszeiten der chemisch analysierten Reaktorfiltratproben ($n = 2$, Abbildung 125) betrug $51,27 \text{ min} \pm 0,115$. Dieser Wert war der Retentionszeit des Valins mit $51,4 \text{ min}$ am nächsten.

4.8.4 Zuckeralkohol im Reaktorfiltrat

Verschiedene Konzentrationen des Reaktorfiltrats wurden auf den Gehalt von Zuckern und Zuckerderivaten chemisch analysiert ($n = 2$; Kapitel 2.5.6 Seite 71 und 3.7.2).

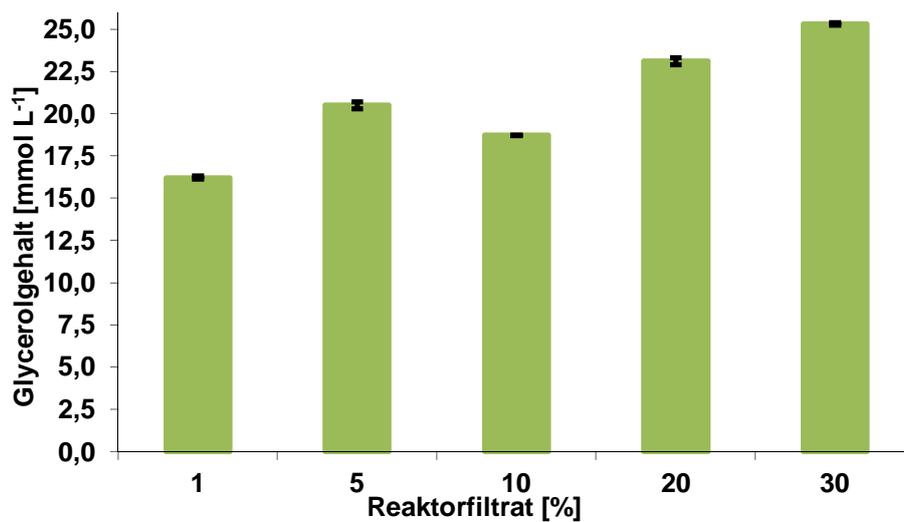


Abbildung 126: Glycerolgehalt in verschieden konzentriertem Reaktorfiltrat [%].

Mit dem in dem Schreiber der HPLC einprogrammierten internen Standard wurde mit der Retentionszeit $13,3 \text{ min} (\pm 0,0078, k = 10)$ Glycerol nachgewiesen. Neben dem Zuckeralkohol Glycerol wurden keine Monosaccharide nachgewiesen. Aufgrund der zwischen den Verdünnungen unverhältnismäßigen Glycerolwerte (Abbildung 126) wurde keine quantitative Auswertung des Glycerolgehalts im unverdünnten Reaktorfiltrat durchgeführt.

5 Diskussion

In syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen (Tabelle 14) aus unterschiedlichen NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) wurden in dieser Arbeit erstmals anaerobe Bakterien angereichert und reinisoliert (Kapitel 4.5.2). Bisher wurde die bakterielle und archaeale Vielfalt in NawaRo-Biogasanlagen molekularbiologisch analysiert (Kapitel 1.5.1.3, Liu *et al.* 2009, Klocke *et al.* 2007, 2008, Nettmann *et al.* 2010), jedoch nicht unter Berücksichtigung der syntroph ablaufenden anaeroben Propionsäureoxidation, wie in dieser Arbeit. Aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1 wurde in dieser Arbeit *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 isoliert (Tabelle 37). Aus der propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1 wurde *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 isoliert (Tabelle 46). In dieser Dissertation wurden aus unterschiedlichen NawaRo-Biogasanlagen (Tabelle 18) verschiedene Stämme methanogener Archaea der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* isoliert (Kapitel 4.6.3, Tabelle 47). Aus zwei thermophilen Laborfermenterproben (Laborfermenter siehe Klocke *et al.* 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) wurden die methanogenen Archaea *Methanomethylovorans* sp. Stamm LFP3.1 und *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 isoliert. Aus einer weiteren mesophilen Laborfermenterprobe wurde *Methanosarcina mazei* Stamm LFP2.1 angereichert (Kapitel 4.6.3, Tabelle 47). Im Gegensatz zu den molekularbiologischen Identifizierungen von Kampmann *et al.* (2012b) und Liu *et al.* (2009) wurden *Methanobrevibacter* aus der Ordnung Methanobacteriales und *Methanospirillum* aus der Ordnung Methanomicrobiales in den in dieser Arbeit beprobten NawaRo-BGAs und den Laborfermentern weder molekularbiologisch identifiziert noch kultiviert. Der analysierte Fermenter von Liu *et al.* (2009) wurde mit Schweinemist betrieben und der Fermenter von Kampmann *et al.* (2012b) mit Gülle und spezieller Befütterung aus Casein, Stärke und Rahm im Wechsel. In den beprobten NawaRo-BGAs wurde hauptsächlich Mais respektive Grassilage verwendet, was mit Schweinegülle beziehungsweise Rindergülle angeimpft wurde (Tabelle 18). Eine Begründung für die nicht identifizierten Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanospirillum* könnte die unterschiedliche Befütterung der Fermenter sein, auch wenn Nettmann *et al.* (2010) mit molekularbiologischen Methoden keine direkte Korrelation der Population methanogener Archaea mit der Befütterung ermittelten.

5.1 Molekularbiologisch identifizierte Bakterien und methanogene Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen und Laborfermentern

Die molekularbiologische Identifizierung von Bakterien und methanogenen Archaea wurde mit 16S rDNA Sequenzen über die unterschiedlichen Separierungsmethoden DGGE/TGGE (Kapitel

2.5.3, 2.5.4 und 3.5.6) und Klonierung (Kapitel 3.5.7) durchgeführt. Verschiedenartige Ausprägungen der Banden einer DGGE (Abbildung 46, Abbildung 49, Abbildung 50, Abbildung 56, Abbildung 59, Abbildung 60) und auch der Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.2 und 3.5.5) geben nicht zwangsläufig einen Hinweis auf die Zellanzahl eines Mikroorganismus in einer Kultur (Liesack *et al.* 1991). Verschiedene Gründe können dabei vorliegen. Ein Grund ist, dass die 16S rDNA unterschiedlicher Mikroorganismen in verschiedener Anzahl im Genom vorliegen kann (Farrelly *et al.* 1995). Die 16S rDNA hat eine hoch konservierte Sequenz (Woese *et al.* 1975), weshalb sie für molekularbiologische Identifizierungen von Arten verwendet wird (Woese und Fox 1977, Fox *et al.* 1977). Diese Sequenz kann partiell in der chromosomalen DNA auch an Stellen auftreten, die nicht zur 16S rDNA zählen (Liesack *et al.* 1991). Mit synthetischen Oligonukleotiden für die 16S rDNA werden diese partiellen DNA-Sequenzen aus der chromosomalen DNA ebenfalls reamplifiziert. Somit entstehen Fragmente, die sich von der 16S rDNA in einzelnen Basenpaarungen unterscheiden. Diese Fragmente lassen sich in manchen Fällen durch eine Agarose Gel Elektrophorese separieren. Zusätzlich können diese Fragmente während der Anlagerung eines jeden Zyklus der PCR mit der 16S rDNA partielle Basenpaarungen ausbilden, wodurch die Polymerase ohne Anlagerung eines synthetischen Oligonukleotids das Fragment reamplifiziert. Diese Fragmente werden chimäre Fragmente genannt. Ein weiterer Grund ist, dass mit steigender Anzahl der Amplifikate die PCR inhibiert wird, da die Anlagerung der Amplifikate aneinander effizienter ist als die Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide an die Amplifikate (Suzuki und Giovannoni 1996). Außerdem denaturiert G+C reiche DNA bei höheren Temperaturen als DNA mit geringerem G+C-Gehalt und steht somit der PCR weniger zur Verfügung (Reysenbach *et al.* 1992). Liegt der zuletzt genannte Fall vor, kann dem PCR-Mix 5 % (w/v) Acetamid zugeben werden, da Acetamid die Denaturierung der doppelsträngigen DNA mit hohem G+C-Gehalt erhöht.

Bei den propionsäureabbauenden Mikroorganismen in den Mischkulturen (Kapitel 4.7.1 bis 4.7.3) könnte es sich um bisher unbekannte oder bisher noch nicht als Propionsäureabbauer identifizierte anaerobe Bakterien handeln. Dazu müssen die Isolierung möglichst aller Bakterien aus den Mischkulturen fortgeführt, molekularbiologische Sequenzanalysen durchgeführt und reinisierte Bakterien mit hydrogenotrophen methanogenen Archaea co-kultiviert werden, um über chemisch analytische Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen die für die syntrophe Oxidation von Propionsäure verantwortlichen Mikroorganismen zu identifizieren. Außerdem deuten die Titer der propionsäureabbauenden Bakterien in den Mischkulturen (Tabelle 30) von $5 \cdot 10^2$ Zellen L^{-1} (Mischkultur Gp1) bis zu $3,5 \cdot 10^4$ Zellen L^{-1} (Mischkulturen Wp2a und Ap1a) darauf hin, dass diese Titer unterhalb der Nachweisgrenze einiger molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung von Bakterien und Archaea liegen. In Mischkultur Wp2a wurde Acetat abgebaut (Abbildung 96 A), obwohl kein acetatverwertendes Bakterium beziehungsweise Archaeon molekularbiologisch identifiziert wurde. Sowohl in Mischkultur Gp1b als auch in Wp2a wurde Methan detektiert (Abbildung 110), obwohl keine archaeale 16S rDNA amplifiziert wurde (Kapitel 4.6). Um diese

Hinweise zu belegen, können die unteren Nachweisgrenzen von Identifizierungsmethoden experimentell für die propionsäureabbauenden Mischkulturen bestimmt werden. Beispielsweise mit der Verwendung der *real time* PCR (Lueders *et al.* 2004) kann diese Nachweisgrenze bestätigt werden, da mit der *real time* PCR teilweise eine Zelle identifiziert werden kann.

In den Medien 520 und 63-L (DSMZ, 2012), beimpft mit den Kulturen Wp2a und Gp1b, wurde Wachstum anaerober Bakterien durch eine sich einstellende Trübung und einem entstehenden partikulären Niederschlag beobachtet (nicht gezeigt), jedoch aufgrund dieses starken Niederschlags wurde keine DNA-Isolierung durchgeführt. Durch eine Optimierung der DNA-Isolierung aus speziell diesen partikulär verunreinigten Kulturen können zukünftig auch Mikroorganismen aus Kulturen in den Medien 520 und 63-L mit starkem Niederschlag identifiziert werden.

5.2 Mikroorganismen in syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen

Im Kulturüberstand der Mischkulturen Fp1 (Abbildung 78), Gp1 (Abbildung 79), Ap1 (Abbildung 81) und Ap3 (Abbildung 82) akkumulierte Acetat bei gleichzeitig sinkendem Propionatgehalt. Diese chemisch analytische Beobachtung des Substrats Propionsäure und des Produktes Acetat deckte sich mit der Veröffentlichung von Wallrabenstein *et al.* (1994), in der *Syntrophobacter wolinii* nach Formel 11 und Formel 12 Propionsäure zu Acetat umsetzte (Kapitel 1.7.2). Der Stoffwechselweg kann in den Kulturen dieser Arbeit identisch zu der von Stams und Plugge (2009) zusammenfassten Oxidation von Propionsäure zu Acetat ablaufen (Abbildung 24). Die Kulturen Wp1a (Abbildung 95 A), Wp2a und Wp2b (Abbildung 96) sowie Ap3a und Ap3b (Abbildung 99) bauten ebenfalls unter anaeroben Bedingungen Propionsäure ab. Die Zusammenhänge der Substratumsätze mit den identifizierten Mikroorganismen der syntroph propionsäureoxidierenden Kulturen werden auf den folgenden Seiten für die Kulturen Fp1, Wp1, Wp2, Gp1 und Ap1 diskutiert.

5.2.1 Bakterien und eigenisierte Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1

Kultur Fp1b zeigte nach der Inkubation mit Bromoethansulfonsäure (BrES) im PI-Medium eine Akkumulation von Acetat (Abbildung 94 B) im Gegensatz zu Fp1a (Abbildung 94 A). Der Anstieg des Acetatgehalts in Kultur Fp1b deutet auf eine Dezymierung acetoklastischer methanogener Archaea durch BrES hin, da Acetat in der ohne BrES inkubierten Kultur Fp1a nicht im Medium angereichert wurde (Abbildung 94 A). Eine Sequenzierung archaealer 16S rDNA (Kapitel 4.6) könnte diese Vermutung belegen. Keine Anreicherung von Succinat wurde mit Kultur Fp1F (Abbildung 83) gezeigt. Hier könnte ein reverser Elektronentransport (Stams und Plugge 2009) in Form einer intrazellulären Oxidation von Succinat zu Fumarat und Wasserstoff (Abbildung 25) dieses Substratverhalten erklären. Eine zusätzliche chemische Analyse des Formiatgehalts im Medium könnte diese Vermutung bestätigen, wenn dieser ansteige. Begleitend könnte die mögliche Anwesenheit einer Succinat Dehydrogenase ermittelt werden, wie sie in *Syntrophobacter fumaroxidans* oder *Pelotomaculum thermopropionicum* (Kosaka *et al.* 2008) vorliegt (Stams und Plugge 2009), um den reversen Elektronentransport zu belegen.

Aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Fp1 und deren Unterkulturen wurden unterschiedliche Bakterien identifiziert (Tabelle 33 bis Tabelle 37) und *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 eigenisiert (Abbildung 49). *Proteiniphilum sp.* wurde bereits auf Genusebene in der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 36) identifiziert. Der Typstamm dieser Art wurde zuerst in einem Abwasseraufbereitungstank einer Brauerei gefunden (Chen und Dong 2005b). *Proteiniphilum acetatigenes*^T DSM18083 beschleunigt den syntrophen Abbau von Propionsäure, wenn man ihn einer syntrophen Mischkultur aus *Syntrophobacter sulfatireducens* und beispielsweise *Methanobacterium formicicum* zusetzt (Chen und Dong 2005a, b). Der Mechanismus ist noch unbekannt. Daher ist eine Co-Kultivierung des Eigenisolats *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 mit einem propionsäureabbauenden Bakterium mit radioaktiv markierter Propionsäure als Substrat interessant, um den Mechanismus dieser Interaktion herauszuarbeiten. Gegebenenfalls ist eine Tri-Kultivierung von *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 mit einem propionsäureabbauenden Bakterium mit einem zusätzlichen methanogenen Archaeon wie *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 oder *Methanosarcina mazei* Stamm HWS2.1 bei der Auflösung des Interaktionsmechanismus behilflich, da diese Archaea eventuell hemmende Produkte wie H₂ oder Acetat zu Methan verarbeiten können.

Tabelle 54: Bakterien aus der syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur Fp1 aus der NawaRo-Biogasanlage Theo & Ingrid & Alexander Friedrich GbR

Kultur	Bakterium	Identifizierungsmethode
Fp1	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> ^T DSM12254 <i>Spirochaeta</i> sp.	DGGE, Tabelle 33
Fp1a	<i>Gracilibacter</i> sp. <i>Spirochaeta</i> sp. <i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261 <i>Escherichia coli</i> K-12 Unterstrang MDS42	Klonierung, Tabelle 34
Fp1a1264	<i>Proteiniphilum</i> sp. <i>Sphaerochaeta globus</i> Stamm Buddy <i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	Klonierung, Tabelle 36
Fp1a520	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> ^T DSM18083	DGGE, Tabelle 37
Fp1a63-L	<i>Geovibrio</i> sp.	Klonierung, Kapitel 4.5.2.1

Desulfovibrio aminophilus^T DSM12254 (Beana *et al.* 1998) wurde in der propionsäureabbauenden Kultur Fp1 (Tabelle 33) mithilfe der bakteriellen 16S rDNA identifiziert (Tabelle 54). Der Mikroorganismus oxidiert Aminosäuren gekoppelt an die Sulfatreduktion, darunter auch Valin (Baena *et al.* 1998). Valin wurde in dieser Arbeit als einzige Aminosäure bei der chemischen Analyse von Aminosäuren im Reaktorfiltrat detektiert (Abbildung 125). Valin ist eine essentielle Aminosäure und wird daher unter anderem dem Futter für Nutztiere beigemischt (Jakubke und Jeschkeit 1982). *Desulfovibrio aminophilus* könnte aufgrund des im Reaktorfiltrats enthaltenen Valins angereichert worden sein. Mit dem Zusatz von Valin und Sulfat könnte *Desulfovibrio aminophilus* isoliert werden und gleichzeitig den vermuteten Grund der Anreicherung im PI-Medium experimentell beweisen.

In den Kulturen Fp1 und Fp1a wurden verschiedene Sequenzen dem Genus *Spirochaeta* zugeordnet. Der Konsensussequenz (Abbildung 128) nächstverwandte Art *Spirochaeta caldaria*^T DSM7334 (Tabelle 34) fermentiert Glukose neben einigen anderen Monosacchariden zu H₂, CO₂, Acetat und Lactat (Pohlschroeder *et al.* 1994). Der Mikroorganismus zählt zu den thermophilen Spirochäten mit einer Wachstumstemperaturuntergrenze von 25 °C. Mit Cellulose als einzige Kohlstoffquelle wächst *Spirochaeta caldaria*^T DSM7334 nicht, da der Mikroorganismus keine cellulolytischen Enzyme besitzt. Der Spirochät bewirkt einen schnelleren Abbau von Cellulose in Co-Kultur mit *Clostridium thermocellum*, indem der Spirochät Disaccharide (Cellobiose) verwertet, die vom Clostridium extrazellulär aus Cellulose gebildet wurden (Pohlschroeder *et al.* 1994). Nach Kultivierung in stärkehaltigem Spirochäten-Medium 1264 wurde in dieser Arbeit die Art *Sphaerochaeta globus* Stamm Buddy molekularbiologisch in Kultur Fp1a1264 identifiziert. *Sphaerochaeta globosa*^T DSM22777 (Stamm Buddy) fermentiert Monosaccharide zu Ethanol, Acetat und Formiat, wächst aber auch mit löslicher Stärke (Ritalahti *et*

al. 2012). Damit kann dieser Mikroorganismus ebenfalls zur Acetatproduktion aus Monomeren während der ersten Fermentationsstufe beitragen. Mit löslicher Stärke wurde in dieser Arbeit *Sphaerochaeta globosa* aus der syntroph propionsäureoxidierenden Kultur Fp1a angereichert. Mit Glukose statt Stärke im Medium könnte *Spirochaeta caldaria* aus dieser Kultur angereichert werden.

In Tabelle 54 ist gezeigt, dass ein Bakterium der Gattung *Gracilibacter* in der syntroph propionsäureoxidierenden Unterkultur Fp1a durch Klonierung identifiziert wurde. Die höchste Übereinstimmung (91 %, Tabelle 34) hatte das Fragment mit der Sequenz von *Gracilibacter thermotolerans*^TDSM17427 (Lee *et al.* 2006). *Gracilibacter thermotolerans*^T DSM17427 fermentiert Glukose neben anderen Monosacchariden zu Acetat, Lactat und Ethanol, womit der Mikroorganismus bei der primären Fermentationsstufe der Biogasproduktion beteiligt ist, acetoklastischen Methanbildnern Substrat in Form von Acetat zu liefern. Die Monosaccharide könnten in der propionsäureabbauenden Kultur Fp1a aus der Spaltung von Polysacchariden während der Inkubation stammen, da im Reaktorfiltrat keine Monosaccharide detektiert wurden (siehe dazu Abbildung 126). Mikroorganismen der Gattung *Gracilibacter* haben hohe Ähnlichkeiten zu Clostridien, was in dieser Arbeit durch die molekularbiologische Analyse des Musters γ aus der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 34) bestätigt wurde. Isolieren ließe sich der Mikroorganismus durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 45 °C.

Der Mikroorganismus *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 wurde in der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 36) molekularbiologisch nachgewiesen. *Aminobacterium colombiense* kann Aminosäuren sowohl primär als auch sekundär fermentieren und Acetat und H₂ beziehungsweise in Co-Kultur mit dem hydrogenotrophen methanogenen Archaeon *Methanobacterium formicicum* syntroph hauptsächlich Isobutyrat und ein wenig Acetat bilden (Baena *et al.* 1998). Messungen des Acetatgehalts im Kulturüberstand der Co-Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit dem Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 (Abbildung 105 B) zeigten nicht eindeutig, dass Acetat akkumulierte, da der Acetatgehalt im Verhältnis vergleichbar mit dem der Einzelkulturen (Abbildung 104) sowie in Co-Kultur mit *Methanosarcina mazei* Stamm HWS2.1 (Abbildung 105 A) war. Aufschluss könnten Messungen des potenziellen Substrats Valin und des angenommenen Produktes Isobutyrat im Kulturüberstand der Co-Kultur *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 bringen. Außerdem könnte so geklärt werden, ob sich *Aminobacterium colombiense* (Tabelle 35) aufgrund des Gehalts von Valin im Reaktorfiltrat (Abbildung 125) anreicherte, wie bereits bei *Desulfovibrio aminophilus* (Tabelle 33) vermutet wurde. Eine Inkubation mit radioaktiv markiertem Valin könnte Aufschluss über den syntrophen Stoffwechselweg geben.

Escherichia coli wurde in der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 35), wie auch in den Unterkulturen Gp1b1264 (Tabelle 43) und Ap1a1264 (Tabelle 45) identifiziert. *Escherichia coli* ist unter anderem befähigt, Fumarat zu Succinat fermentieren, um Energie mit einer protomotorischen Kraft

herzustellen (Kröger *et al.* 1992). Diese Fähigkeit von *Escherichia coli* könnte einen Einfluss auf die in dieser Arbeit ermittelten Substratkonzentrationen in Abbildung 83 und Abbildung 84 gehabt haben. Dharmadi *et al.* (2006) zeigte, dass *Escherichia coli* Glycerol hauptsächlich zu Ethanol, Succinat aber auch zu Acetat, CO₂ und H₂ fermentiert. Glycerol wird der Biomasse im Fermenter häufig als leistungssteigernder Zusatz zugegeben (Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Landtechnik, 2004). Die Anwesenheit von Glycerol im Reaktorfiltrat (Abbildung 126) kann ein Grund für die Anreicherung von *Escherichia coli* in den Mischkulturen sein. Chemisch analytische Messungen des Gehalts des angenommenen Substrats Glycerol und das daraus gebildete Hauptprodukt Ethanol können zum Nachweis dieses Anreicherungsgrundes führen.

In der Unterkultur Fp1a1264 (Tabelle 36) war *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 anwesend. Dieser Mikroorganismus reduziert gleichzeitig Fumarat zu Succinat, Nitrat zu Nitrit und Nitrit zu Ammoniak mit H₂ oder Formiat als Elektronen Donoren (Kern und Simon 2009, Kröger *et al.* 1992 und 2002, Simon 2002). Bei Anwesenheit von Schwefel reduziert *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 ausschließlich Schwefel mit Sulfid zu Polysulfid. Polysulfid hemmt die Umsetzung von Fumarat und Nitrat (Lorenzen *et al.* 1993). In Cokultur von *Wolinella succinogenes* mit *Geobacter sulfurreducens* oxidiert *G. sulfurreducens* Acetat (Cord-Ruwisch *et al.* 1998) mit Cystein als Elektronenüberträger (Kaden *et al.* 2002). Der Umsatz des alternativen Substrats Fumarat in Kultur Fp1 wurde in dieser Arbeit gezeigt (Abbildung 83 und Abbildung 84), dabei werden *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 und der ebenfalls in Kultur Fp1a1264 identifizierte *Escherichia coli* maßgeblich beteiligt gewesen sein. *Wolinella succinogenes* war außerdem daran beteiligt, den Wasserstoffpartialdruck gering zu halten, unterstützt von möglich anwesenden hydrogenotrophen methanogenen Archaea (archaeale 16S rDNA in Mischkultur Fp1a, siehe Kapitel 4.6, Methangehalt der Unterkulturen nicht gezeigt).

Geovibrio sp. wurde in der Unterkultur Fp1a63-L auf Genusebene zu *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 zugeordnet und in Unterkultur Gp1b1264 identifiziert (Tabelle 42). *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 ist befähigt, Acetat zu CO₂ zu oxidieren (Janssen *et al.* 2002). Dabei werden Fumarat zu Succinat, Nitrat über Nitrit zu Ammoniak oder DMSO zu Dimethylsulfid reduziert. Im Beisein von Schwefel wird dieser mit H₂ zu Sulfid reduziert, wobei Formiat oder Acetat zu CO₂ reduziert werden. Acetat reicherte sich nicht im Kulturüberstand der Mischkultur Fp1a an, obwohl der Propionatgehalt sank (Abbildung 94 A). Mit *Geovibrio thiophilus* lebt ein Mikroorganismus in Mischkultur Fp1, der in versäuerten Fermentern den Abbau von Acetat von übernehmen kann, wenn keine acetoklastischen methanogenen Archaea anwesend sind (Kapitel 1.5.2.4, Karakashev *et al.* 2006, Schnürer *et al.* 1999). Ob dieser Fall auch auf Mischkultur Fp1a zutrifft, kann durch Sequenzierung der bereits in dieser Arbeit in kleinen Mengen amplifizierter archaealen 16S rDNA (Kapitel 4.6) gezeigt werden.

5.2.2 Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp1

Auch in der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp1 (Tabelle 38) wurde das Wasserstoff verbrauchende Bakterium *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 identifiziert, das bereits in Kapitel 5.2.1 diskutiert wurde. In Abbildung 85 ist gezeigt, dass die Fumaratkonzentration ab der 5ten Inkubationswoche abnahm. Daran kann *Wolinella succinogenes* beteiligt gewesen sein.

Tabelle 55: kultivierte Bakterien aus der ersten syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur Wp1 aus der NawaRo-Biogasanlage Hubert Wagner und Sohn GbR

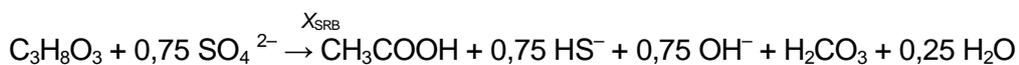
Kultur	Bakterium	Identifizierungsmethode
Wp1	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	DGGE, Tabelle 38
	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> ^T DSM21804	

Tepidanaerobacter acetatoxydans^T DSM21804 (Westerholm *et al.* 2011) wurde bei den molekularbiologischen Analysen in der Mischkultur Wp1 (Tabelle 38) identifiziert. Dieser obligat anaerobe Mikroorganismus bildet Endosporen (nicht gezeigt). *Tepidanaerobacter acetatoxydans* setzt Monosaccharide und Fettsäuren zu Acetat um (Westerholm *et al.* 2011). *Tepidanaerobacter acetatoxydans* ist bei der Bildung von Biogas beim ersten Fermentationsschritt (Abbildung 19) beteiligt, in dem Acetat gebildet wird. Außerdem verstoffwechselt *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Glycerol zu Acetat. In dieser Dissertation wurde Glycerol im Reaktorfiltrat detektiert (Abbildung 126). Durch Modifikation der im Institut möglichen Detektionsmethoden sollte quantitativ ermittelt werden können, ob und in welchen Mengen Glycerol als Nährstoff von den syntroph propionsäureoxidierenden Kulturen verwendet wird. Einen Ansatz zur Glycerol Verwertung beschreibt Dinkel *et al.* (2010). Hier wird die Verwertung von Glycerol durch acidogene Bakterien mit Unterstützung von Sulfatreduzieren ohne Anwesenheit methanogener Archaea erläutert. Zunächst verwerten acidogene Bakterien (X_A) Glycerol ($C_3H_8O_3$) zu Acetat (CH_3COOH). Die freie Enthalpie (ΔG^0) wurde für $T = 25 \text{ °C}$ berechnet.



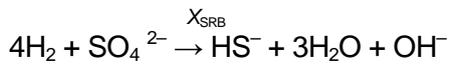
$$\Delta G^0 = -59 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Daraufhin verwenden sulfatreduzierende Bakterien (X_{SRB}) das Acetat zur Sulfatreduktion, in dem sie das Acetat oxidieren. Diese Reaktion steht in Konkurrenz zur acetoklastischen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2).



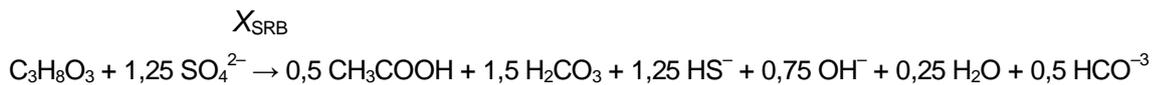
$$\Delta G^0 = -143 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Der von den acidogenen Bakterien produzierte Wasserstoff wird ebenfalls von Sulfatreduzieren verwertet. Diese Reaktion steht ebenfalls in Konkurrenz zur hydrogenotrophen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.1).



$$\Delta G^0 = -112 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Die Bruttoreaktion sieht ohne Berücksichtigung der konkurrierenden Methanogenese wie folgt aus.



Die Ausführungen (Dinkel *et al.* 2010) übertragen auf das in dieser Arbeit bearbeitete Biogas herstellende System, könnten gezielte Tri- oder Co-Kulturen die Funktion des leistungssteigernden Zusatzes von Glycerol mikrobiologisch erklären. Mit einer Tri-Kultur aus *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM21804 als Glycerol verwertender Mikroorganismus, *Geovibrio thiophilus* DSM11263 – oder wahlweise *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 - als Acetat verwertender Mikroorganismus und dem hydrogenotroph Methan produzierenden *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 könnte dies gezeigt werden. Parallel besteht die Möglichkeit die Glycerolverwertung im Biogas Fermenter mit einer Co-Kultur aus *Tepidanaerobacter acetatoxydans* mit *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 zu belegen, da dieses methanogene Archaeon sowohl acetoklastisch als auch hydrogenotroph Methan produziert. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* oxidiert außerdem syntroph Acetat zu CO₂ in Co-Kultur mit hydrogenotroph methanogenen Archaea mithilfe der Formyltetrahydrofolat Synthetase (FTHFS, Westerholm *et al.* 2011) aus dem Wood-Ljungdahl-Weg (Acetyl-CoA-Weg, Kapitel 1.8) und wird somit zu den syntroph Acetat oxidierenden Bakterien (SAOB) gezählt. Damit deckt *Tepidanaerobacter acetatoxydans* eine weitere Möglichkeit ab, Substrat für hydrogenotrophe methanogene Archaea zu bilden (Kapitel 1.9.1.1.1), zu denen Vertreter der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanoculleus* sowie *Methanosarcina* zählen (Tabelle 31). Die Acetatoxidation steht in Konkurrenz zur acetoklastischen Methanogenese (Kapitel 1.9.1.1.2, Lee und Zinder 1988), welche von *Methanosaeta* aber auch von *Methanosarcina* (Tabelle 31) durchgeführt wird. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* fermentiert sowohl primär Monosaccharide und Fettsäuren zu Acetat als auch sekundär Acetat mit syntropher Bildung von CO₂.

5.2.3 Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Wp2

Die aus Unterkultur Wp2a1264 identifizierten Bakterien spiegeln einen Teil der in Wp2 lebenden Bakterien wieder.

Tabelle 56: unterkultivierte Bakterien aus der zweiten syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur Wp2 aus der NawaRo-Biogasanlage Hubert Wagner und Sohn GbR

Kultur	Bakterium	Identifizierungsmethode
Wp2a1264	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	Klonierung, Tabelle 40
	<i>Wolinella succinogenes</i> ^T DSM1740	
	<i>Thermotogaceae</i> bacterium SulfLac1	
	<i>Petrotoga mobilis</i> ^T SJ95	

Aminobacterium colombiense^T DSM12261, der Acetat- und H₂-Produzent, wurde in Unterkultur Wp2a1264 (Tabelle 39) identifiziert. Eine Beteiligung dieses Mikroorganismus an der Umsetzung von Aminosäuren kann weiterführend wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben experimentell bewiesen werden.

Die molekularbiologische Identifikation der Unterkultur Wp2a1264 (Tabelle 39) wies *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 vor. In dieser Arbeit wurde die Umsetzung von Fumarat in Kultur Wp2F anhand der Inkubation mit dem alternativen Nährstoff Fumarat gezeigt (Abbildung 86 und Abbildung 87), wobei *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 beteiligt gewesen sein wird (siehe dazu Kapitel 5.2.1).

Ein Bakterium der Familie *Thermotogaceae* (Stamm SulfLac1) wurde in Kultur Wp2a1264 (Tabelle 39) molekularbiologisch identifiziert. Vertreter dieser Familie leben thermophil bis hyperthermophil fermentativ und werden für gewöhnlich in hydrothermalen Quellen gefunden (Dahle *et al.* 2011). Auf Grund der Thermophilie könnte dieses Bakterium angereichert und isoliert sowie auf Artebene identifiziert werden.

5.2.4 Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur

Gp1

Die bakterielle 16S rDNA der Unterkulturen Gp1a (Tabelle 41) und Gp1b1264 (Tabelle 42) aus der syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1 (Tabelle 14) wurde identifiziert.

Tabelle 57: kultivierte Bakterien aus einer syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur aus der NawaRo-Biogasanlage BioEnergie Glahn

Kultur	Bakterium	Identifizierungsmethode
Gp1a	<i>Desulfovibrio oxamicus</i> ^T DSM1925	Klonierung, Tabelle 41
	<i>Aminobacterium colombiense</i> ^T DSM12261	
	<i>Parvimonas</i> sp.	
Gp1b1264	<i>Geovibrio thiophilus</i> ^T DSM11263	Klonierung, Tabelle 43
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Spirochaeta</i> sp.	

Desulfovibrio oxamicus^T DSM1925 wurde in der Kultur Gp1a (Tabelle 41) angereichert. Der Mikroorganismus oxidiert kurzkettige Fettsäuren und Alkohole in Verbindung mit der Sulfatreduktion teilweise unvollständig zu Acetat (López-Cortés *et al.* 2006). Von der Sulfatreduktion unabhängig, wächst der Mikroorganismus auf Cholin und Pyruvat (Postgate und Campbell 1966). Cholin wird in Futtermitteln zugesetzt (Deutscher Verband Tiermahrung e. V. 2012), da Cholin den Abbau von Lipiden im Dünndarm unterstützt. Cholin im Reaktorfiltrat könnte eine weitere attraktive Nährstoffquelle für anaerob Cholin verwertende Mikroorganismen wie *Desulfovibrio oxamicus* darstellen, daher sollte weiterführend der Cholin Gehalt des Reaktorfiltrats chemisch analysiert werden. Mit Cholin als einziger Substratquelle einem Medium ohne Reaktorfiltrat könnte *Desulfovibrio oxamicus* aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1b isoliert werden. Mit dieser Isolationsmethode könnte der Grund der Anreicherung von *Desulfovibrio oxamicus* in der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1b gezeigt werden. Mit weiter führenden definierten Co-Kultivierungen kann die Aufgabe dieses Sulfatreduzierers im Konsortium mit begleitenden chemischen Analysen ermittelt werden.

In Unterkultur Gp1b1264 (Tabelle 43) war *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 (Beschreibung siehe Kapitel 5.2.1.) ebenfalls anwesend. Gp1b1264 ist neben Fp1a1264 (Tabelle 54) und Wp2a1264 (Tabelle 56) die dritte Unterkultur aus unterschiedlichen Biogasanlagen (Tabelle 18), was ihn zu einem interessanten Mikroorganismus bei der Bildung von Biogas macht.

In dieser Arbeit wurden Sequenzen aus Unterkultur Gp1b1264 mit den Mustern g, g2 und g3 (Abbildung 53) der Gattung *Parvimonas* (Tabelle 42, Prévot 1933, Tindall und Euzéby 2006) zugeordnet. Zwei mit dem Restriktionsmuster ,g' und ,g2' aus der Unterkultur übereinstimmende Muster (Muster 12 und 9, Abbildung 44 A) wurden bereits im Fermenter der BGA BioEnergie Glahn

gezeigt. *Parvimonas* sp. sind nah mit den *Clostridiaceae* verwandt (Murdoch und Shah 1999). Mikroorganismen der Gattung *Parvimonas* fermentieren hauptsächlich Pepton und Aminosäuren größtenteils zu Acetat, aber auch zu Succinat und Lactat. Mikroorganismen der Gattung *Parvimonas* können somit ebenfalls eine Rolle zur Produktion von Acetat aus fermentativen Stoffwechselprodukten für die Methanbildung übernehmen.

Für die Kultur Gp1 wurde die Fumaratreduktion vermutlich durch *Geovibrio thiophilus* in Abbildung 88 und in Abbildung 89 mit Inhibierung der Methanogenese gezeigt. Die beispielsweise in Abbildung 89 (Gp1FB) gezeigte verhältnismäßig geringe Akkumulation von Acetat in Bezug auf den Abbau von Fumarat deutet auf einen Abbau von Acetat hin. Der in Kultur Gp1b1264 identifizierte *Geovibrio thiophilus* könnte diese Aufgabe übernommen haben, da durch die Zugabe von BrES die Methanogenese gehemmt wurde, so dass keine acetogen methanproduzierenden Archaea wachsen konnten (Kapitel 4.6). Tri-Kulturen in PI-Medium (eventuell auch ohne Propionsäure) mit beispielsweise *Clostridium sartagoforme*^T Stamm Ap1a520 und jeweils einem eigenisolierten hydrogenotroph Methanogenese betreibenden Archaeon könnten durch chemische Analysen des Acetatgehalts im Medium und des Gehalts von Methan in der Gasphase über der Kultur Aufschluss bieten, ob *Geovibrio thiophilus*^T DSM11263 ein geeigneter CO₂ Produzent aus den von *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 gebildeten Acetat und H₂ für die Methanogenese aus CO₂ und H₂ ist. Falls die chemischen Analysen diese Theorie bestätigen, könnte eine solche Tri-Kultur eingesetzt werden, um einen mit Cellulosefasern belasteter oder Acetat versäuerter Biogasfermenter zur Biogasherstellung zu remobilisieren (Schürer *et al.* 1994).

Escherichia coli wurde in der Unterkultur Gp1b1264 (Tabelle 43), wie auch in den Unterkulturen Fp1a1264 (Tabelle 35) und Ap1a1264 (Tabelle 45) identifiziert. Die möglichen Aufgaben von *Escherichia coli* wurden in Kapitel 5.2.1 bereits diskutiert.

Weitere partielle Sequenzen der 16S rDNA aus Gp1b1264 (Tabelle 42) wurden der Gattung *Spirochaeta* zugeordnet (siehe auch Kultur Fp1a, Tabelle 33). *Spirochaeta* sp. könnten aufgrund von Cellobiose oder Stärke im Reaktorfiltrat des PI-Mediums angereichert worden sein. Der Gehalt von Cellobiose oder Stärke wurde bisher nicht im Reaktorfiltrat nachgewiesen (Kapitel 4.8.4). Die Gehaltsbestimmung von Cellobiose und Stärke klärt ob diese Di- beziehungsweise Polysaccharide als Substrate in syntroph propionsäureoxidierenden Kulturen verwendet werden. Mit Stärke im DSMZ-Medium 1264 wurden *Spirochaeta* in Kultur Gp1b1264 (Tabelle 42) angereichert.

5.2.5 Bakterien und eigenisierte Bakterien aus der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkultur Ap1

In DSMZ-Medium 520 wurde *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 (Tabelle 46) aus der syntroph propionsäureoxidierenden Kultur Ap1a (Abbildung 98 A) reinisoliert (Abbildung 56). Bereits

in der Unterkultur Ap1a1264 (Tabelle 44) wurde der primär fermentierende Mikroorganismus *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 identifiziert.

Tabelle 58: kultivierte und isolierte Bakterien aus einer syntroph propionsäureabbauenden Mischkultur aus der NawaRo-Biogasanlage Arenrath

Kultur	Bakterium	Identifizierungsmethode
Ap1a1264	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	
	<i>Escherichia coli</i>	Klonierung, Tabelle 45
	<i>Proteiniphilum</i> sp.	
Ap1a520	<i>Clostridium sartagoforme</i> ^T DSM1292	DGGE, Tabelle 46

Clostridium sartagoforme^T DSM1292 ist ein obligat anaerobes Bodenbakterium, welches Sporen terminal mit einer pfannenförmigen Ausbuchtung bildet (Partansky und Henry 1935). Dieser Mikroorganismus wurde in Unterkultur Ap1a1262 (Tabelle 44) aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Ap1a identifiziert und in DSMZ-Medium 520 isoliert (Stamm Ap1a520, Tabelle 46). Kultur Ap1 zeigte einen stetigen Abbau von Fumarat (Abbildung 90 und Abbildung 91). Durch Kultivierung des Isolates *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 mit Fumarat in PI-Medium als zusätzlichen Nährstoff, ließe sich zeigen, ob dieser Mikroorganismus Fumarat umsetzt, wie einige mit ihm verwandten Clostridien (Matthies *et al.* 1993). Dabei sollte zusätzlich der Pyruvatgehalt im Medium detektiert werden, da in der Kultur Ap1F kaum Succinat im Medium akkumulierte (Abbildung 90). Bei hohem H₂-Partialdruck bilden Spezies der Gattung *Clostridium* vorzugsweise Ethanol und Lactat (Almarsdottir *et al.* 2010) beispielsweise aus Cellulose. Cellulose ist ein Bestandteil von Pflanzen. Pflanzliche Partikel waren im Reaktorfiltrat mikroskopisch sichtbar (Abbildung 35 D). Diese pflanzlichen Partikel könnten zur Anreicherung von *Clostridium sartagoforme* in Kultur Ap1a geführt haben.

Escherichia coli wurde in der Unterkultur Ap1a1264 (Tabelle 45) wie auch in den Unterkulturen Fp1a1264 (Tabelle 35) und Gp1b1264 (Tabelle 43) identifiziert. Dieser Mikroorganismus kann ebenfalls zum Abbau des Fumarats in den Kulturen Ap1F (Abbildung 90) und Ap1FB (Abbildung 91) beigetragen haben (Kröger *et al.* 1992).

Aus den HPLC-Messungen der Unterkulturen Ap1F (Abbildung 90) und Ap1FB (Abbildung 91) ging hervor, dass in Kultur Ap1F Acetat ab Woche 4 abgebaut wurde und in Kultur Ap1FB akkumulierte, wobei in beiden Kulturen Propionsäure abgebaut wurde. Dies deutet auf Anwesenheit acetoklastisch methanogener Archaea hin. In Kultur Ap1FB wurde Propionsäure abgebaut und Acetat reicherte sich im Medium an, da acetoklastische methanogene Archaea durch BrES inhibiert wurden (Kapitel 1.7.2 und 3.3.1). Propionsäure wurde in Ap1FB weiterhin abgebaut, da möglicher Weise *Escherichia coli* den beim Abbau von Propionsäure entstandenen Wasserstoff durch den Abbau von Fumarat verbrauchte oder eventuell anwesende hydrogenotrophe methanogene Archaea (Kapitel 4.6) zu Methan umsetzen.

5.3 Titer der syntroph propionsäureoxidierenden Mischkulturen und Reinkulturen agglomerierender methanogener Archaea

Sowohl die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der syntroph propionsäureabbauenden Anreicherungskulturen als auch der Titer der meisten methanogenen Archaea wurden nicht bestimmt.

Die Mikroorganismen aus den Anreicherungskulturen unterschieden sich in der Gestalt nicht von Pflanzenbestandteilen (Abbildung 35). Methanogene Archaea agglomerierten zu Knäulen (Abbildung 37) aus Ketten zusammenhängenden Mikroorganismen oder Paketen (Abbildung 40). Klocke *et al.* (2009a) entwickelte eine Methode, bei der ein enzymatischer Verdau von Exopolysacchariden und eine Behandlung mit Ultraschall kombiniert wurden. Basierend auf dieser Methode kann in Zukunft die Trennung von Bakterien und Partikeln und insbesondere der acetoklastischen Archaea voneinander optimiert werden, um so die Möglichkeit zu erhalten den Titer wie bei *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 (Abbildung 119) zu bestimmen.

5.4 Isolierte und angereicherte methanogene Kulturen aus Laborfermentern

Aus einem mesophilen Laborfermenter wurden von Klocke *et al.* (2007) zwei Klonsequenzen zu 97 % bis 98 % zu *Methanosarcina acetivorans* C2A, *Methanosarcina mazei* DSM 9195 und zu *Methanosarcina barkeri*^T DSM 800 molekularbiologisch zugeordnet. Andere Klonsequenzen hatten die höchste Übereinstimmung (86 %) mit *Methanobacterium formicicum*^T DSM 1535. Eine Klonsequenz wurde zu 93 % *Methanosaeta concilii* zugeordnet. In dieser Arbeit wurden aus zwei thermophilen Laborfermenterproben einer anderen Studie des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie (Laborfermenter siehe Klocke *et al.* 2007, 2009a, b, Nettmann *et al.* 2010) die hydrogenotrophe Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 (Abbildung 36 D, Abbildung 37, Abbildung 59, Abbildung 61 C, Tabelle 51) und das methylotrophe Archaeon *Methanomethylovorans sp.* Stamm LFP3.1 reinisoliert (Abbildung 41, Abbildung 69, Abbildung 71, Tabelle 51 und Tabelle 52). Eine Anreicherung eines Mikroorganismus der Gattung *Methanomethylovorans* wurde von de Bok *et al.* (2006) aus einer mit Methanthiol versetzten Probe einer Kläranlage einer Papierfabrik beschrieben. Um die Charakterisierung dieser molekularbiologisch nicht eindeutig identifizierbaren Reinkultur fortzuführen, kann *Methanomethylovorans sp.* Stamm LFP3.1 ebenfalls Methanthiol zugegeben werden, um Wachstum auf diesem Substrat zu ermitteln. Stamm *Methanosarcina mazei* LFP2.1 der Gattung *Methanosarcina* wurde aus einer mesophilen Laborfermenterprobe eines Laborfermenters

des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie angereichert. Durch weitere Kultivierung in Medium 318 mit Methanol als einzigem Substrat kann auch dieser Mikroorganismus reinkultiviert werden. Somit wurden in dieser Arbeit zwei der vier von Klocke *et al.* (2007) molekularbiologisch identifizierten Gattungen (*Methanobacterium* und *Methanosarcina*) und ein molekularbiologisch nicht erfasstes Archaeon des Genus *Methanomethylovorans* bis auf *Methanosarcina* reinkultiviert.

5.5 Chemisch analysierte Mischkulturen syntroph propionsäureoxidierender Mikroorganismen

Die syntroph ablaufende sekundäre Fermentation (Kapitel 1.5.2.3) ist von „Inter-Species-Elektronentransfers“ (Stams und Plugge 2009) abhängig. Bei diesem Vorgang werden Elektronen zwischen sehr unterschiedlichen Mikroorganismen übertragen. Syntrophe Bakterien und methanogene Archaea leben nicht weiter als wenige Mikrometer voneinander entfernt (Klocke *et al.* 2009b). Ein Elektronentransfer kann über den Nitrat- und Sulfatzyklus oder die Methanogenese (Weimer und Zeikus 1977, Smiti *et al.* 1986) mithilfe von Wasserstoff (Schink 2006, Boone *et al.* 1989, Dong und Stams 1995, Schmidt und Ahring 1995), Formiat (De Bok *et al.* 2004) oder auch Cystein (Schink und Stams 2006) als Elektronenüberträger stattfinden. Die anaerobe Oxidation von Propionsäure ist eine sekundäre Fermentation, die nur syntroph abläuft. Mit Kultur Gp1 und dem Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 wurde gezeigt, dass die Propionsäureoxidation durch das hydrogenotrophe methanogene Archaeon verbessert wurde (pinke Linie, Abbildung 80). Diese Versuchsreihe zeigte auch, dass methanogene Archea nachträglich einem Propionsäure übersäuerten System zugesetzt den Abbau von Propionsäure ebenfalls begünstigen (orange Linie, Abbildung 80). Weitere mögliche Inter-Species-Elektronentransfers werden im Folgenden mit unterschiedlichen in dieser Arbeit identifizierten und teilweise eigenisolierten anaeroben Mikroorganismen besprochen.

5.6 Substrate und Produkte definierter Co-Kulturen

Die bakteriellen Typstämme von Mikroorganismen, die häufig oder in unterschiedlichen syntroph propionsäureoxidierenden Kulturen identifiziert worden sind, wurden in definierte Co-Kulturen mit eigenisolierten methanogenen Archaea inkubiert, um zu ermitteln, ob sich das Substratverhalten der anaeroben Bakterien in Co-Kultur im Vergleich zur Einzelkultivierung unterscheidet und eventuell ein „Inter-Species-Elektronentransfer“ zwischen den Mikroorganismen vorliegt.

5.6.1 Co-Kulturen mit *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261

Die chemischen Analysen des kultivierten *Aminobacterium colombiense* DSM12261 mit (Abbildung 105) und ohne methanogenen Eigenisolaten (Abbildung 104) zeigten geringfügige Anstiege der Konzentrationen von Acetat in den Medien, welche bei der Co-Kultivierung mit den methanogenen Eigenisolaten von der syntrophen Oxidation des im Reaktorfiltrat vorhandenen Valins (Abbildung 125, Baena *et al.* 1998) herrühren könnte. Messungen des Valin- und des Isobutyratgehalts während der Inkubation von *Aminobacterium colombiense*^T DSM12261 mit und ohne hydrogenotroph Methanbildenden Archaea können den Hinweis eines „Inter-Species-Elektronentransfers“ chemisch analytisch bestätigen.

5.6.2 Co-Kulturen mit *Wolinella succinogenes*^T DSM1740

Co-Kultivierung von *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 zeigte eine Akkumulation von Acetat (Abbildung 103 B). Zur Herstellung von Acetat wird unter anderem der Enzymkomplex Kohlenmonoxid Dehydrogenase/ Acetyl-CoA Synthase (CODH/ ACS) benötigt. Dieser Enzymkomplex bildet das Schlüsselenzym des Acetyl-CoA-Wegs (Kapitel 1.8). In *Wolinella succinogenes* wurde durch Sequenzierung des Gesamtgenoms eine Acetyl-CoA Synthetase gefunden jedoch keine CO Dehydrogenase (CODH) und keine Acetat Kinase (Baar *et al.* 2003). Für *Methanobacterium formicicum* ist bisher ebenfalls nicht bekannt, dass dieses methanogene Archaeon einen CODH/ ACS Komplex besitzt. *Methanosarcina barkeri* verwendet die bifunktionale Carboxy-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase, welche sowohl die Aktivierung von Acetat für die Methanproduktion katalysiert (Kapitel 1.9.1.1.2) als auch bei der CO₂ Fixierung über Acetyl-CoA beteiligt sein kann. *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 baut Acetat ab (Abbildung 103 A), da Acetat nicht wie in der Co-Kultur von *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 mit *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 angereichert wird (Abbildung 103 B). Es besteht die Möglichkeit, dass die Methanogenese von *Methanosarcina barkeri* aufgrund von Nitrat (3 mmol L⁻¹, Klüber und Conrad 1998), Nitrit (50 µmol L⁻¹, Klüber und Conrad 1998), Stickstoffmonoxid (0,9 µmol L⁻¹, Klüber und Conrad 1998), Distickstoffmonoxid (130 µmol L⁻¹, Klüber und Conrad 1998) oder Ammoniak (176 mmol NH₃-N L⁻¹, Angelidaki und Ahring 1993, 117 mmol NH₃-N L⁻¹, Sawayama *et al.* 2004) gehemmt sein sollte, könnte die Energiegewinnung ausgehend von Acetyl-CoA über phosphoryliertes Acetat zu Acetat durchgeführt werden. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Methanogenese nicht auch die Produktion von Acetat gehemmt wird, wie Westermann *et al.* (1989) mit 2-Bromoethansulfonsäure ermittelten. Auch kann die Methanbildung von *Methanobacterium formicicum* durch flüchtige Fettsäuren oder Ammoniak gehemmt werden (Hobson und Shaw 1976). *Wolinella succinogenes*^T DSM1740 sollte erneut mit *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 sowie *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 co-kultiviert werden, da

ermittelt werden sollte, ob eine Hemmung der Methanogenese durch erhöhte Konzentrationen von Nitrat, Nitrit oder Ammoniak im Medium vorliegt, gebildet durch *Wolinella succinogenes*^T DSM1740.

5.6.3 Co-Kulturen mit *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292

Co-Kulturen von *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 beziehungsweise *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 zeigten in dieser Arbeit eine erhöhte Produktion von Acetat (Abbildung 101 A, B). Das Acetat wurde von *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 abgebaut (Abbildung 101 A), da Methan gebildet wurde (Abbildung 111). Bei Co-Kultivierung thermophiler Vertreter der Gattung *Clostridium* wurde von Weimer und Zeikus (1977) und Smiti *et al.* (1986) beschrieben, dass in einer anaeroben Kultur mit methanogenen Archaea ein durch die von H₂ und CO₂ ausgehende Methanogenese erhöhter Elektronengehalt zur Verfügung steht. Mit *Clostridium tyrobutyricum* wurde eine pH-Abhängigkeit der Produkte ermittelt (Jo *et al.* 2008) Dies war der Grund, dass bei dem *Clostridium* eine Verschiebung der Umsetzung des Acetyl-CoA von Ethanol zu Acetat vollzogen wurde. Dies könnte auch der Fall in der hier Co-Kultivierten Art *Clostridium sartagoforme*^T DSM1292 mit den eigenisolierten methanogenen Archaea gewesen sein. Die Annahme untermauern könnten zukünftige Messungen des Ethanol und Butyrat Gehalts in Abhängigkeit der Inkubationsdauer der definierten Mischkulturen.

6 Zusammenfassung

Die vorgelegte Dissertation behandelte die Aufklärung des Populationsmix anaerober Bakterien mit Beteiligung an der sekundären Fermentation der Biogasherstellung in Nachwachsende Rohstoffe- (NawaRo) Biogasanlagen und den Einfluss methanogener Archaea auf syntrophe Substratumsätze bei einem mit Propionsäure versäuerten Ausgangsszenario. Die sekundäre Fermentation der Biogasherstellung wird hauptsächlich von syntrophen Stoffwechseln zwischen den unterschiedlichsten anaeroben Bakterien bestimmt. Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Acetat werden bei der sekundären Fermentation in Biogasanlagen gebildet, welche methanogene Archaea zu Methan in der die Biogasherstellung abschließende Methanogenese umsetzen. Indem hydrogenotrophe methanogene Archaea den Wasserstoff-Partialdruck gering halten, begünstigen sie den Abbau energetisch unattraktiver Substrate durch Inter-Spezies-Elektronentransfers. In einem durch Überfütterung nicht ausgeglichenen Fermenter einer Biogasanlage kann eine bakteriell bedingte Versäuerung durch unerwünschte kurzkettige Fettsäuren auftreten, beispielsweise durch die Akkumulation von Propionsäure. Aufgrund der Anreicherung von Propionsäure wird die Methanogenese energetisch gehemmt. Somit kann der gesamte Prozess der Herstellung von Biogas zum Erliegen kommen, was Agrarwirte im schlimmsten Fall finanziell ruiniert. Um die mikrobiellen Auswirkungen der Versäuerung durch Propionsäure zu analysieren, wurden vom Prüf und Forschungsinstitut Pirmasens e. V. propionsäureabbauende Anreicherungskulturen aus vier NawaRo Biogasanlagen im Rahmen eines durch finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm „Nachwachsende Rohstoffe“ für diese Dissertation zur Verfügung gestellt. Durch Analyse der bakteriellen 16S rDNA mithilfe der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese und dem Restriktions Längen Polymorphismus aus diesen in dieser Arbeit stabilisierten propionsäureabbauenden Mischkulturen und Fermentern wurde ermittelt, dass sich unter den Bakterien hauptsächlich Clostridiales aber auch Bacterioides, δ - ϵ - sowie γ -Proteobakterien, Spirochäten, Synergistales und ungewöhnlicher Weise Thermotogales befinden. Aus propionsäureabbauenden Mischkulturen und aus Fermentern von mesophilen NawaRo-Biogasanlagen wurden anaerobe Bakterien und methanogene Archaea durch mikrobiologische Verdünnungstechniken und alternativen Substratangeboten angereichert und isoliert. Die bakteriellen Kulturen *Clostridium sartagoforme* Stamm Ap1a520 und *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a520 wurden aus den propionsäureabbauenden Mischkulturen reinisoliert, indem ihnen alternative Substrate angeboten wurden. Sowohl aus Fermentern und Nachgärern von drei NawaRo-Biogasanlagen als auch aus zwei Laborfermentern des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Abteilung Bioverfahrenstechnik AG Molekularbiologie wurden Reinkulturen der Arten

Methanobacterium formicicum, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina sp.*, *Methanosaeta concilii* und *Methanomethylovorans sp.* isoliert. Damit wurden in dieser Arbeit unter anderem alle typischen bisher durch molekularbiologische Methoden identifizierten Genera methanogener Archaea aus unterschiedlichen Fermentern kultiviert. Bei der molekularbiologischen Analyse archaealer chromosomaler DNA wurde gezeigt, dass die *specifically amplified polymorphic* DNA-PCR (SAPD-PCR) eine geeignete Methode darstellt, Stämme der gleichen Art methanogener Archaea voneinander zu unterscheiden. Die Methanproduktion der reinkultivierten methanogenen Archaea wurde gaschromatographisch analysiert und zeigte, dass die hydrogenotrophe Methanogenese der zeiteffizientere und ergiebigere Weg zur Bildung von Methan ist. Des Weiteren wurde durch Bestimmung der Zellzahl des Stamms *Methanoculleus bourgensis* Stamm TAF1.1 bei gleichzeitiger Messung der Methanproduktion gezeigt, dass die Methanbildung nicht zwangsläufig mit dem Wachstum korreliert. Gezielte Mischkulturen von bei der sekundären Fermentation beteiligten Bakterien mit methanogenen Archaea bewiesen einen energetisch begünstigenden Einfluss der Bakterien durch hydrogenotroph Methan bildenden Archaea mithilfe der *high performance liquid chromatography* (HPLC) der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Fumarat, Succinat und Propionat im Medium und Gaschromatographie der Produktion von Methan im gasförmigen Kulturüberstand in Abhängigkeit der Inkubationsdauer, da Bakterien Produkte abbauten beziehungsweise bildeten, die sie unter den gegebenen Bedingungen ohne hydrogenotrophe Archaea nicht umsetzten. Neben Pflanzenfasern beinhaltete für Kultivierungen eigen hergestelltes Reaktorfiltrat Acetat, eine essentielle Aminosäure Valin und den Zuckeralkohol Glycerol, was ebenfalls mit der HPLC ermittelt wurde.

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Kooperationsarbeit erstmals stabile Konsortien syntroph Propionsäure abbauender Bakterien bis zu einem Volumen von 500 mL kultiviert, deren Stoffwechselverhalten mit unterschiedlichen Substraten analysiert und Bakterien aus diesen Konsortien identifiziert. Das *up-scaling* der Kulturgrößen sollte weitergeführt werden, um die Konsortien kommerziell einsetzen zu können. Gleichermaßen sollte die in dieser Arbeit begonnene Isolierung der an der syntrophen Oxidation von Propionsäure beteiligten Bakterien fortgeführt werden um die Charakterisierung und Identifizierung der am syntrophen Abbau von Propionsäure beteiligten Mikroorganismen aus NawaRo-Biogasanlagen zu vervollständigen. Erstmals wurden in dieser Arbeit methanogene Archaea aus mesophilen Fermentern laufender NawaRo-Biogasanlagen und mesophilen sowie thermophilen Laborfermentern reinisoliert, die bisher nur molekularbiologisch in Biogasanlagen identifiziert worden sind. Zur Unterscheidung unterschiedlicher Stämme gleicher Arten methanogener Archaea erwies sich die *specifically amplified polymorphic* DNA-PCR (SAPD-PCR) als geeignet. Nach einer methodischen Optimierung kann die SAPD-PCR für methanogene Archaea zu einer dienstleistungsfähigen Methode zur Identifizierung methanogener Archaea in Biogasfermentern entwickelt werden. Außerdem wurde die Bedeutung von Inter-Spezies-Elektronentransfers zwischen Bakterien aus der primären und sekundären Fermentation und methanogener Archaea durch gezielte Co-Kultivierung der Bakterien mit eigenisolierten methanogenen Archaea herausgestellt. Aufgrund der Erkenntnisse aus den gezielten Co-Kultivierungen und der in dieser Arbeit identifizierten fermentativen Bakterien sollte das Fernziel angestrebt werden, neben den bereits stabilen Konsortien gezielte Co-Kulturen für den kommerziellen Einsatz zur Stabilisierung von Biogasanlagen zu entwickeln. Des Weiteren ist der biochemische Mechanismus auf welche Weise *Proteiniphilum acetatigenes* die syntrophe Oxidation von Propionsäure begünstigt nicht bekannt. Mit dem Eigenisolat *Proteiniphilum acetatigenes* Stamm Fp1a kann mit definierten Co-Kulturen unter Verfolgung radioaktiv markierter Substrate der Mechanismus ermittelt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Abschlussbericht zum Verbundprojekt 22004007 und 22003008. 2011. Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozesssicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung. Im Auftrag der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR).
- Adrian, N. R., Arnett, C. M. 2004. Anaerobic biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Acetobacterium malicum* strain HAAP-1 isolated from a methanogenic mixed culture. *Current Microbiology* 48(5) 332-340.
- AEE. 2011a. [Agentur für Erneuerbare Energien. http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-stromversorgung-2020-entwicklung-des-energiemixes.html](http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-stromversorgung-2020-entwicklung-des-energiemixes.html) (16.04.2011).
- AEE. 2011b. [Agentur für Erneuerbare Energien. http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-ausbau-der-Erneuerbaren-energien-bis-2020-1.html](http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-ausbau-der-Erneuerbaren-energien-bis-2020-1.html) (16.04.2011).
- AEE. 2011c. [Agentur für Erneuerbare Energien. http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-entwicklung-des-kraftwerksparks-und-versorgungssicherheit-2020.html](http://www.unendlich-viel-energie.de/de/wirtschaft/detailansicht/article/135/grafik-dossier-entwicklung-des-kraftwerksparks-und-versorgungssicherheit-2020.html) (16.04.2011).
- AEE. 2012. Der volle Durchblick in Sachen Energiepflanzen. [Agentur für Erneuerbare Energien.](http://www.unendlich-viel-energie.de/uploads/media/AEE_Durchblick_Energiepflanzen_Mai12.pdf)
URL:
http://www.unendlich-viel-energie.de/uploads/media/AEE_Durchblick_Energiepflanzen_Mai12.pdf (25.08.2012).
- Ahring, B. K. 2003. Perspectives for Anaerobic Digestion. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 81. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- AGEB. 2012. Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V. <http://www.ag-energiebilanzen.de/viewpage.php?idpage=62> (21.08.2012). Druckgenehmigung von Dr. H.-J. Ziesing (Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V.) vom 29.09.2012.
- Allen, S. H. G., Linehan, B. A. 1977. Presence of Transcarboxylase in *Arachnia propionica*. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 27(3):291-292.
- Allen, S. H. G., Kellermeyer, R. W., Stjernholm, R. L., Wood, H. G. 1964. Enzymes from Propionibacteria. *Journal of Bacteriology* 87(1):171-187.
- Almarsdottir, A. R., Tarazewicz, A., Gunnarsson, I., Orlygsson, J. 2010. Hydrogen production from sugars and complex biomass by *Clostridium* species, AK₁₄, isolated from Icelandic hot spring. *Icelandic Agricultural Sciences* 23: 61-71.

- Amani, T., Nosrati, M., Mousavi S. M. 2011. Using enriched cultures for elevation of anaerobic syntrophic interactions between acetogens and methanogens in a high-load continuous digester. *Bioresource Technology*. 102:3716–3723.
- Andreesen, J. R., Gottschalk, G., Schlegel, H. G. 1970. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Archives of Microbiology* 72:154-174.
- Andreesen, J. R., Ljungdahl, L. G. 1973. Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *Journal of Bacteriology* 116(2):867–873.
- Andrew, D. C. 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater 15th Ed. American Public Health Association, Inc., Washington.
- Angelidaki, I., Ahring, B. K. 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38:560-564.
- Arai, T., Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya K. 2001. Sequence of celQ and properties of CelQ, a component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(5-6):660-666.
- Arpe, H.-J. 2007. Industrielle Organische Chemie. Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte (Sechste Auflage). Wiley-vch. ISBN: 978-3-527-31540-6.
- Astashkin, A. V., Seravalli, J., Mansoorabadi, S. O., Reed, G. H., Ragsdale, S. W. 2006. Pulsed electron paramagnetic resonance experiments identify the paramagnetic intermediates in the pyruvate ferredoxin oxidoreductase catalytic cycle. *Journal of the American Chemical Society* 128(12):3888-3889.
- Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. 2008a. Drucksache 16/9477, Beschlussempfehlung und Bericht des Ausschusses für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (16. Ausschuss) zu dem Gesetzentwurf der Bundesregierung, – Drucksachen 16/8148, 16/8393 – , Entwurf eines Gesetzes zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich und zur Änderung damit zusammenhängender Vorschriften. URL: dip21.bundestag.de/dip21/btd/16/094/1609477.pdf (30.06.2012), Seite 18.
- Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. 2008b. Drucksache 16/9477, Beschlussempfehlung und Bericht des Ausschusses für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (16. Ausschuss) zu dem Gesetzentwurf der Bundesregierung, – Drucksachen 16/8148, 16/8393 – , Entwurf eines Gesetzes zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich und zur Änderung damit

- zusammenhängender Vorschriften. URL:
dip21.bundestag.de/dip21/btd/16/094/1609477.pdf (30.06.2012), Seite 19.
- Ausschuss für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. 2008c. Drucksache 16/9477, Beschlussempfehlung und Bericht des Ausschusses für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (16. Ausschuss) zu dem Gesetzentwurf der Bundesregierung, – Drucksachen 16/8148, 16/8393 – , Entwurf eines Gesetzes zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich und zur Änderung damit zusammenhängender Vorschriften. URL:
dip21.bundestag.de/dip21/btd/16/094/1609477.pdf (30.06.2012), Seite 32.
- Ayres G. C., Lara F. J. 1962. Fumarate hydratase from *Propionibacterium pentosaceum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 62:435-437.
- Baar, C., Eppinger, M., Raddatz, G., Simon, J., Lanz, C., Klimmek, O., Nandakumar, R., Gross, R., Rosinus, A., Keller, H., Jagtap, P., Linke, B., Meyer, F., Lederer, H., Schuster, S. C. 2003. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *PNAS* 100(20):11690–11695.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J.-L., Patel, B. K. C. 1998. *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel amino acid degrading and sulfate reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. *Systematic and Applied Microbiology* 21:498-504.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43(2):260-296.
- Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S., Wolfe, R. S. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27(4):355-361.
- Baldwin, R. L., Wood, W. A., Emery, R. S. 1965. Lactate metabolism by *Peptostreptococcus elsdenii*. Evidence for lactyl coenzyme a dehydrase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 97(2):202-213.
- Bapteste, E., Brochier, C., Boucher, Y. 2005. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1(5):353-363. Druckerlaubnis von Creative Commons URL: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.de> (24.08.2012).
- Baron. S. 1996. *Medical Microbiology* 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
- Barondeau, D. P. und Lindahl, P. A. 1997. Methylation of carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and mechanism of acetyl coenzyme A synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 119(17):3959-3970.

- Bauer, C., Lebuhn, M., Gronauer, A. 2009. Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schriftenreihe. ISSN 1611-4159. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) Freising-Weihenstephan.
- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A., Lebuhn, M. 2008. Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science Technology* 58(7):1433-1439.
- Bayer, E. A., Morag, E., Lamed, R. 1994. The cellulosome - a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnology* 12(9):379-386.
- Becher, B., Müller, V., Gottschalk, G. 1992. N5-methyl-tetrahydromethanopterin: Coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gol is a Na⁺-translocating membrane protein. *Journal of Bacteriology*, 174(23):7656-7660.
- BEE. 2011. Bundesverbandes Erneuerbarer Energie e. V. URL: <http://www.unendlich-vielenergie.de> 16.04.2011.
- Béguin, P., Lemaire, M. 1996. The Cellulosome: An exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31(3):201-236.
- Beifuss, U., Tietze, M., Bäumer, S., Deppenmeier, U. 2000. Methanophenazine: structure, total synthesis and function of a new cofactor from methanogenic archaea. *Angewandte Chemie-International Edition*, 39:2470-2472.
- Berger E., Jones W. A., Jones, D. T., Woods, D. R. 1990. Sequencing and expression of a cellodextrinase (ced1) gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c cloned in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 223:310–318.
- Berk, H., Thauer, R. K. 1997. Function of coenzyme F₄₂₀-dependent NADP reductase in methanogenic archaea containing an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. *Archives of Microbiology* 168:396-402.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62(3):293-300.
- Biavati, B., Vasta, M., Ferry, J. G. 1988. Isolation and Characterization of "*Methanosphaera cuniculi*" sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 54(3):768-771.
- Bleicher, K., Winter, J. 1991. Purification and properties of F₄₂₀-and NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminatans* and *Methanobacterium palustre*, specific for secondary alcohols. *European Journal of Biochemistry* 200(1):43-51.
- Bleicher, K., Zellner, G., Winter, J. 1989. Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiological Letters* 59:307–312.

- BfN. 2011. Bundesverband für Naturschutz. Naturschutzgebiete, Stand 2011. URL: http://www.bfn.de/0308_bios.html (03.07.2012).
- BfN 2012. Bundesverband für Naturschutz. Naturschutzgebiete, Stand 01/2012. URL: http://www.bfn.de/0308_nlp.html (03.07.2012).
- BMELV. 2011. Der volle Durchblick in Sachen Bioenergie. Broschüre. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. URL: http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bmelv.de%2FSharedDocs%2FDownloads%2FBroschueren%2FBioenergie-vollerDurchblick.pdf%3F_blob%3DpublicationFile&ei=NJY4UJrhNI2HswaEjoHoBg&usq=AFQjCNHMLg_Tx_kj6EaOegNeXDjhr8Tx8w (25.08.2012).
- BMU. 1990. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Gesetz über die Einspeisung von Strom aus erneuerbaren Energien in das öffentliche Netz (Stromeinspeisungsgesetz). Fundort: BGBl I 2633, BGBl III 754-9 vom 07.12.1990. URL: <http://archiv.jura.uni-saarland.de/BGBl/TEIL1/1990/19902633.1.HTML> (03.07.2012).
- BMU. 2000. Bundesministerium der Justiz; Fundstelle: BGBl I 2000, 305. Das Erneuerbare-Energien-Gesetz vom 29. März 2000 (BGBl. I S. 305), zuletzt geändert durch das Gesetz vom 22. Dezember 2003 (BGBl. I S. 3074) ist außer Kraft getreten. URL: http://www.bmu.de/erneuerbare_energien/downloads/doc/2676.php.
- BMU. 2002. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Bericht über den Stand der Markteinführung und der Kostenentwicklung von Anlagen zur Erzeugung von Strom aus Erneuerbaren Energien (Erfahrungsbericht zum EEG). URL: http://www.bmu.de/Erneuerbare_energien/downloads/doc/2677.php (30.06.2012).
- BMU. 2004. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Gesetz zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich. Fundstelle: BGBl I 2004, Teil I, Nr. 40, 1918. URL: http://www.bmu.de/erneuerbare_energien/downloads/doc/5982.php (03.07.2012).
- BMU. 2007. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Erfahrungsbericht 2007 zum Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG-Erfahrungsbericht). URL: http://www.bmu.de/Erneuerbare_energien/downloads/doc/40342.php (30.06.2012).
- BMU. 2008a. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Erneuerbare-Energien-Gesetz 2009. Fundstelle: BGBl. I 2008, 2074. URL: http://www.bmu.de/erneuerbare_energien/downloads/doc/40508.php (03.07.2012).

- BMU. 2008b. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Das Erneuerbare-Energien-Gesetz Anlage 2 im Sinne des § 27 Absatz 4 Nr. 2; Fundstelle: BGBl. I 2008, 2093 – 2095. URL: <http://www.buzer.de/gesetz/8423/a156978.htm> (03.07.2012).
- BMU. 2011. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Erneuerbare-Energien-Gesetz. Artikel 1 G. v. 25.10.2008 BGBl. I S. 2074; zuletzt geändert durch Artikel 2 Abs. 69 G. v. 22.12.2011 BGBl. I S. 3044. URL: <http://www.buzer.de/gesetz/8423/a156978.htm> (03.07.2012).
- BMU. 2012. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Eckpunkte der EEG-Novelle sowie sonstige Neuerungen für Erneuerbare Energien. http://Erneuerbare-energien.de/Erneuerbare_energien/doc/47469.php#3 (30.06.2012).
- BMU – KI III 1. 2012. Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011. Grafiken und Tabellen Stand: März 2012 unter Verwendung aktueller Daten der Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat). URL: http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CEcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.erneuerbare-energien.de%2Ffiles%2Fpdfs%2Fallgemein%2Fapplication%2Fpdf%2Fee_in_deutschland_graf_tab.pdf&ei=NHcyULH2KtHUsgai3oGYAw&usq=AFQjCNGWfrVXZgEvzGdFOQKXkPVDw4zWuA&cad=rja (20.08.2012). Druckzustimmung von D. Böhme BMU Referat KI III 1 - Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien vom 21.08.2012.
- Bobik, T. A., Rasche, M. E. 2004. Purification and partial characterization of the *Pyrococcus horikoshii* methylmalonyl-CoA epimerase. *Applied Microbiological Biotechnology* 63:682-685.
- Bolin, B., Döös, B. R., Jäger, J., Warrick, R. A. 1989. The greenhouse effect, climatic change, and ecosystems. John Wiley & Sons. Chichester.
- Boone, D. R., Bryant, M. P. 1980. Propionate-degrading bacterium *Syntrophobacter wolinii* sp. nov., from methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 40:626-632.
- Boone, D. R., Castenholz R. W., Garrity G. M. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Second Edition, Volume 1. Springer, Berlin.
- Boone, D. R., Johnson, R. L., Liu, Y. 1989. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* 55(7):1735-1741.

- Boyle, W.C. 1977. Energy recovery from sanitary landfills. In: A.G. Schlegel, J. Barnea (Eds.) *Microbial Energy Conversion*, Unitar, 119-138.
- Börjesson, P., Gustavson, L., Christersson, L., Linder, S. 1997. Future production and utilisation of biomass in Sweden: Potentials and CO₂ mitigation. *Biomass and Bioenergy* 13:399-412.
- Bramlett, M. R., Stubna, A., Tan, X., Surovtsev, I. V., Munck, E., Lindahl, P. A. 2006. Mossbauer and EPR study of recombinant acetyl-CoA synthase from *Moorella thermoacetica*. *Biochemistry* 45(28):8674-8685.
- Braun, R. 1982. Biogas - Methangärung organischer Abfallstoffe: Grundlagen und Anwendungsbeispiele. Springer Verlag Wien, New York.
- Bréas, O., Guillou, C., Reniero, F., Wada, E. 2001. The global methane cycle: Isotopes and mixing ratios, sources and sinks. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 32(4):257-379.
- Breitig, G., v. Trümping, W. 1982. *Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung*, Band II, Kap. 1.3.21. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Breuer, D. 2007. Der Wettbewerb um die Nutzung landwirtschaftlicher Flächen: Nachwachsende Rohstoffe zur energetischen Nutzung contra Veredlungswirtschaft. Kurzvortrag 26.03.2007, Paul-Löbe-Haus, Sitzungssaal 2600, Berlin.
- Breznak, J. A., Brune, A. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology* 39:453-487.
- Bryant, M., P. 1956. The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *Journal of Bacteriology* 72:162-167.
- Bryant, M. P., Boone, D. R. 1987a. Emended description of strain MST (DSM 800^T), the type strain of *Methanosarcina barkeri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37:169-170.
- Bryant, M. P., Boone, D. R. 1987b. Isolation and characterization of *Methanobacterium formicicum* MF. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37: 171.
- Buswell, A. M. 1936. Anaerobic fermentations, Bull. No. 32, Div. State Water Survey; Univ. of Illinois.
- Buswell, A. M., Fina, L., Müller, H. and Yahiro, A. 1951. Use of C¹⁴ in mechanism studies of methane fermentation. II. Propionic acid. *Journal of the American Chemical Society* 73(4):1809-1811.

- Chang, S., Des Marais, D., Mac, R., Miller, S.L. and Strathearn, G.E. 1983. Prebiotic organic synthesis and origin of life. In: Schopf, J. W. (Editor), *Earth's earliest biosphere - Its origin and evolution*. Princeton University Press, Princeton, N. J., pp. 53-92.
- Chassard, C., Bernalier-Donadille, A. 2006. H₂ and acetate transfers during xylan fermentation between a butyrate-producing xylanolytic species and hydrogenotrophic microorganisms from the human gut. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters* 254:116–122.
- Cardon, B. P., Barker, H. A. 1946. Two new amino-acid-fermenting bacteria, *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*. *Journal of Bacteriology* 52(6):629-634.
- Chen, H., Li, X. L., Ljungdahl, L. G. 1995. A cyclophilin from the polycentric anaerobic rumen fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 is highly homologous to vertebrate cyclophilin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(7):2587-2591.
- Chen, S., Dong, X. 2005a. *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1319-1324.
- Chen, S., Dong, X. 2005b. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2257-226.
- Cicerone, R. J., Oremland, R. S. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2(4):299-327.
- Clark, J. E., Ljungdahl, L. G. 1984. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, an iron-sulfur flavoprotein from *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of Biological Chemistry* 259(17):10845-10889.
- Clark, J. E. Ljungdahl, L. G. 1982. Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 257(7):3833-3836.
- Coquelle, N., Fioravanti, E., Weik, M., Vellieux, F., Madern, D. 2007. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. *Journal of Molecular Biology*. 374:547-562.
- Cord-Ruwisch, R., Lovley, D. R., Schink, B. 1998. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. *Applied Environmental Microbiology* 64(6):2232-2236.
- Coton, E., Coton, M. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 63:296-304.

- Dahle, H., Hannisdal, B., Steinsbu, B. O., Ommedal, H., Einen, J., Larsen, S, J. Ø., Øvreås, L., Norland, S. 2011. Evolution of temperature optimum in *Thermotogaceae* and the prediction of trait values of uncultured organisms. *Extremophiles* 15(4):509-516.
- Dalrymple, B. P., Cybinski, D. H., Layton, I., McSweeney, C. S., Xue, G-P, Swadling, Y. J., Lowry, J. B. 1997. Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology* 143(8):2605-2614.
- Daniels, L., Fuchs, G., Thauer, R. K., Zeikus, J. G. 1977. Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 132(1):118–126.
- Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernède, X. Lindahl, P. A., Fontecilla-Camps J.C. 2003. Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open alpha subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nature Structural Biology* 10(4):271-279.
- De Bok, F. A. M., van Leerdam, R. C., Lomans, B. P., Smidt, H., Lens, P. N. L., Janssen, A. J. H. and Stams, A. J. M. 2006. Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7540-7547.
- De Bok, F. A. M., Plugge, C. M., Stams A. J. M. 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research* 38:1368-1375.
- De Bok, F. A. M., Stams, A. J. M., Dijkema, C., Boone, D. R. 2001. Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4):1800-1804. Druckerlaubnis von der American Society for Microbiology.
- de Graaf, D. (III 1.4), Fendler, R. (III 2.3P). 2010. Umwelt Bundes Amt. Biogaserzeugung in Deutschland. URL: http://spin-project.eu/downloads/0_Hintergrundpapier_Biogas_D.pdf (08.07.2012). SPIN Hintergrundpapier, Januar 2010, Dessau-Roßlau.
- Denger, K., Schink, B. 1992. Energy conservation by succinate decarboxylation in *Veillonella parvula*. *Journal of General Microbiology* 138(5):967-71.
- Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Landtechnik. 2004. Untersuchungen zur Wirkung von Rohglycerin aus der Biodieselerzeugung als leistungssteigerndes Zusatzmittel zur Biogaserzeugung aus Silomais, Körnermais, Rapspresskuchen und Schweinegülle. Ergebnisbericht Im Auftrag von Südsteirische Energie- und Eiweißherzeugung Reg.Gen.m.b.H. (SEEG), Mureck, Österreich. URL: https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCUQFjAA&url=https%3A%2F%2Fwww.nas.boku.ac.at%2Ffileadmin%2F_%2FH931-

[landtechnik%2FAmonPublikationen%2FSEEG-Endbericht.pdf&ei=NgJOUKD4LcWztAbOtICICA&usg=AFQjCNGD32EAMir3G5rKg0vmxaUjCaEtug&cad=rja](#).

- Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A., Gottschalk G. 1990. Reduced coenzyme F₄₂₀: Heterodisulfide oxidoreductase, a proton-translocating redox system in methanogenic bacteria. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 87:9449-9453.
- Deutscher Verband Tiernahrung e. V. 2012. Technologie der Mischfutterherstellung. Artikel. URL: <http://www.dvtiernahrung.de/217.html> (24.08.2012).
- Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzalez, R. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. Biotechnology and Bioengineering 94(5):821-829.
- Dimroth, P., Schink, B. 1998. Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. Archives of Microbiology 170:69-77. Druckerlaubnis von Springer URL: http://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?IID=2012091_1347725649064 vom 15.09.2012.
- Ding S.-Y., Rincon, M. T., Lamed, R., Ingram-Smith, C., Gorrell, A., Lawrence, S. H., Iyer, P. P., Smith, K., Ferry J. G. 2005. Characterization of the acetate binding pocket in the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase. Journal of Bacteriology 187(7):2386-2394.
- Ding, S.-Y., Rincon, M. T., Lamed, R., Martin, J. C., McCrae, S. I., Aurilia, V., Shoham, Y., Bayer, E. A., Flint H. J. 2001. Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of Bacteriology 183(6):1945-1953.
- Dingermann, T., Hänsel, R., Zündorf, I. 2002 Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und klinische Anwendungen. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin; ISBN 3-540-42844-5.
- Dinkel, W. , Frechen, F.-B., Kljavlin, M. 2010. Kinetik des anaeroben Glycerinabbaus mithilfe sulfatreduzierender Bakterien. Chemie Ingenieur Technik, 82(10):1771-1780.
- Don R. H., Cox P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19(14):4008.
- Dong, S., Stams, A. J. M. 1995. Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation. Anaerobe Environmental Microbiology 1:35-39.
- Drake, H. L., Gößner, A. S., Daniel, S. L. 2008. Old acetogens, New light. Annals of New York Academy of Sciences 1125:100-128.
- Drake, H. L., Hu, S.I., Wood, H.G. 1981. Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and

- methyltetrahydrofolate. Properties of phosphotransacetylase. *Journal of Biological Chemistry* 256(21):11137-11144.
- Drennan, C. L., Peters, J. W. 2003. Surprising cofactors in metalloenzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 13(2):220-226.
- Dreyer, J. L. 1985. Isolation and biochemical characterization of maleic-acid hydratase, an iron-requiring hydro-lyase. *European Journal of Biochemistry* 150:145-154.
- Doukov, T. I., Blasiak, L. C., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., Drennan C. L. 2008. Xenon in and at the end of the tunnel of bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* 47(11):3474-3483.
- Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., Drennan, C. L. 2002. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* 298(5593):567-572.
- Dröge, S., Limper, U., Emtiazi, F., Schöning, I., Pavlus, N., Drzyzga, O., Fischer, U., König, H. 2005. In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51(2):57-64.
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. 2012. List of recommended media for microorganisms. URL: <http://www.dsmz.de/?id=441> (27.09.2012).
- Dumitru, I. F., Iordachescu, D., Niculescu, S. 1970. Chromatographic purification, crystallization and study of vegetable L-alanine: 2-oxoglutarate-aminotransferase properties. *Experientia* 26:837-838.
- Eder, B., Schulz, H. 2007. Biogas Praxis. Grundlagen. Planung. Anlagenbau. Beispiele. Wirtschaftlichkeit. Ökobuch Magnum. ISBN: 9783936896138.
- Efron, B. 1979. Bootstrap Methods: Another look at the jackknife. *The Annals of Statistics* 7(1):1-26.
- Efron, B., Tibshirani, R. J. An Introduction to the bootstrap. Boca Raton, CRC Press, 1994.
- Eirich, L. D., Vogels, G. D., Wolfe, R. S. 1979. Distribution of coenzyme F₄₂₀ and properties of its fragments. *Hydrolytic Journal of Bacteriology* 140:20-27.
- Ehhalt, D.H. 1974. The atmospheric cycle of methane. *Tellus* 26B:58-70.
- Ellermann, J., Hedderich, R., Bocher, R., Thauer, R. K. 1988. The final step in methane formation: Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *European Journal of Biochemistry* 172:669-677.

- Elsden, S.R., Volcani, B. E., Gilchrist, F. M. C., Lewis. D. 1956. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *Journal of Bacteriology* 72(5):681-689.
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., Thauer, K. R. 1997. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science* 278:1457-1462.
- Etioppe, G. and Klusman, R. W. 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere* 49 (8):777-789.
- EU. 1992. Europäische Union. Verordnung (EWG) Nr. 1765/92 des Rates vom 30. Juni 1992 zur Einführung einer Stützungsregelung für Erzeuger bestimmter landwirtschaftlicher Kulturpflanzen URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31992R1765:DE:HTML> (03.07.2012)
- EU. 2008. Europäische Union IP 08/1069, Amtsblatt der Europäischen Union 2008/C 324/07. URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2008:324:0011:0011:DE:PDF> (03.07.2012).
- Evans, D. J. 2005. Chemistry relating to the nickel enzymes CODH and ACS. *Coordination Chemistry Reviews* 249:1582-1595.
- Fachverband Biogas e. V. 2012. Branchenzahlen 2011 und Branchenentwicklung 2012/ 2013. URL: [http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/\\$file/12-06-01_Biogas%20Branchenzahlen%202011-2012-2013.pdf](http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/$file/12-06-01_Biogas%20Branchenzahlen%202011-2012-2013.pdf) (20.08.2012), Stand: 06/2012; Druckerlaubnis von Dr. S. Rauh, Referatsleitung Landwirtschaft/ Referatsleitung Mitgliederservice des Fachverband Biogas e. V. vom 24.08.2012.
- Farrelly, V., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7):2798-2801.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - phylogeny interference package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
- Ferry, J. G. 1997. Methane: small molecule, big impact. *Science* 278: 1413–1414.
- Ferry, J. G. 1992. Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27(6):473-502.
- Ferry, J. G., Wolfe, R. S. 1976. Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Archives of Microbiology* 107:33-40.

- Ferry, J. G., Smith, P. H., Wolfe, R. S. 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 24:465-469.
- Flint, H.J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., White, B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nature reviews microbiology 6:121-131.
- FNR. 2010. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. 5., vollständig überarbeitete Auflage, ISBN 3-00-014333-5, Gülzow. URL: http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/literatur/pdf_208-leitfaden_biogas_2010_neu.pdf (08.07.2012).
- FNR. 2012a. Biogas. Allgemeine Broschüre zum Thema Biogas. 8. überarbeitete Auflage 2012. Artikelnummer 175. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. URL: mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/b/i/biogas_web.pdf (24.08.2012)
- FNR. 2012b. Energiepflanzen – Bunte Vielfalt auf dem Acker. Poster. Stand 2012. Artikelnummer 546. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. URL: http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/2/0/2012_final_energiepflanzen_poster.pdf (08.07.2012).
- Fontaine, F. E., Peterson, W. H., McCoy, E., Johnson, M. J., Ritter, G. J. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. Journal of Bacteriology 43:701-715.
- Fox, G. E., Pechman, K. R., Woese, C. R. 1977. Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic-acid - molecular approach to prokaryotic systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 47(1):44-57.
- Fricke, W. F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., Thauer, R. K. 2006. The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. Journal of Bacteriology 188(2):642-658.
- Frimmer, U., Widdel, F. 1989. Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria. Archives of Microbiology 152:479-483.
- Fröhlich, J., Pfannebecker, J. 2006. Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Patent application: DE 10 2006 022 569.4-41.
- Galagan J. E., Nusbaum C., Roy A., Endrizzi M. G., Macdonald P., FitzHugh W., Calvo S., Engels R., Smirnov S., Atnoor D., Brown A., Allen N., Naylor J., Stange-Thomann N., DeArellano K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A.,

- Ye, W., Zimmer, A., Barber, R. D., Cann, I., Graham, D. E., Grahame, D. A., Guss, A. M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H. C., Krzycki, J. A., Leigh, J. A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J. N., Smith, K., Springer, T. A., Umayam, L. A., White, O., White, R. H., Conway de Macario, E., Ferry, J. G., Jarrell, K. F., Jing, H., Macario, A. J., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K. R., Swanson, R. V., Zinder, S. H., Lander, E., Metcalf W. W., Birren, B. 2002. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Research* 12:532–542.
- Galivan, J. H., Allen, S. H. G. 1968. Methylmalonyl coenzyme A decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 243(6):1253-1261.
- Gallert, C., Winter, J. 2008. Propionic acid accumulation and degradation during restart of a full-scale anaerobic biowaste digester. *Bioresource Technology*. 99:170–178.
- Garcia, J. L., Ollivier, B., Whitman, W. B. In: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. 2006. *Prokaryotes*. 3rd Edition 208-230.
- Gong, W., Hao, B., Wei, Z., Ferguson, D. J. Jr., Tallant, T., Krzycki, J. A., Chan, M. K. 2008. Structure of the alpha2epsilon2 Ni-dependent CO dehydrogenase component of the *Methanosarcina barkeri* acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(28):9558-63.
- Gorrell, A., Lawrence, S. H., Ferry, J. G. 2005. Structural and kinetic analyses of arginine residues in the active site of the acetate kinase from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* 280(11):10731–10742.
- Gourdon, R., Vermande, P. 1987. Effects of propionic acid concentration on anaerobic digestion of pig manure. *Biomass* 13:1-12.
- Goward, C. R., Nicholls, D. J. 1994. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science* 3(10):1883-1888.
- Görisch, U., Helm, M. 2007. *Biogasanlagen*. 2., aktualisierte Auflage, Verlag: Eugen Ulmer KG, Stuttgart. ISBN: 978-3-8001-5573-6.
- Greening, R.C., Leedale, J.A.Z. 1989. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Archives of Microbiology* 151(5):399-406.
- Grahame, D. A., Gencic, S., DeMoll, E. 2005. A single operon-encoded form of the acetyl-CoA decarbonylase/synthase multienzyme complex responsible for synthesis and cleavage of acetyl-CoA in *Methanosarcina thermophila*. *Archives of Microbiology* 184(1):32-40.
- Gronow, S., Welnitz, S., Lapidus, A., Nolan, M., Ivanova, N., Del Rio, T. G., Copeland, A., Chen, F., Tice, H., Pitluck, S., Cheng, J.-F., Saunders, E., Brettin, T., Han, C., Detter, J. C. Bruce,

- D., Goodwin, L., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C. D., Pat, Mavromatis, K., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H.-P., Lucas, S. 2010. Complete genome sequence of *Veillonella parvula* type strain (Te3T). *Standards in Genomic Sciences* 2:57-65.
- Guangsheng, C., Plugge, C. M., Roelofsen, W., Houwen, F. P., Stams, A. J. M. 1992. *Selenomonas acidaminovorans* sp. nov., a versatile thermophilic proton-reducing anaerobe able to grow by decarboxylation of succinate to propionate. *Archives of Microbiology* 157:169-175.
- Harmsen, H. J. M., Van Kuijk, B. L., Plugge, C. M., Akkermans, A. D., De Vos, W. M., Stams A. J. M. 1998. *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1383-1387.
- Harmsen, H. J. M., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M., De Vos, W. M. 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1656-1663.
- Harper S. R., Pohland F. G. 1986. Biotechnology Report: Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVIII:585-602. Druckerlaubnis von John Wiley and Sons vom 24.08.2012 URL:
https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?IID=2012081_1345828051281
(24.08.2012).
- Harriss, R. C. 1989. Historical trends in atmospheric methane concentration and the temperature sensitivity of methane outgassing from boreal and polar regions. In: *Ozone Depletion, Greenhouse Gases, and Climate Change. Proceedings of a joint symposium by the board on atmospheric sciences and climate and the committee on global change commission on physical sciences, mathematics, and resources.* National Academic Press. Washington D.C. S. 79-85.
- Hartzell, P. L., Zvilius, G., Escalante-Semerena, J. C., and Donnelly, M. I. 1985. Coenzyme F420 dependence of the methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 133, 884-890.
- Hegg, E. L. 2004. Unraveling the structure and mechanism of acetyl-coenzyme A synthase. *Accounts of Chemical Research* 37(10):775-783.

- Hendrickson, E. L., Leigh, J. A. 2008. Roles of coenzyme F₄₂₀-reducing hydrogenases and hydrogen- and F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in reduction of F₄₂₀ and production of hydrogen during methanogenesis. *Journal of Bacteriology* 190(14):4818-4821.
- Henning, C. 2012. Stichwort: Flächenstilllegungen., online im Internet: <http://wirtschaftslexikon.gabler.de/Archiv/8243/flaechenstilllegungen-v5.html> (03.07.2012). Gabler Wirtschaftslexikon, Gabler Verlag.
- Hetzl, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A. J., Golding, B. T., Buckel, W. 2003. Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum* - An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *European Journal of Biochemistry* 270:902–910. Druckerlaubnis von John Wiley and Sons vom 14.09.2012: URL: <http://click.info.copyright.com/?qs=8bc605d7e47dcb94caafeb22ebc4b1fb1c027213563e696a961ab382360bcc87411f6d6f508735ea> (14.09.2012).
- Hilpert W., Schink B., Dimroth P. 1984. Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. *EMBO Journal* 3:1665-1670.
- Himes, R. H., Wilder, T. 1968. Formyltetrahydrofolate synthetase . Effect of pH and temperature on the reaction. *Archives of Biochemical Biophysics* 124:230-237.
- Hino, T., Shimada, K., Maruyama, T. 1994. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6):1827-1831.
- Hobson, P. N. 1965. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen Bacteria. *Microbiology* 38(2):167-180.
- Hobson, P. N., Shaw, B. G. 1976. Inhibition of methane production by *Methanobacterium formicum*. *Water Research* 10:849-852.
- Hoffmann, A., Hilpert, W., Dimroth, P. 1989. The carboxyltransferase activity of the sodium-ion-translocating methylmalonyl-CoA decarboxylase of *Veillonella alcalescens*. *European Journal of Biochemistry* 179:645-650.
- Houwen, F. P., Plokker, J., Stams, A. J. M., Zehnder, J. B. 1990. Enzymatic evidence for involvement of the methylmalonyl-CoA pathway in propionate oxidation by *Syntrophobacter wolinii*. *Archives of Microbiology* 155:52-55.
- Houwen, F. P., Dijkema, C., Schoenmakers, C. H. H., Stams, A. J. M., Zehnder, A. J. B. 1987. ¹³C-NMR study of propionate degradation by a methanogenic coculture. *FEMS Microbiology Letters* 41:269-274.

- Huang, L, Forsberg, C. W. 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. Applied and Environmental Microbiology 56(5):1221-1228.
- Huder, J. B., Dimroth, P. 1993. Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula*. The Journal of Biological Chemistry 268(33):24564-24571.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. 2002. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1729-1735.
- Ingram-Smith, C., Gorrell, A., Lawrence, S. H., Iyer, P., Smith, K., Ferry, J. G. 2005. Characterization of the acetate binding pocket in the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase. Journal of Bacteriology 187(7):2386-2394.
- Ito, M., Kotera, M., Matsumoto, T., Tatsumi, K. 2009. Dinuclear nickel complexes modeling the structure and function of the acetyl CoA synthase active site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(29):11862-11866.
- Iyer, P. P., Lawrence, S. H., Luther, K. B., Rajashankar, K. R., Yennawar, H. P., Ferry, J.G., Schindelin H. 2004. Crystal structure of phosphotransacetylase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila*. Structure 12:559-567.
- Jablonski, P. E., DiMarco, A. A., Bobik, T. A., Cabell, M. C., Ferry, J. G. 1990. Protein content and enzyme activities in methanol- and acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Journal of Bacteriology 172(3):1271-5.
- Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. 1982. Aminosäuren, Peptide, Proteine. ISBN 3-527-25892-2. Verlag Chemie, Weinheim.
- Janssen, P. H., Liesack, W. 1995. Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. Archives of Microbiology 164(1):29-35.
- Janssen P. H., Liesack, W., Kluge, C., Seeliger, S., Schink, B., Harfoot, C. G. 1996. Sodium-dependent succinate decarboxylation by a new anaerobic bacterium belonging to the genus *Peptostreptococcus*. Antonie van Leeuwenhoek 70:11-20.
- Janssen, P. H., Liesack, W., Schink, B. 2002. *Geovibrio thiophilus* sp. nov., a novel sulfurreducing bacterium belonging to the phylum Deferribacteres. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1341–1347.

- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M., Zehnder, A. J. B. 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiological Ecology* 73(4):339-344.
- Jindou S, Karita S, Fujino E, Fujino T, Hayashi H, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. 2002. Alpha-Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *Journal of Bacteriology* 184(2):600-604.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, J. M. 2008. The effects of pH on carbon material and energy balances in hydrogen-producing *Clostridium tyrobutyricum* JM1. *Bioresource Technology* 99:8485-8491.
- Johns, A. T. 1952. The Mechanism of Propionic Acid Formation by *Clostridium propionicum* *Journal of General Microbiology* 6:123-127.
- Jones, W. J., Donnelly, M. I., Wolfe, R.S. 1985. Evidence of a common pathway of carbon dioxide reduction to methane in methanogens. *Journal of Bacteriology*. 163(1):126-31.
- Kaden, J., Galushko, A. S., Schink, B. 2002. Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Archives of Microbiology* 178(1):53-58.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H. 2001. *Energie aus Biomasse – Grundlagen, Techniken und Verfahren*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W., Schnell, S. 2012a. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:2106-2119.
- Kampmann, K., Ratering, S., Baumann, R., Schmidt, M. Zerr, W., Schnell S. 2012b. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Systematic and Applied Microbiology* 35:404-413.
- Karakashev, D., Batstone, D. J., Trably, E., Angelidaki, I. 2006. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5138-5141.
- Kern, M., Simon, J. 2009. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787:646-656.
- Khalil, M. A. K., Rasmussen, R. A. 1987. Atmospheric methane: Trends over the last 10,000 years. *Atmospheric Environment* 21(11):2445-2452.

- Kim, E. J., Feng, J., Bramlett, M. R., Lindahl, P. A. 2004. Evidence for a proton transfer network and a required persulfide-bond-forming cysteine residue in Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Biochemistry* 43(19):5728-5734.
- Kirchman, D. L. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 39:91-100.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H. G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalysed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 56(2):341-361.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I. 2009a. Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems. *Bornimer Agrartechnische Berichte*, Heft 67, ISSN 0947-7314, Potsdam-Bornim.
- Klocke, M., Mundt, K., Sontag, M., Schönberg, M., Linke B. 2009b. Microbial community structure within a two-stage biogas reactor system with bioleaching of rye silage. *Bornimer Agrartechnische Berichte*, Heft 68:126-139.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B. 2008. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31:190-205.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology*. 30, 139-151. Druckerlaubnis von Elsevier vom 25.08.2012. URL: https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?IID=2012081_1345893307156 (25.08.2012).
- Kloss, R. 1986. Planung von Biogasanlagen. Oldenbourg Verlag München, Wien.
- Klüber, H.D., Conrad, R. 1998. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. *FEMS Microbiology Ecology* 25:331-339.
- Koch, M. E., Dolfing, J., Wuhrmann, K. and Zehnder, A. J. B. 1983. Pathways of propionate degradation by enriched methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45(4):1411-1414.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., Lancaster C. R. D. 2002. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1553:23-38.

- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., Lenger, R. 1992. Bacterial fumarate respiration. *Archives of Microbiology* 158:311-314.
- Kroiss, H., Wabnegg, F. 1982. Das Problem der Sulfatreduktion bei der anaeroben Reinigung sulfatreicher Industrieabwässer. *Wiener Mitteilungen* 49:191-218.
- Kosaka, T., Kato, S., Shimoyama, T., Ishii, S., Abe, T., Watanabe K. 2008. The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. *Genome Research* 18:442-448.
- Kosaka, T., Uchiyama, T., Ishii, S., Enoki, M., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., Ikenaga, H., Watanabe, K. 2006. Reconstruction and regulation of the central catabolic pathway in the thermophilic propionate-oxidizing syntroph *Pelotomaculum thermopropionicum*. *Journal of Bacteriology* 188(1):202-210.
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R. H. 2001. Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: Expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *Journal of Bacteriology* 183(24):7037-7043.
- Krzycki, J. A., Wolkin, R. H., Zeikus, J. G. 1982. Comparison of unitrophic and mixotrophic substrate metabolism by acetate-adapted strain of *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology* 149:247-254.
- Kuchta, R. D., Abeles, R. H. 1985. Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase. *The Journal of Bacteriological Chemistry* 260(24):13181-13189.
- Kung, Y., Doukov, T. I., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., Drennan C. L. 2009. Crystallographic snapshots of cyanide- and water-bound C-clusters from bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* 48:7432-7440.
- Lamed, R., Naimark, J., Morgenstern, E., Bayer, E. A. 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *Journal of Bacteriology* 169(8):3792-3800.
- Lancaster, C. R. D., Kröger, A., Auer, M., Michel, H. 1999. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* 402:377-385.
- Lars, R., Jenkins, A. T. A. 2007. The effect of the ionophore valinomycin on biomimetic solid supported lipid DPPTE/EPC membranes. *Bioelectrochemistry* 70(2):387-393.
- Laubinger W., Dimroth P. 1988. Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* 27:7531-7537.
- Lawrie J. Pickett, J. 1961. Natural gas and Methane sources. Chapman & Hall Ltd. 191-193, London.

- Le Van, T. D., Robinson, J. A., Ralph, J., Greening, R. C., Smolenski, W. J., Leedle, J. A. Z., Schaefer, D. M. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetivomaculum ruminis*. Applied and Environmental Microbiology 64:3429-3436.
- Leadlay, P. F. 1981. Purification and characterization of methylmalonyl-CoA epimerase from *Propionibacterium shermanii*. Biochemical Journal 197:413-419.
- Lebuhn, M., Bauer, C., Gronauer, A. 2008a. Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. In: VDLUFA-Schriftenreihe 64:118-125, Speyer.
- Lebuhn, M., Liu, F., Heuwinkel, H., Gronauer, A. 2008b. Biogas production from monodigestion of maize silage – long-term process stability and requirements. Water Science Technology. 58(8):1645-1651.
- Lee, M. J., Zinder, S. H. 1988. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂/CO₂. Applied and Environmental Microbiology 54:124-129.
- Lee, Y.-J., Romanek, C. S., Mills, G. L., Davis, R. C., Whitman, W. B., Wiegel, J. 2006. *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:2089-2093.
- Lettinga, G. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. Antonie Van Leeuwenhoek 67:3-28.
- Leaver, F. W., Wood, H. G., Stjernholm, R. 1955. The fermentation of three carbon substrates by *Clostridium propionicum* and *Propionibacterium*. Journal of Bacteriology 70(5):521-530.
- Li, L.-F., Ljungdahl, L., Wood, H. G. 1966. Properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. Journal of Bacteriology 92(2):405-412.
- Lieleveld, J., Crutzen, P.J., Bruhl, C. 1992. Climatic effects of atmospheric methane. Chemosphere. 26(1-4):739-768.
- Liesack, W., Ward, N., Stackebrandt, E. 1991. Strategies for molecular microbial ecological studies. Actinomycetes 2:63-76.
- Lindahl, P. A. 2004. Acetyl-coenzyme A synthase: The case for a Ni_{op} - based mechanism of catalysis. Journal of Biological Inorganic Chemistry 9(5):516-524.
- Lindahl, P. A. 2002. The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? Biochemistry 41(7):2097-2105.

- Liu, F. H., Wang, S. B., Zhang, J. S., Zhang, J., Yan, X., Zhou, H. K. Zhao, G. P., Zhou, Z. H. 2009. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology* 106:952-966.
- Liu, S., Suflita, J. M. 1993. H₂-CO₂-dependent anaerobic O-demethylation activity in subsurface sediments and by an isolated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59(5):1325-1331.
- Liu, Y., Withman, W. B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:171–189. Druckerlaubnis von John Wiley and Sons vom 24.08.2012. URL: https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?IID=2012081_1345826453989 (24.08.2012).
- Liu, Y., Balkwill, D. L., Aldrich, H. C., Drake, G. R., Boone, D. R. 1999. Characterization of the anaerobic propionate degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:545-556.
- Ljungdahl, L. G. 2009. A life with acetogens, thermophiles, and cellulolytic anaerobes. *Annual Reviews Microbiology* 63:1-25.
- Lomans, B. P., Maas, R., Luderer, R., Huub Op den Camp, J. M., Pol, A., Drift, van der, C., Vogels, G. D. 1999. Isolation and characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol. *Applied Environmental Microbiology* 65:3641-3650.
- López-Cortés, A., Fardeau, M.-L., Fauque, G, Joulian, C., Ollivier, B. 2006. Reclassification of the sulfate- and nitrate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* subsp. oxamicus as *Desulfovibrio oxamicus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1495-1499.
- Lorenzen, J. P., Kröger, A., Uden, G. 1993. Regulation of anaerobic respiratory pathways in *Wolinella succinogenes* by the presence of electron acceptors. *Archives of Microbiology* 159:477-483.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., Ljungdahl, L. G. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Clostridium thermoaceticum* gene encoding thermostable formyltetrahydrofolate synthetase. *Archives of Microbiology* 149:280-285.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., Ljungdahl, L. G. 1990. Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* 29:5687-5694.

- Lu, W.-P., Schiau, I., Cunningham, J.R., Ragsdale S.W. 1993. Sequence and expression of the gene encoding the corrinoid/iron–sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* and reconstitution of the recombinant protein to full activity. *Journal of Biological Chemistry* 268(8):5605-5614.
- Lück, E, Jager, M. *Chemische Lebensmittelkonservierung – Stoffe, Wirkungen, Methoden*. 1995. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. ISBN 3-540-57607-X 3. Auflage.
- Lueders, T., Pommerenke, B., Friedrich, M. W. 2004. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic Limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):5778-5786.
- Macbeth, T. W., Cummings, D. E., Spring, S., Petzke, L. M. Sorenson, Jr., K. S. 2004. Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12):7329–7341.
- Mackie, R. I., Bryant, M. P. 1981. Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60 °C. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(6):1363-1373.
- Macy, J. M., Ljungdahl, L. G., Gottschalk, G. 1978. Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology* 134(1):84-91.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Brock Mikrobiologie. Spektrum Verlag 2000, 8. Auflage 2001, ISBN 3-8274-0566-1.
- Maestrojuán, G. M., Boone, D. R., Xun, L., Mah, R. A., Zhang, L. 1990. Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the genus *Methanoculleus* gen. nov., emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40(2):117-122.
- Mah, R. A. 1980. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*. *Current Microbiology* 3:321-326.
- Mancia, F., Keep, N. H., Nakagawa, A., Leadlay, P. F., McSweeney, S., Rasmussen, B., Bösecke, P., Diat, O., Evans, P. R. 1996. How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure* 15:4(3):339-50.
- Marchaim, U., Krause, C. 1993. Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 43:195-203.

- Martin, J. C., McCrae, S. I., Aurilia, V., Shoham, Y., Bayer, E. A., Flint, H. J. 2001. Cellulosomal scaffoldin-Like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology* 183(6):1945-1953.
- Matthies, C., Freiberger, A., Drake, H. L. 1993. Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium acetivum*. *Archives of Microbiology* 160:273-278.
- McCarthy, A. A., Baker, H. M., Shewry, S. C., Kagawa, T. F., Saafi, E., Patchett M. L., Baker E. N. 2001a. Expression, crystallization and preliminary characterization of methylmalonyl coenzyme A epimerase from *Propionibacterium shermanii*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 57(5): 706-708.
- McCarthy, A. A., Baker, H. M., Shewry, S. C., Patchett M. L., Baker E. N. 2001b. Crystal structure of methylmalonyl-Coenzyme A epimerase from *P. shermanii*: a novel enzymatic function on an ancient metal binding scaffold. *Structure* 9(7):637-646.
- McGuire, J. J. Rabinowitz, J. C. 1978. Studies on the mechanism of formyltetrahydrofolate synthetase. The *Peptococcus aerogenes* enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 253:1079-1085.
- Menon, S., Ragsdale, S. W. 1996. Evidence that carbon monoxide is an obligatory intermediate in anaerobic acetyl-CoA synthesis. *Biochemistry* 35(37):12119-12125.
- Miller, T. L., Wolin, M. J. 1985. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology* 141:116-122.
- Miller, T. L. Wolin, M. J. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology* 27:985-987.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M. 2001a. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science* 84(6):1294–1309.
- Miron, J., Jacobovitch, J., Bayer, E. A., Lamed, R., Morrison, M., Ben-Ghedalia, D. 2001b. Subcellular distribution of glycanases and related components in *Ruminococcus albus* SY3 and their role in cell adhesion to cellulose. *Journal of Applied Microbiology* 91(4):677–685.
- Moore, M. R., O'Brien, W. E., Ljungdahl, L. G. 1974. Purification and characterization of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of Biological Chemistry* 249:5250-5253.
- Mortensen, N. P., Fowlkes, J. D., Sullivan, C. J., Allison, D. P., Larsen, N. B., Doktycz, S. M. and M. J. 2009. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir* 25(6): 3728-3733.

- Moss, D., Davies, C., Roy, D. 1996. Corine Biotope Sites. Database status and perspectives 1995: European Environment Agency (EEA), Kopenhagen.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51(1):263-73.
- Murashima, K., Chen, C.-L., Kosugi, A., Tamaru, Y., Doi, R. H., Wong S.-L. 2002. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of Bacteriology* 184(1):76-81.
- Murdoch, D.A., Shah, H.N. 1999. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe* 5:555-559.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3):695-700.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. 2010. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76(8):2540-2548.
- Nikolskaya, O. K., Demianets, L. N., Sorokin, N. I. 2001. Fluoride single crystals: Hydrothermal synthesis and electric conductivity of α -PbF₂, α' -PbSnF₄, CdF₂. *High Pressure Research* 20:195-209.
- Nielsen, H. B., Uellendahl, H., Ahring, B. K. 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* 31:820-830.
- Ng, S. K. C., Hamilton, I. R. 1971. Lactate metabolism by *Veillonella parvula*. *Journal of Bacteriology* 105(3):999-1005.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., GTC Sequencing Center Production Finishing, and Bioinformatics Teams Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M. J., Bennett, G. N., Koonin, E. V., Smith, D. R. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* 183(16):4823-4838.
- O'Brien, W. E., Brewer, J. M., Ljungdahl, L. G. 1976. Chemical, physical and enzymatic comparisons of formyltetrahydrofolate synthetases from thermo- and mesophilic clostridia, In: Zuber, H. (Ed.). 1976. Proceedings of the international symposium on enzymes and

- proteins from thermophilic microorganisms, structure and functions. Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland, Experimentia Supplementum 26:249-262.
- Odelson, D.A., Breznak, J.A. 1983. Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Applied and Environmental Microbiology* 45:1602-1613.
- OECD-FAO. 2007. Organisation for Economic Co-Operation and Development Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture outlook 2007-2016. ISBN: 9789264025097.
- Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. 2000. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64(2):254-260.
- Oelgeschläger, A. E., Rother, M. 2008. Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Archives of Microbiology* 190:257-269.
- Ölschläger, V. 2007. Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung. 1. Auflage. Cuvillier Verlag Göttingen. ISBN 978-3-86727-458-6.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., Mah, R. A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58(1):27-38.
- Pagaling, E., Grant, W. D., Cowan, D. A., Jones, B. E., Ma, Y., Ventosa, A., Heaphy, S. 2012. Bacterial and archaeal diversity in two hot spring microbial mats from the geothermal region of Tengchong, China. *Extremophiles* 16(4):607-18.
- Parekh, S. R., Cheryan, M. 1991. Production of acetate by mutant strains of *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Microbiology Biotechnology* 35(3):384-387.
- Park, J.-S., Matano, Y., Doi, R. H. 2001. Cohesin-dockerin interactions of cellulosomal subunits of *Clostridium cellulovorans*. *Journal of Bacteriology* 183(18):5431-5435.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A., Wellsbury, P. 2000. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal* 8:11-28.
- Partansky, A. M., Henry, B. S. 1935. Anaerobic bacteria capable of fermenting sulfite waste liquor. *Journal of Bacteriology* 30(6):559-571.
- Paynter, M. J. B., Elsdon, S. R. 1970. Mechanism of propionate formation by *Selenomonas ruminantium*, a rumen microorganism. *Microbiology* 61(1):1-7.
- Paynter, M. J. B., Hungate, R. E. 1968. Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp n, isolated from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology* 95(5):1943-1951.

- Pester, M., Brune, A. 2007. Hydrogen is the central free intermediate during lignocellulose degradation by termite gut symbionts. *International Society for Microbial Ecology Journal* 1:551-565.
- Peters, V., Conrad, R. 1995. Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1673-1676.
- Pfannebecker, J., Fröhlich, J. 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology* 128:288-296.
- Pierce, E., Xie, G., Barabote, R. D., Saunders, E., Han, C. S., Detter, J. C., Richardson, P., Brettin, T. S., Das, A., Ljungdahl, L. G., Ragsdale, S. W. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*)." *Environmental Microbiology* 10:2550-2573.
- Pine, L., George, L. K. 1969. Reclassification of *Actinomyces propionicus*. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 19(3):267-272.
- Pittman, M., Davis, D. J. 1950. Identification of the Koch-Weeks bacillus (*H. aegyptius*). *Journal of Bacteriology* 59:413-426.
- Plugge, C. M., Dijkema, C., Stams, A. J. M. 1993. Acetyl-CoA cleavage pathway in a syntrophic propionate oxidizing bacterium growing on fumarate in the absence of methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 110:71-76.
- Pohlschroeder, M., Leschine, S. B., Canale-Parola, E. 1994. *Spirochaeta caldaria* sp. nov., a thermophilic bacterium that enhances cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*. *Archives of Microbiology* 161:17-24.
- Polster, A., Brummack, J., Mollekopf, N. 2006. Verbesserung von Entschwefelungsverfahren in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Abschlussbericht zum Forschungs- und Entwicklungsprojekt, Berichtszeitraum 15.10.2005-28.02.2006, Dresden.
- Postgate, J. R., Campbell, L. L. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews* 30(4):732-737.
- Prates, J. A. M., Tarbouriech, N., Charnock, S. J., Fontes, C. M. G. A., Ferreira, L. M. A., Davies, G. J. 2001. The Structure of the feruloyl esterase module of xylanase10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9:1183-1190.
- Prévot A.R. 1933. Études de systématique bactérienne. I: Lois générale. II: Cocci anaérobies. *Annales des Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetal* 15:23-260.
- Rado, T. A., Hoch, J. A. 1973. Phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis*: Purification and physiological studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 321:114-125.

- Ragsdale, S. W. 2008. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Science* 1125:129-136.
- Ragsdale, S. W. 2007. Nickel and the carbon cycle. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101(11-12):1657-1666.
- Ragsdale, S. W. 2006. Metals and their scaffolds to promote difficult enzymatic reactions. *Chemical Reviews* 106(8):3317-3337.
- Ragsdale, S. W. 2004. Life with carbon monoxide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39:165-195.
- Ragsdale, S. W., Pierce, E. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784(12):1873-1898.
- Ragsdale, S. W., Ljungdahl, L. G. 1984. Purification and properties of NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Acetobacterium woodii*. *Journal of Biological Chemistry* 259(6):3499-3503.
- Randerath K. 1965. Dünnschicht-Chromatographie. 2. Auflage. Verlag Chemie. Weinheim an der Bergstraße.
- Reeburgh, W. S. 1996. "Soft spots" in the global methane budget In: Lidstrom, M. E. & Tabita, F. R. (eds). 1996. Microbial growth on C1 compounds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 334-352.
- Reeburgh, W. S., Whalen, S. C., Alperin, M. J. 1993. The role of methylotrophy in the global methane budget. pp. 1-14. In: Murrell, J. C. and Kelly, D. P. (eds.). 1993. Microbial growth on C1 compounds. Intercept, Andover, UK.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., Pace, N. R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58(10):3417-3418.
- Rieu-Lesme, F., Fonty, G., Doré, J. 1995. Isolation and characterization of a new hydrogen-utilizing bacterium from the rumen. *125(1):77-82*.
- Renneberg, R., Sussbier, D. 2009. Biotechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag.
- Rincón, M. T., Ding, S.-Y., McCrae, S. I., Martin, J. C., Aurilia, V., Lamed, R., Shoham, Y., Bayer, A. E., Flint, H. J. 2003. Novel organization and divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology* 185(3):703-713.

- Rincón, M. T., Martin, J. C., Aurilia, V., McCrae, S. I., Rucklidge, G. J., Reid, M. D., Bayer, E. A., Lamed, R., Flint, H. J. 2004. ScaC, an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 cellulosome. *Journal of Bacteriology* 186(9):2576-2585.
- Rincón, M. T., Čepeljnik, T., Martin, J. C., Lamed, R., Barak, Y., Bayer, E. A., Flint, H.J. 2005. Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. *Journal of Bacteriology* 187(22):7569-7578.
- Riordan, C. G. 2004. Synthetic chemistry and chemical precedents for understanding the structure and function of acetyl coenzyme A synthase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9(5):542-549.
- Ritalahti, K. M., Justicia-Leon, S. D., Cusick, K. D., Ramos-Hernandez, N., Rubin, M., Dornbush, J., Löffler, F. E. 2012. *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(1):210-216.
- Rivard, C. J., Smith, P. H. 1982. Isolation and characterization of a thermophilic marine methanogenic bacterium: *Methanogenium thermophilicum* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32(4):430-436.
- Robbins, J. E. 1988. A proposed pathway for catabolism of propionate in methanogenic cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5):1300-1301.
- Rogosa, M. 1971. Transfer of *Peptostreptococcus elsdenii* Gutierrez et al. to a new genus, *Megasphaera* [*M. elsdenii* (Gutierrez et al.) comb. nov.]. *International Journal of Systematic Bacteriology* 21(2):187-189.
- Rosencrantz, D., Rainey, F. A., Janssen, P. H. 1999. Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3526-3533.
- Rosner, B., Schink, B. 1990. Propionate acts as carboxylic group acceptor in aspartate fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*. *Archives of Microbiology* 155:46-51.
- Rother, M., Metcalf, W. W. 2004. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(48):16929-16934.
- Russell, W. K., Stålhandske, C. M. V., Xia, J., Scott, R. A., and Lindahl, P. A. 1998. Spectroscopic, redox, and structural characterization of the Ni-labile and nonlabile forms of the Acetyl-CoA Synthase active site of Carbon Monoxide Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* 120(30):7502-7510.

- Sabnis, R. W. 2007. Handbook of acid-base indicators. CRC Press U.S.A. ISBN: 0849382181.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolutionary* 4(4):406-425.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. 2007. Isolation of Key Methanogens for Global Methane Emission from Rice Paddy Fields: a Novel Isolate Affiliated with the Clone Cluster Rice Cluster I. *Applied and Environmental Microbiology* 73(13):4326-4331.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (zweite Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Sass, H. 1997. Vorkommen und Aktivität sulfatreduzierender Bakterien in der Oxykline limnischer Sedimente. Dissertation, Hartung-Gorre Verlag Konstanz.
- Sawayama, S., Tada, S., Tsukahara, K., Yagishita, T. 2004. Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(1):65-70.
- Schattner, S. Gronauer, A. 2000. Methangärung verschiedener Substrate – Kenntnisstand und offene Fragen, Stand der Technik und Optimierungspotenzial. *Gulzower Fachgespräche, Energetische Nutzung von Biogas* 15:28-38, Weimar.
- Schauer, N. L., Ferry J. G. 1982. Properties of formate dehydrogenase in *Methanobacterium formicum*. *Journal of Bacteriology* 150(1):1-7.
- Schauder, R., Preuß, A., Jetten, M.S., Fuchs, G. 1988. Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. *Archives of Microbiology* 151:84-89.
- Schaupp A., Ljungdahl, L. G. 1974. Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. *Archives of Microbiology* 100(1):121-129.
- Scherer, P. A. 2001. Mikrobiologie der Vergärung von festen Abfallstoffen. In: *Biologische Behandlung organischer Abfälle*, Kämpfer, P., Weißenfels, W. 2001. Hrsg. 45-80, Springer Verlag, Heidelberg.
- Scherer, P. A., Dobler, S., Rohardt, S., Loock, R., Büttner, B., Nöldeke, P., Brettschuh, A. 2003. Continuous biogas production from fodder beet silage as sole substrate. *Water Science Technology* 48:229-233.

- Schink, B. 2006. Syntrophic associations in methanogenic degradation. In: Molecular Basis of Symbiosis, Overmann, J. (ed.). Springer Verlag, Berlin 1-19.
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2):262-280.
- Schink, B. 1985. Mechanisms and kinetics of succinate and propionate degradation in anoxic freshwater sediments and sewage sludge. *Journal of General Microbiology* 131:643-650.
- 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. *Archives of Microbiology* 137(1):33-41.
- Schink, B., Stams, A. J. M. 2006. Syntrophism among prokaryotes. *The Prokaryotes*, Springer Verlag, Berlin 2:309-335.
- Schink, B., Pfennig, N. 1982. *Propionigenium modestum* gen. nov. sp. nov. a new strictly anaerobic, nonsporing bacterium growing on succinate. *Archives of Microbiology* 133:209-216.
- Schink, B., Kremer, D. R., Hansen, T. A. 1987. Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. *Archives of Microbiology* 147:321-327.
- Schink, B., Thompson, T. E. and Zeikus, J. G. 1982. Characterization of *Propionospira arboris* gen. nov. sp. nov., a nitrogen fixing anaerobe common to wetwoods of living trees. *Journal of General Microbiology* 128:2771-2779.
- Schlegel, H. G., Fuchs, G. 2007. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag ISBN:3-13-444608-1.
- Schmidt, J. E., Ahring B. K. 1995. Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7):2765-2767.
- Schnürer, A., Zellner, G., Svensson, B. H. 1999. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology* 29:249-261.
- Schnürer, A., Houwen, F. P., Svensson, B. H. 1994. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Archives of Microbiology* 162:70-74.
- Schoell, M. 1988. Multiple origins of methane in the earth. *Chemical Geology* 71:1-10.
- Scholten, J. C. M., Conrad, R., Stams, A. J. M. 2000. Effect of 2-bromo-ethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 32:35-42.

- Schramm, S. 1999. Nicht-statistische Isotopenverteilung in Naturstoffen: Anwendungen Zu Fragen Von Nahrung und Ernährung und Erprobung der Quantitativen ^{13}C -, ^{17}O -NMR-Spektroskopie als neues Messverfahren. Herbert Utz Verlag ISBN 978-3-89675-515-5.
- Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:634-649.
- Schweiger, G., Buckel, W. 1985. Identification of acrylate, the product of the dehydration of (R)-lactate catalysed by cellfree extracts from *Clostridium propionicum*. *FEBS Letters* 185:253-256.
- Schweiger, G., Buckel, W. 1984. On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Letters* 171(1):79-84.
- Seeliger S., Janssen P. H., Schink, B. 2002. Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters* 211:65-70.
- Selmer, T., Willanzheimer, A., Hetzel, M. 2002. Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum* - Cloning of the gene and identification of glutamate 324 at the active site. *European Journal of Biochemistry* 269:372-380.
- Seravalli, J., Ragsdale, S. W. 2008a. Pulse-chase studies of the synthesis of acetyl-CoA by carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase: evidence for a random mechanism of methyl and carbonyl addition. *Journal of Biological Chemistry* 283:8384-8394.
- Seravalli J., Ragsdale S. W. 2008b. ^{13}C NMR characterization of an exchange reaction between CO and CO_2 catalyzed by carbon monoxide dehydrogenase. *Biochemistry* 47:6770-6781.
- Seravalli, J. Kumar, M. Ragsdale, S.W. 2002. Rapid kinetic studies of acetyl-CoA synthesis: evidence supporting the catalytic intermediacy of a paramagnetic nifec species in the autotrophic Wood-Ljungdahl pathway. *Biochemistry* 41(6):1807-1819.
- Shin, W. Anderson, M. E. Lindahl, P. A. 1997. Heterogeneous nickel environments in carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of the American Chemical Society* 115(13):5522-5526.
- Simon, J. 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* 26:285-309.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30:225-420.
- Slatko, B. E., Croft, R., Moran, L. S., Wilson, G. G. 1988. Cloning and analysis of the HaeIII and HaeII methyltransferase genes. *Gene* 74(1):45-50.

- Smith, M. R., Mah, R. A. 1981. 2-bromoethanesulfonate: A selective agent for isolating resistant *Methanosarcina* mutants. *Current Microbiology* 1(6):321-326.
- Smiti, N., Ollivier, B., Garcia, J. L. 1986. Thermophilic degradation of cellulose by a triculture of *Clostridium thermocellum*, *Methanobacterium* sp. and *Methanosarcina* MP. *FEMS Microbiology Letters* 35:93-97.
- Sober, E. 1983. Parsimony in systematics: Philosophical issues. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14:335–357.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor M., Miller H. L. (eds.). 2007. *Climate change 2007: The physical science basis. contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Sowers, K. R., Noll, K. M. 1995. Techniques for anaerobic growth. *Archaea: a Laboratory Manual*:15-47. Edited by Robb, F. T., Sowers, K. R., Schreier, H. J., DasSarma, S., Fleischmann, E. M.. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Spormann, A.M., Thauer, R.K. 1998. Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans* - demonstration of enzymes required for the operation of an oxidative acetyl-CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway. *Archives of Microbiology* 150:374-380.
- Sprenger, W. W., van Belzen, M. C., Rosenberg, J., Hackstein, J. H., Keltjens J. T. 2000. *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1989-1999.
- Stams, A. J. M., Plugge, C. M. 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* 7:568-577. Druckerlaubnis von Nature Publishing Group vom 24.08.2012. URL: <http://click.info.copyright.com/?qs=92a525e2e5d5e712ac98e63d10c14f6f01c3007c3bd03ebb20f7423fbf42bcce4c81b6c2527d5339> (24.08.2012).
- Stams, A. J. M., Dijk, van, J. B., Dijkema, C., Plugge, C. M. 1993. Growth of syntrophic propionate-oxidising bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (4):1114-1119.
- Stams, A. J. M., Kremer, D. R., Nicolay, K., Weenk, G. H., Hansen, T. A. 1984. Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Archives of Microbiology* 139:167-173.
- Statistisches Bundesamt 2006. *Statistisches Jahrbuch 2006 für die Bundesrepublik Deutschland*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. URL:

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/Jahrbuch2006.pdf?__blob=publicationFile (03.07.2012).

Statistisches Bundesamt 2005. Statistisches Jahrbuch 2005 für die Bundesrepublik Deutschland.

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. URL:

http://www.digizeitschriften.de/dms/toc/?PPN=PPN635628112_2005 (03.07.2012).

Statistisches Bundesamt 2002. Statistisches Jahrbuch 2002 für die Bundesrepublik Deutschland.

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. URL:

http://www.digizeitschriften.de/dms/toc/?PPN=PPN635628112_2002 (03.07.2012).

Stein, D. C., Gunn, J. S., Piekarowicz, A. 1998. Sequence similarities between the genes encoding the S. Ngol and Haell restriction/modification systems. *Biological Chemistry* 379:575-578.

Steinbüchel, A., Oppermann-Sanio, F. B. 2011. *Mikrobiologisches Praktikum*. 2003, Nachdruck 2011. ISBN 978-3-642-17702-6. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Stjernholm, R., Wood, H. G. 1961. Methylmalonyl Isomerase, II. Purification and properties of the enzyme from *Propionibacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47(3):303-313.

Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62(2):625-630.

Tan, X., Kagiampakis, I., Surovtsev, I. V., Demeler, B., Lindahl, P. A. 2007. Nickel-dependent oligomerization of the alpha subunit of acetyl-coenzyme a synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Biochemistry* 46(41):11606-11613.

Tan, X., Surovtsev, I. V., Lindahl, P. A. 2006. Kinetics of CO insertion and acetyl group transfer steps, and a model of the acetyl-CoA synthase catalytic mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 128(37):12331-12338.

Tan, X. S., Sewell, C., Lindahl, P. A. 2002. Stopped-flow kinetics of methyl group transfer between the corrinoid-iron-sulfur protein and acetyl-coenzyme A synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of the American Chemical Society* 124(22):6277-6284.

Tatsuoka, N., Mohammed, N., Mitsumori, M., Tajima, K., Hara, K., Kurihara, M., Itabishi, H. 2007. Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Science Journal* 78:512-518.

Tietze, M. 2000. Methanophenazin: Strukturaufklärung und Totalsynthese eines neuartigen Cofaktors aus methanogenen Archaea. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen.

- Tindall B. J., Euzéby, J. P. 2006. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatrionicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan *et al.* 2002, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2711-2713.
- Thauer, R. K., Shima, S. 2007. Methyl-coenzyme M reductase in methanogens and methanotrophs. *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology* ed. Garrett, R., Klenk, H.-P. 2007. pp. 275-284. Oxford, U.K: Blackwell Publishing.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W, Hedderich, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6:579-591.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41:100-180.
- Tholozan, J. L., Samain, E., Grivit, J. P., Moletta, R., Dubourguier, H. C., Albagnac, G. 1988. Reductive carboxylation of propionate to butyrate in methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 54(2):441-145.
- Tokura, M., Ohkuma, M., Kudo, T. 2000. Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiology Ecology* 33:233-240.
- Thompson, T. E., Conrad, R. and Zeikus, J. G. 1984. Regulation of carbon and electron flow in *Propionispira arboris*: Physiological function of hydrogenase and its role in homopropionate formation. *FEMS Microbiology Letters* 22(3):265-271.
- Tholen, A., Brune, A. 1999. Localization and in situ activities of homoacetogenic bacteria in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes* spp.). *Applied and Environmental Microbiology* 65(10):4497-4505.
- Tsai, C.-F., Qiu, X., Liu, J.-H. 2003. A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Piromyces rhizinflata*. *Anaerobe* 9(3):131-140.
- Twigg R. S. 1945. Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature*. 155(3935):401-402.
- UNFCCC, 2012: United Nations Framework Convention on Climate Change. 2012. Background on the UNFCCC: The international response to climate change. http://unfccc.int/essential_background/items/6031.php.
- Urban, W., Girod, K., Lohmann, H., Weidner, E. 2009. Technologien und Kosten der Biogasaufbereitung und Einspeisung in das Erdgasnetz. Marktstudie der Markterhebung

- 2007-2008 Band 4. Abschlussbericht „Beseitigung technischer, rechtlicher und ökonomischer Hemmnisse bei der Einspeisung biogener Gase in das Erdgasnetz zur Reduzierung klimarelevanter Emissionen durch Aufbau und Anwendung einer georeferenzierten Datenbank“.
- Van Kuijk, B. L. M., Schlösser, E., Stams, A. J. M. 1998. Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *Archives of Microbiology* 169:346–352.
- Vaneechoutte, M., H., De Beenhouwer, G., Claeys, G., Verschraegen, A., De Rouck, N., Paepe, A., Elaichouni, A., Portaels, F. 1993. Identification of *Mycobacterium* species with amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2061-2065.
- VDI 4608 Blatt 1. VDI-Fachbereich Energiewandlung und -anwendung. 2005. Energiekenngrößen Definitionen – Begriffe – Methodik. VDI 4608 2005-03. Richtlinie. ICS 27.010; 01.040.27. VDI-Gesellschaft Energie und Umwelt. S. 13.
- VDI 4661. VDI-Fachbereich Energiewandlung und -anwendung. 2003. Energiekenngrößen Definitionen – Begriffe – Methodik. VDI 4661 2003-09. Richtlinie. ICS 27.010; 01.040.27. VDI-Gesellschaft Energie und Umwelt. S. 11.
- Veillon, A., Zuber, M. M. 1898. Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Archives of Medical Experiments* 10:517-545.
- Verink, J. 1988. Sulfatreduktion und Sulfateliminierung bei der ein- und zweistufigen anaeroben Behandlung hochsulfatreicher Abwässer. Veröffentlichungen des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover, Heft 70.
- Voet, D., Voet, J. G. 1990. Biochemie. Verlagsgesellschaft mbH. deutsche Erstauflage 1992, erster korrigierter Nachdruck 1994. 830-834.
- Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C. 2005. Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes. *Coordination Chemistry Reviews* 249(15-16):1609-1619.
- Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C. 2004. Crystallographic evidence for a CO/CO₂ tunnel gating mechanism in the bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl coenzyme A synthase from *Moorella thermoacetica*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9(5):525-532.
- Wallrabenstein, C., Hauschild, E., Schink, B. 1994. Pure culture and cytological properties of *Syntrophobacter wolinii*. *FEMS Microbiology Letters* 123:249-254.
- WBGU. 2003. Der Wissenschaftliche Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen. Welt im Wandel: Energiewende zur Nachhaltigkeit. Drucksache

- 15/4155. ISBN 3-540-40160-1. URL:
http://www.wbgu.de/fileadmin/templates/dateien/veroeffentlichungen/hauptgutachten/jg2003/wbgu_jg2003.pdf (03.07.2012).
- WBGU. 2008. Der Wissenschaftliche Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen. Zukunftsfähige Bioenergie und nachhaltige Landnutzung. ISBN 978-3-936191-21-9. URL:
http://www.wbgu.de/fileadmin/templates/dateien/veroeffentlichungen/hauptgutachten/jg2008/wbgu_jg2008.pdf (03.07.2012).
- Weiland, P. 2007. Bundesweite Evaluierung neuartiger Biomasse-Biogasanlagen; 16. Symposium Bioenergie- Festbrennstoffe, Biokraftstoffe, Biogas; Bad Staffelstein 2007, S.236-241.
- Weiland, P. 2001. Grundlagen der Methangärung – Biologie und Substrate in Biogas als regenerative Energie – Stand und Perspektiven. VDI-Berichte Nr. 1620. VDI-Verlag, Düsseldorf.
- Weimer, P. J., Zeikus, J. G. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Applied and Environmental Microbiology 33(2):289-297.
- Westerholm, M., Roos, R., Schnürer, A. 2011. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. Systematic and Applied Microbiology 34(4):260-266.
- Westermann, P., Ahring, B. K., Mah, R. A. 1989. Acetate production by methanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 55(9):2257-2261.
- Whiticar, M. J. 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. Chemical Geology 161(1-3):291-314.
- Whiticar, M.J., Faber, E, Schoell, M. 1986. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation—Isotope evidence. Geochimica et Cosmochimica Acta 50(5):693-709.
- Widdel, F. 1986. Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Applied and Environmental Microbiology 51:1056-1062.
- Widdel, F., Wolfe, R. S. 1989. Expression of secondary alcohol dehydrogenase in methanogenic bacteria and purification of the F₄₂₀ specific enzyme from *Methanogenium thermophilum* strain TCI. Archives of Microbiology 152, 322–328.
- Widdel, F., Rouvière, P. E., Wolfe, R. S. 1988. Classification of secondary alcohol-utilizing methanogens including a new thermophilic isolate. Archives of Microbiology 150:477-481.

- Wilken, F., Benke, M. 2012. Silphie weckt immer mehr Interesse. Artikel, Stand 09.01.2012.
URL: <http://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/pflanze/nav/74/article/18360.html>
(08.07.2012).
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22):6531-6535.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., De Wachter, R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS* 317(1,2):96-100.
- Wilson B. E., Lindahl, P. A. 1999. Equilibrium dialysis study and mechanistic implications of coenzyme A binding to acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 4(6):742-748.
- Woese, C. R. 1977. Comment on methanogenic bacteria and primitive ecology. *Journal of Molecular Evolution* 9(4):369-371.
- Woese, C. R., Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(11):5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:4576-4579.
- Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J., Stahl, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254:83-86.
- Wood H. G., Ljungdahl, L. G. 1991. Autotrophic character of the acetogenic bacteria. In *Variations in Autotrophic Life*, ed. Shively, J. M., Barton, L. L. 201-50. San Diego: Academic.
- Wood, H. G., Barden, K. E. 1977. Biotin enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 46:385-413.
- Wright, A.-D. G., Pimm, C. 2003. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods* 55:337-349.
- Wuppertal Institut für Klima, Umwelt, Energie GmbH (WI) und das Rheinisch-Westfälische Institut für Wirtschaftsforschung (RWI Essen). *Nutzungskonkurrenzen bei Biomasse. Endbericht* 25.04.2008. URL:
http://www.wupperinst.org/uploads/tx_wiprojekt/nutzungskonkurrenzen-bei-biomasse.pdf
(03.07.2012).

- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.-M., Ljungdahl, L. G. 1983. Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *Journal of Biological Chemistry* 258(3):1826-1832.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., Minato, H. 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence *In Situ* Hybridization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64(8):1732-1742.
- Zeikus, J. G., Wolfe, R. S. 1972. *Methanobacterium autotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*. 109:707-713.
- Zellner, G., Winter, J. 1987. Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiological Letters* 44:323-328.
- Zellner, G., Sleytr, U. B., Messner, P., Kneifel, H., Winter, J. 1990. *Methanogenium liminatans* spec. nov., a new coccoid, mesophilic methanogen able to oxidize secondary alcohols. *Archives of Microbiology* 153(2):287-293.
- Zellner, G., Bleicher, K., Braun, E., Kneifel, H., Tindall, B. J., Conway de Macario, E., Winter, J. 1989. Characterization of a new mesophilic, secondary alcohol-utilizing methanogen, *Methanobacterium palustre* spec. nov. from a peat bog. *Archives of Microbiology* 151:1-9.
- Zhao, S., Roberts, D. L., Ragsdale, S. W. 1995. Mechanistic studies of the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: origin of the pH dependence of the methyl group transfer from methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein. *Biochemistry* 34:15075-15083.
- Zhu, C., Zhang, J., Tang, Y., Zhengkai, X., Song, R. 2011. Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis. *Microbiological Research* 166(1):27-35.
- Zinder, S. H., Anguish, T., Cardwell, S. C. 1984. Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* 47(6):1114-1119.
- Ziesing, S., Heim, A., Vonberg, R.-P. 2008. Kapitel 19 Methoden der mikrobiologischen Diagnostik. In Hahn, H, Kaufmann, S. H. E., Schulz T. F, Suerbaum, S. 2008. *Medizinische Mikrobiologie und Infektologie*. Auflage: 6., komplett überarbeitete Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg, ISBN-13: 978-3540463597.

9 Anhang

9.1 Paarweise und multiple Alignierungen bakterieller partieller 16S rDNA Sequenzen aus propionsäureabbauenden Mischkulturen

Fp1a2_Eubak5	-----TCCCCATAGA	11
Fp1a14_Eubac5	-----ACCCATAGA	9
Fp1a10_Eubac5	-----ATCATAAAGA	10
Fp1a7_Eubac5	-----TCTTAAGCATGCAAGTTGAGCGGCAAGGGGGAGCGATCCCCCCTAGA	47
Fp1a1_Eubac5	ACGCTGGCGGCGTGTCTTAGCATGCAAGTTGAGCGGCAAGGGGGAGCGATCCCCCCTAGA	60
	* **	
Fp1a2_Eubak5	GCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCACTAGA	71
Fp1a14_Eubac5	GCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCACTAGA	69
Fp1a10_Eubac5	GCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCACTAGA	70
Fp1a7_Eubac5	GCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCACTAGA	107
Fp1a1_Eubac5	GCGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCACTAGA	120

Fp1a2_Eubak5	AATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGCGCATCGTGAGGGTGCGCAAGAAAGGTGCTACGG	131
Fp1a14_Eubac5	AATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGCGCATCGTGAGGGTGCGCAAGAAAGGTGCTACGG	129
Fp1a10_Eubac5	AATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGCGCATCGTGAGGGTGCGCAAGAAAGGTGCTACGG	130
Fp1a7_Eubac5	AATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGCGCATCGTGAGGGTGCGCAAGAAAGGTGCTACGG	167
Fp1a1_Eubac5	AATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGCGCATCGTGAGGGTGCGCAAGAAAGGTGCTACGG	180

Fp1a2_Eubak5	CACCGCCCTAGGATGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAG	191
Fp1a14_Eubac5	CACCGCCCTAGGATGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAG	189
Fp1a10_Eubac5	CACCGCCCTAGGATGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAG	190
Fp1a7_Eubac5	CACCGCCCTAGGATGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAG	227
Fp1a1_Eubac5	CACCGCCCTAGGATGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAG	240

Fp1a2_Eubak5	GCGATGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCC	251
Fp1a14_Eubac5	GCGATGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCC	249
Fp1a10_Eubac5	GCGATGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAAATACGGCCC	250
Fp1a7_Eubac5	GCGATGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCC	287
Fp1a1_Eubac5	GCGATGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCC	300

Fp1a2_Eubak5	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATAATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC	311
Fp1a14_Eubac5	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATAATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC	309
Fp1a10_Eubac5	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATAATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC	310
Fp1a7_Eubac5	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATAATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC	347
Fp1a1_Eubac5	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATAATTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC	360

Fp1a2_Eubak5	GACGCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGTGGGGAAGAATAA	371
Fp1a14_Eubac5	GACCCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGTGGGGAAGAATAA	369
Fp1a10_Eubac5	GACCCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGTGGGGAAGAATAA	370
Fp1a7_Eubac5	GACGCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGTGGGGAAGAATAA	407
Fp1a1_Eubac5	GACGCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGTGGGGAAGAATAA	420
	*** * *****	
Fp1a2_Eubak5	CCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAACTACG	431
Fp1a14_Eubac5	CCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAACTACG	429
Fp1a10_Eubac5	CCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAACTACG	430
Fp1a7_Eubac5	CCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAACTACG	467
Fp1a1_Eubac5	CCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAACTACG	480

```

Fp1a2_Eubak5      TGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG 491
Fp1a14_Eubac5    TGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG 489
Fp1a10_Eubac5    TGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG 490
Fp1a7_Eubac5     TGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG 527
Fp1a1_Eubac5     TGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAG 540
*****

Fp1a2_Eubak5     GGCATGTAGGCGGTCTTGTAAAGCTTGGCGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGATTGCG 551
Fp1a14_Eubac5    GGCATGTAGGCGGTCTTGTAAAGCTTGGCGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGATTGCG 549
Fp1a10_Eubac5    GGCATGTAGGCGGTCTTGTAAAGCTTGGCGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGATTGCG 550
Fp1a7_Eubac5     GGCATGTAGGCGGTCTTGTAAAGCTTGGCGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGATTGCG 587
Fp1a1_Eubac5     GGCATGTAAGCGGTCTTGTAAAGCTTGGCCTGA----- 572
*****

Fp1a2_Eubak5     TTGAGAACTGCGAGGCTTGAGTGACGGAGAGGGAGCTAGAATTCCTGGTGTAGGGGTGGA 611
Fp1a14_Eubac5    TTGAGAACTGCGAGGCTTGAGTGACGGAGAGGGAGCTAGAATTCCTGGTGTAGGGGTGGA 609
Fp1a10_Eubac5    TTGAG----- 555
Fp1a7_Eubac5     TTGAGAACTGCGAGGCTTGAGTGACGGAGAGGGAGCTAGAATTCCTGGTGTAGGGGTGGA 647
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     ATCTGTAGAGATCAGGAAGAATACCAATGGCGAAGGCAAGCTCCTGGCCGATGACTGACG 671
Fp1a14_Eubac5    ATCTGTAGAGATCAGGAAGAATACCAATGGCGAAGGCGAGCTCCTGGCCGA----- 660
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     ATCTGTAGAGATCAGGAAGAATACCAATGGCGAAGGCAAGCTCCTGGCCGATGACTGACG 707
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     CTGAGGTGCGAAAGTGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCCACTGTA 730
Fp1a14_Eubac5    -----
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     CTGAGGTGCGAAAGTGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCACTGTA 767
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     AACGATGTGCACTAGGTGCTGGTACGGATGTATCAGTGCCGTAGCTAACGTGATAAGTGC 790
Fp1a14_Eubac5    -----
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     AACGATGTGCACTAGGTGCTGGTACGGATGTATCAGTGCCCG----- 809
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     ACCGCCTGGGGAGTATGCTCGCAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACA 850
Fp1a14_Eubac5    -----
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     -----
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGGTACGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGACAT 910
Fp1a14_Eubac5    -----
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     -----
Fp1a1_Eubac5     -----

Fp1a2_Eubak5     ACAGCGTAATAGGGCAGAGA 930
Fp1a14_Eubac5    -----
Fp1a10_Eubac5    -----
Fp1a7_Eubac5     -----
Fp1a1_Eubac5     -----

```

Abbildung 127: Multipler Sequenzvergleich (CLUSTAL 2.1, European Bioinformatics Institute) der 16S rDNA Fragmente der Klone Fp1a1, Fp1a2, Fp1a7, Fp1a10 und Fp1a14 aus der propionsäureabbauenden Kultur Fp1a.

```
>Consensus_Fp1a1_2_7_10_14/1-662
TCCCCATAGAGCGGCGACTGGTGAGTAACACGTGGATGATCTACCCGAGGCATGGGGATAGTCAC TAGAA
ATAGTGGGTAATACCGAATACGGTGC GCATCGTGAGGGTGC GCAAGAAAGGTGCTACGGCACCGGCC TAGGA
TGAGTCTGCGTCCCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGAGCCCACCAAGGCGATGATGGGTAGCCGGCC TGAGA
GGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAATATTCGGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTGGATGAAGAAGGCCGAAAGGTTGTAAAGTTCTTTTGT TG
GGGAAGAATAACCATGGGAGGGAATGCCCGTGGGATGACATGAACCGACGAATAAGCCCCGGCTAAC TACGT
GCCAGCAGCCCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGG
TCTTGTAAAGCTTGGCGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGATTGCGTTGAGAACTGCGAGGCTTGAGT GAC
GGAGAGGGAGCTAGAATTCCTGTTGTTAGGGGTGGAATCTGTAGAGATCAGGAAGAATACCAATGGCGAAGGC
AAGCTCCTGGCCGA
```

Abbildung 128: Konsensussequenz (Clustal 2.1, EBI) 16S rDNA Fragmente der Klone Fp1a1, Fp1a2, Fp1a7, Fp1a10 und Fp1a14 aus der propionsäureabbauenden Kultur Fp1a im fasta-Format.

Gp1a6_BSF8	7	CTAGAGTAAAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCTGCCCATGAGTTGGGGAT	66
Gp1a29_BSF8	1	CTAGAGTAAAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCTGCCCATGAGTTGGGAAT	60
Gp1a6_BSF8	67	AACGGCTGGAAACGGTFCGCTAATACCGAATACGCTCCGATTCGACGTTTCGGGGGAAAGG	126
Gp1a29_BSF8	61	AACGGCTGGAAACGGTFCGCTAATACCGAATACGCTCCGATTCGACATTCGGGGGAAAGG	120
Gp1a6_BSF8	127	AGGCCTCTGCTTGACGCTTCCGCTCATGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTTGTGGCG	186
Gp1a29_BSF8	121	AGGCCTCTGCTTGCAAGCTTCCGCTCATGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTTGTGGCG	180
Gp1a6_BSF8	187	GGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	246
Gp1a29_BSF8	181	GGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT	240
Gp1a6_BSF8	247	GGGACTGGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGG	306
Gp1a29_BSF8	241	GGGACTGGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGG	300
Gp1a6_BSF8	307	GCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACCTCT	366
Gp1a29_BSF8	301	GCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACCTCT	360
Gp1a6_BSF8	367	GTCAGGAGGGAAGAACC GCCCTGGGTGCTAATCAGCCTGGGTCTGACGGTACCTCCAAAGG	426
Gp1a29_BSF8	361	GTCAGGAGGGAAGAACC GCCCTGGGTGCTAATCAGCCTGGGTCTGACGGTACCTCCAAAGG	420
Gp1a6_BSF8	427	AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCG	486
Gp1a29_BSF8	421	AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCG	480
Gp1a6_BSF8	487	GAATCACTGGGCGCAAAGCGCACGTAGGCTGTTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCC GCGG	546
Gp1a29_BSF8	481	GAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCTGTTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCC GCGG	540
Gp1a6_BSF8	547	CTCAACCGCGGAATTGCCCTTGATACTGCTGGACTTGAGTCCGGGAGAGGGTGGCGGAAT	606
Gp1a29_BSF8	541	CTCAACCGCGGAATTGCCCTTGATACTGCTGGACTCGAGTCCGGGAGAGGGTGGCGGAAT	600
Gp1a6_BSF8	607	TCCAGGTGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCC	666
Gp1a29_BSF8	601	TCCAGGTGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCC	660
Gp1a6_BSF8	667	CCTGGACCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC	726
Gp1a29_BSF8	661	CCTGGACCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC	720

```

Gp1a6_BSF8 727 TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATGCTAGGTGTCGGGGCCTTGAGCTTCGGTGCCGC 786
      |||
Gp1a29_BSF8 721 TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATGCTAGGTGTCGGGGCCTTGAGCTTCGGTGCCGC 780
      |||
Gp1a6_BSF8 787 AGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGCGGG 816
      |||
Gp1a29_BSF8 781 AGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTG-GGG 809
      |||

```

Abbildung 129: Paarweise Sequenzalignierung der Klone Gp1a6 (816 bp) und Gp1a29 (901 bp) aus der propionsäureabbauenden Mischkultur Gp1a; Übereinstimmung: 801 bp/ 810 bp (99 %); Lücken: 1 bp/ 810 bp (1 %); Strangrichtung: Plus/Plus

```

>ConsensusGp1a6_26/1-798
CTAGAGTAAAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCTGCCCATGAGTTGGG-ATAACGGCTGGAAA
CGGTGCTAATACCGAATACGCTCCGATTTTCGAC-TTCGGGGGAAAGGAGGCCTCTGCTTGCA-GCTTCCGC
TCATGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTTGTGGCGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGGGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGGAACACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCGCAATGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAACCTCT
GTCAGGAGGGAAGAACC GCC--GGTGCTAATCAGCCTGGGTCTGACGGTACCTCCAAAGGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCG-AAAGCGCACG
TAGGCTGTTTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCGGCTCAACCGCGGAATGCGCCTTGATACTGCTGGACT-
GAGTCCGGGAGAGGGTGGCGGAATTCAGGTGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGG
CGAAGCGGCC-CCTGGACCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATGCTAGGTGTCGGGGCCTTGAGCTTCGGTGCCGACGCTAACGCGTT
AAGCATCCCGCCTG

```

Abbildung 130: Konsensussequenz (Clustal 2.1, EBI) 16S rDNA Fragmente der Klone Gp1a6, und Gp1a29 aus der propionsäureabbauenden Kultur Gp1a im fasta-Format.

```

W1b 6 TTCGGAGTGGTGGATATATTTGTTTAGTAGCGGACGGGTGAGTAATGCATGAGAACCTGC 65
      |||
W1a 3 TTCGGAGTGGTGGATATATTTGTTTAAATAGCGGACGGGTGAGTAATGCATGAGAACCTGC 62
      |||
W1b 66 CCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAA 125
      |||
W1a 63 CCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAACCGGCTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAA 122
      |||
W1b 126 AGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAAGTGCT 185
      |||
W1a 123 AGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAAGTGCT 182
      |||
W1b 186 CACCAAGGCGATGACGGGTAGCCG 209
      |||
W1a 183 CACCAAGGCGATGACGGGTAGCCG 206
      |||

```

Abbildung 131: Paarweise Sequenzalignierung der Klone W1a (206 bp) und W1b (724 bp) (Muster „z2“) aus der Unterkultur Wp2a1264; Übereinstimmung: 203 bp/ 204 bp (99 %); Lücken: 0 bp/ 204 bp (1 %); Strangrichtung: Plus/Plus

```

W1a 44 GTAAT-GCATGAGAACCTGCCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATAC 102
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 1   GTAATAGCATGAGAACCTGCCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATAC 60

W1a 103 CCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCTATCAGC 162
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 61  CCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGTGGCTCATGTCTATCAGC 120

W1a 163 TAGTTGGTGAGGTAAGTGCTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCG 206
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 121 TAGTTGGTGAGGTAAGTGCTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCG 164
  
```

Abbildung 132: Paarweise Sequenzalignierung des Klons W1a (560 bp) mit der Sequenz des Klons W5 (789 bp) aus der Unterkultur Wp2a1264; Übereinstimmungen: 162 bp/ 164 bp (99 %); Lücken: 1 bp/ 164 bp (1 %); Strangrichtung: Plus/Plus

```

W1b 47 GTAAT-GCATGAGAACCTGCCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATAC 105
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 1   GTAATAGCATGAGAACCTGCCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATAC 60

W1b 106 CCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCTATCAGC 165
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 61  CCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGTGGCTCATGTCTATCAGC 120

W1b 166 TAGTTGGTGAGGTAAGTGCTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC 225
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 121 TAGTTGGTGAGGTAAGTGCTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC 180

W1b 226 GGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT 285
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 181 GGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT 240

W1b 286 GGGCAATGGGCGGAAGCCTGACCCAGCGACGCCCGGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCTG 345
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 241 GGGCAATGGGCGGAAGCCTGACCCAGCGACGCCCGGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCTG 300

W1b 346 TAAACCTCTGTTGTATGGGAAGAAGGAAGTGACGGTACCATAACGAGGAAGTCCCGGCTAA 405
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 301 TAAACCTCTGTTGTATGGGAAGAAGGAAGTGACGGTACCATAACGAGGAAGTCCCGGCTAA 360

W1b 406 CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGTAGGGG-CAAGCGTTACCCGGAATTACTGGGCG 464
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 361 CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGACGAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCG 420

W1b 465 TAAGGGG-GCGTAGGCGG-TAAAAGAAGTCATCTGTGAAAACCTATTG-CTCAACG-ATA 520
      || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
W5 421 TAAAGGGCGCGCAGGCGGATATTT-AAGTCAGCTGTTAAAGTC-ATGGGCTCAACTCAT- 477

W1b 521 GGCTAGCGGATGAAACTGAAT-TACTTGAGGGCACCAGAGGTAGACGGAATTACCCGA-G 578
      || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
W5 478 GGAT-GCGGTTGAAACTGGGTAT-CTAGAGTGTGGAGAGGTAGGCGGAATT-CCCAGTG 534

W1b 579 TAGGGGTGAAATCCGCAGATA-CGGGTAGGAACGCCGGTGGAGAAGTCGGTCT-ACTGGG 636
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
W5 535 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAG-AACACCAGTGGCGAAGGCGG-CTTACCGGC 592

W1b 637 GTGCACCAGACGCTGGGGCCCGAAAGCTAGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCCGGGTA 696
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
W5 593 CAGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGG-TA 651

W1b 697 GTCCTAGCCGTAAACGATG 715
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
W5 652 GTCCTGGCCGTAAACGATG 670
  
```

Abbildung 133: Paarweise Sequenzalignierung des Klons W1b (724 bp) aus der Unterkultur Wp2a1264 mit der Sequenz des Klons W5 (789 bp) aus der Unterkultur Wp2a1264; Übereinstimmungen: 613 bp/ 679 bp (90 %), Lücken: 19 bp/ 679 bp (0 %); Strangrichtung: Plus/Plus

W7	8	CTGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGAGTAATGCATAGGTTATGTGCCCCATAGTCTGGAAT	67
W12	4	CTGCTGACGAGTGGCGCACGGGTGAGTAATGCATAGGTTATGTGCCCCATAGTCTGGAAT	63
W7	68	AGCCACTGGAACCGGTGATTAATACCGGATATTCCTGAGAGGGGAAAGTTTTTCGCTATG	127
W12	64	AGCCACTGGAACCGGTGATTAATACCGGATATTCCTGAGAGGGGAAAGTTTTTCGCGATG	123
W7	128	GGATCAGCCTATGTCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTATGACGG	187
W12	124	GGATCAGCCTATGTCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTATGACGG	183
W7	188	GTATCCGCGCTGAGAGGGTGATCGGACACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTAC	247
W12	184	GTATCCGCGCTGAGAGGGTGATCGGACACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTAC	243
W7	248	GGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGCGAAAGCCTGAAGCAGCAACGCCGCGT	307
W12	244	GGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGCGAAAGCCTGAAGCAGCAACGCCGCGT	303
W7	308	GGAGGATGAAGTCTTCGGATTGTAAACTCCTTTTCTAAGAGAAGATTATGACGGTATCT	367
W12	304	GGAGGATGAAGTCTTCGGATTGTAAACTCCTTTTCTAAGAGAAGATTATGACGGTATCT	363
W7	368	TAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGAGGGTGCAAGCG	427
W12	364	TAGGAATAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGAGGGTGCAAGCG	423
W7	428	TTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGCCTT	469
W12	424	TTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGCCTT	465

Abbildung 134: Paarweise Sequenzalignierung des Klons W7 (560 bp) aus der Unterkultur Wp2a1264 mit der Sequenz des Klons W12 (465 bp) aus der Unterkultur Wp2a1264; Übereinstimmungen: 460 bp/ 452 bp (99 %), Lücken: 0 bp/ 462 bp (0 %); Strangrichtung: Plus/Plus

G13	69	TCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGA	128
G3	1	TCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGA	60
G13	129	AAGGAGTAATCCGCTGAAGGAGGGGCTCATGTCTATCAGTTAGTTGGTGAGGTAAAG-G	187
G3	61	AAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCTATCAGCTAGTTGGTGAGGT-AAAGT	119
G13	188	CTTACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGAAGTGAAG	247
G3	120	CTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGAAGTGAAG	179
G13	248	ATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGCAAGCC	307
G3	180	ATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGGAAGCC	239
G13	308	TGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCGTAAACCTCTGTTGTATGG	367
G3	240	TGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCGTAAACCTCTGTTGTATGG	299
G13	368	GGAGAAGGAAGTACCGGTACCATACGAGGAAGTCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	427
G3	300	GAAGAAGGAAGTACCGGTACCATACGAGGAAGTCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	359
G13	428	GGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGG	487
G3	360	GGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGG	419
G13	488	ATATTTAAGTCAGCTGTAAAAGG-CATGAGCTCAACTCATGTATGCGGTTGAAACTGGGT	546
G3	420	ATATTTAAGTCAGCTGT-TAAGGTCATGGGCTCAACTCATGGATGCGGTTGAAACTGGGT	478
G13	547	ATCTAGAGTGCTGGAGAGGTAGGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC	606
G3	479	ATCTAGAGTGCTGGAGAGGTAGGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC	538

```

G13 607 GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGCCAGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAA 666
      |||
G3 539 GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGCCAGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAA 598

G13 667 GCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCTGGCCGTAACGATGAATGCTA 726
      |||
G3 599 GCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTGGCCGTAACGATGAATGCTA 658

G13 727 GGTGTGGGTGTCGAGAGGCAT 747
      |
G3 659 G-TGTGGGTGTCGAGAGGCAT 678

```

Abbildung 135: Paarweise Sequenzalignierung des Klons G3 (bp) aus der Unterkultur mit der Sequenz des Klons G13 (bp) aus der Unterkultur Gp1b1264; Übereinstimmungen: 663 bp/ 681 bp (99 %), Lücken: 5 bp/ 681 bp (1 %); Strangrichtung: Plus/Plus

```

G2_BSF8      TGGAAACTTCGGTGGAAACAGATAGGAGGAAAAGTGGCGAACGGGTGAGTAACCGCGTGAGC 60
G11_BSF8      -----GGTAGAAAACAGATAAGAGGAAAAGTGGCGAACGGGTGAGTAACCGCGTGAGC 50
G14_BSF8      -----TAAGTAACCGCGTGAGC 16
                * *****

G2_BSF8      AACCTGCCTTACACAAAGGGATAGCCTCGGGAAACCGGGATTAATACCGTATGAGACCCC 120
G11_BSF8      AACCTGCCTTACACAAAGGGATAGCCTCGGGAAACCGGGATTAATACCGTATGAGACCCC 110
G14_BSF8      AACCTGCCTTACACAAAGGGATAGCCTCGGGAAACCGGGATTAATACCGTATGAGACCCC 76
                *****

G2_BSF8      GTTGGCGAGTGCCAAAGAGGTTAAAGATTTATCGGTGTAAGATGGGCTCGCGTCTGATTA 180
G11_BSF8      ATTGGCGAGTGCCAAAGAGGTTAAAGATTTATCGGTGTAAGATGGGCTCGCGTCTGATTA 170
G14_BSF8      GTTGGCGAGTGCCAAAGAGGTTAAAGATTTATCGGTGTAAGATGGGCTCGCGTCTGATTA 136
                *****

G2_BSF8      GCTAGTTGGTGGGATAAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAACCGGCTTGGGAGAGTGA 240
G11_BSF8      GCTAGTTGGTGGGATAAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAACCGGCTTGGGAGAGTGA 230
G14_BSF8      GCTAGTTGGTAGGATAAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAACCGGCTTGGGAGAGTGA 196
                *****

G2_BSF8      ACGGTCACATTGGAAC TGAGACACCGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA 300
G11_BSF8      ACGGTCACATTGGAAC TGAGACACCGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA 290
G14_BSF8      ACGGTCACATTGGAAC TGAGACACCGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA 256
                *****

G2_BSF8      TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCCGCTGAGCGAAGAAGGTTTTCGAAT 360
G11_BSF8      TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCCGCTGAGCGAAGAAGGTTTTCGAAT 350
G14_BSF8      TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCCGCTGAGCGAAGAAGGTTTTCGAAT 316
                *****

G2_BSF8      CGTAAAGCTCTGTCCTTGGAGAAGATAATGACGGTAACCAAGGAGGAAGCACCGGCTAAA 420
G11_BSF8      CGTAAAGCTCTGTCCTTGGAGAAGATAATGACGGTAACCAAGGAGGAAGCACCGGCTAAA 410
G14_BSF8      CGTAAAGCTCTGTCCTTGGAGAAGATAATGACGGTAACCAAGGAGGAAGCACCGGCTAAA 376
                *****

G2_BSF8      TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT 480
G11_BSF8      TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT 470
G14_BSF8      TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT 436
                *****

G2_BSF8      AAAGGGTACGTAGGCGGTTTAGCAAGTCAGATGTTAAAGCGTGGGGCTCAACCCCATAAA 540
G11_BSF8      AAAGGGTACGTAGGCGGTTTAGCAAGTCAGATGTTAAAGCGTGGGGCTCAACCCCATAAA 530
G14_BSF8      AAAGGGTACGTAGGCGGTTTAGCAAGTCAGATGTTAAAGCGTGGGGCTCAACCCCATAAA 496
                *****

G2_BSF8      GCATTTGAAACTGTTAGACTTGAGTAGTGGAGAGGAAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGGT 600
G11_BSF8      GCATTTGAAACTGTTAGACTTGAGTAGTGGAGAGGAAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGGT 590
G14_BSF8      GCATTTGAAACTGTTAGACTTGAGTAGTGGAGAGGAAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGGT 556
                *****

G2_BSF8      GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTTGCGAAGGCGACTTCTTGACACAAACTG 660
G11_BSF8      GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTTGCGAAGGCGACTTCTTGACACAAACTG 650
G14_BSF8      GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTTGCGAAGGCGACTTCTTGACACAAACTG 616
                *****

G2_BSF8      ACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCG 720
G11_BSF8      ACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCG 710
G14_BSF8      ACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCG 676
                *****

G2_BSF8      TAAACGATGAATGCTAG-CGTTGGGGGTCAAACCTCGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGC 779
G11_BSF8      TAAACGATGAATGCTAGGTTGGGGGTCAAACCTCGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGC 770
G14_BSF8      TAAACGATGAATGCTAGGTTGGGGGTCAAACCTCGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGC 736
                *****

G2_BSF8      ATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGGCAACACTGAAACTCAA-GGAATTGACGGGACCCGCAC 838
G11_BSF8      ATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGGCAACACTGAAACTCAAATGGAATTG----- 817
G14_BSF8      ATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGGCGACACTGAGACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAC 796
                *****

G2_BSF8      AAGCAGCGGAGCAT- 852
G11_BSF8      -----
G14_BSF8      CAAGCAGCGGAGCAT 811
    
```

Abbildung 136: Multiple Sequenzalignierung (Clustal 2.1, EBI) der 16S rDNA-Fragmentsequenzen der Klone G2 (852 bp), G11 (817 bp) und G14 (811 bp) aus der Unterkultur Gp1a1264

```

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 -----
G13_BSF8 ATTACTACTTTTCGGAGGAGAGATGATGTGTTCTTAGTAGCGGACGGGTGAGTAATGCAT 60

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 -----TCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCCATATGCC 51
G13_BSF8 GAGAACCTGTCCCTTCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCCATATGCC 120

F6_BSF8 --GAAGTAAAAGGAGTAATCCGCTGAGGGAGGGGCTCATGTCTATCAGCTAGTTGGTAA 58
G3_BSF8 GAGAGGTGAAAGGAGCGATCCGCTGAAGGAGAGGCTCATGTCTATCAGCTAGTTGGTGA 111
G13_BSF8 GAGAGGTGAAAGGAGTAATCCGCTGAAGGAGGGGCTCATGTCTATCAGTTAGTTGGTGA 180
          ** ** ***** ***** ** *

F6_BSF8 GGTAACGGCTTACCAAGGCGAAAACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGATCGGCCACACTG 118
G3_BSF8 GGTAAGTGTCCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG 171
G13_BSF8 GGTAAGGCTTACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTG 240
          ***** ** ***** ***** *

F6_BSF8 GAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGGCAATGGG 178
G3_BSF8 GAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGGCAATGGG 231
G13_BSF8 GAACTGAGATACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGGCAATGGG 300
          *****

F6_BSF8 CGGAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCGTAAACCTCTG 238
G3_BSF8 CGGAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTCGTAAACCTCTG 291
G13_BSF8 CGCAAGCCTGACCCAGC----CC----- 319
          ** ***** **

F6_BSF8 TTGTATGGGAAGAAGGAAGTGACGGTACCATAACGAGGAAGTCCCGGCTAACTACATGCCA 298
G3_BSF8 TTGTATGGGAAGAAGGAAGTGACGGTACCATAACGAGGAAGTCCCGGCTAACTACATGCCA 351
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 GCAGCCCCGGTAATACGTATGGGACAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGC 358
G3_BSF8 GCAGCCCGGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGC 411
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 GCAGGCGGATATTTAAGTCAGCTGTAA----- 386
G3_BSF8 GCAGGCGGATATTTAAGTCAGCTGTAAAGGTCATGGGCTCAACTCATGGATGCGGTTGAA 471
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 ACTGGGTATCTAGAGTGCTGGAGAGGTAGGCGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGT 531
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 AGATATCGGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGGCTTACTGGCCAGCAACTGACGCTGAGG 591
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 CGCGAAAGCCAGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGTAGTCTGGCCGTAAACGATG 651
G13_BSF8 -----

F6_BSF8 -----
G3_BSF8 AATGCTAGTGTGGGTGTCGAGAGGCAT 678
G13_BSF8 -----
    
```

Abbildung 137: Multiple Sequenzalignierung (Clustal 2.1, EBI) des Klons F6 (386 bp) aus der Unterkultur Fp1a1264 mit den Sequenzen der Klone G3 und G13 (678 bp, 862 bp) aus der Unterkultur Gp1a1264

```

A10_BSF8 -----CCAACCTTCCACAGG 15
A13_BSF8 -TGAGATGTAACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGAGG 59
F10_BSF8 ACTAGATGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAAACACGTATGCAACCTACCTTCCACAGG 60
                ** ***** * **

A10_BSF8 AGAATAACCCGTTGAAAAACGGACTAATACTCCATAATACAGGGTCCCGCATGGGAATA 75
A13_BSF8 GGAATAGCCTTCCGAAAAGGGAGATTAATACCGCATAACATTACATTTTCGCATGAAGA-A 118
F10_BSF8 AGAATAACCCGTTGAAAAACGGACTAATACTCCATAATACAGGGTCCCGCATGGGAATA 120
                ***** **      ***      ** *****      ***** *      * *****      * *

A10_BSF8 TTTGTAAAGATTTTTTTCGGTAGAAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTTGAG 135
A13_BSF8 GTAAATTAAGGAGTAATCCGCTATAAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGT-GAG 177
F10_BSF8 TTTGTAAAGATTTTTTTCGGTAGAAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTTGAG 180
                *      *****      * * ** ** *****      ***      *****      ***

A10_BSF8 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGAACTGAGAGGTTTATCCCCCAGACTGG 195
A13_BSF8 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGAACTGAGAGGTTTATCCCCCAGACTGG 237
F10_BSF8 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGGATAGGGAACTGAGAGGTTTATCCCCCAGACTGG 240
                *****

A10_BSF8 TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGAG 255
A13_BSF8 TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGAG 297
F10_BSF8 TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGAG 300
                *****

A10_BSF8 GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTC 315
A13_BSF8 GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTT 357
F10_BSF8 GCAACTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTT 360
                *****

A10_BSF8 TTATACAGGAATAAAGTGAGTCACGTGTGACTTTTTGTCATGTACTGTATGAATAAGGATC 375
A13_BSF8 TTATACAGGAATAAAGTGAGTCACGTGTGACTTTTTGTCATGTACTGTATGAATAAGGATC 417
F10_BSF8 TTATACAGGAATAAAGTGAGTCACGTGTGACTTTTTGTCATGTACTGTATGAATAAGGATC 420
                *****

A10_BSF8 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTAT 435
A13_BSF8 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTAT 477
F10_BSF8 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTAT 480
                *****

A10_BSF8 TGGGTTTAAAGGGCGCGCAGGCGGAAGATTAAGTCGGCGGTGAAATTTGACGCTCAACT 495
A13_BSF8 TGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGAAGATTAAGTCGGCGGTGAAATTTGACGCTCAACT 537
F10_BSF8 TGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGAAGATTAAGTCGGCGGTGAAATTTGACG----- 533
                *****

A10_BSF8 GTAAAAGTGCCATCGATACTGGTTTTCTTGAGTGTGGATGAAGTAGGCGGAATTTGTGGT 555
A13_BSF8 GTAAAAGTGCCATCGATACTGGTTTTCTTGAGTGTGGATGAAGTAGGCGGAATTTGTGGT 597
F10_BSF8 -----

A10_BSF8 GTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACAGGAACTCCGATTGCGCAGGCAGCTTACTAGGC 615
A13_BSF8 GTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACAGGAACTCCGATTGCGCAGGCAGCTTACTAGGC 657
F10_BSF8 -----

A10_BSF8 CATAACTGACGCTCAGGCACGAAGGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT 675
A13_BSF8 CATAACTGACGCTCAGGCACGAAGGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT 717
F10_BSF8 -----

A10_BSF8 CCACGCAGTAAACGATGATTACTCGCTGTTTTCGATACACAGTAAGCGGCTTAGCGAAAG 735
A13_BSF8 CCACGCAGTAAACGATGATTACTCGCTGTTTTCGATACACAGTAAGCGGCTTAGCGAAAG 777
F10_BSF8 -----

A10_BSF8 CGTTAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGA----- 785
A13_BSF8 CGTTAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGAC 835
F10_BSF8 -----
    
```

Abbildung 138: Multiple Sequenzalignierung des Klons F10 (533 bp) aus der Unterkultur Fp1a1264 mit der Sequenz des Klons A10 (785 bp) und A13 (835 bp) aus der Unterkultur Ap1a1264

```

A12  78  CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGA  137
      |||
F5    1  CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGA  60

A12  138 TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  197
      |||
F5    61  TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA  120

A12  198  GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  257
      |||
F5    121  GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  180

A12  258  AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTA  317
      |||
F5    181  AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTA  240

A12  318  TGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATA  377
      |||
F5    241  TGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATA  300

A12  378  CCTTTGCTCAITGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  437
      |||
F5    301  CCTTTGCTCAITGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  360

A12  438  GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGG  497
      |||
F5    361  GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGG  420

A12  498  TTTGTTAAATCAGATGTGAAATCCCGGGCTC  529
      |||
F5    421  TTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTC  452

```

Abbildung 139: Paarweise Sequenzalignierung des Klons F5 (500 bp) aus der Unterkultur Fp1a1264 mit der Sequenz des Klons A12 (529 bp) aus der Unterkultur Ap1a1264; Übereinstimmungen: 451 bp/ 452 bp (99 %), Lücken: 0 bp/ 452 bp (0 %); Strangrichtung: Plus/Plus

```

A520 1 1   CAACTTGGGTGCTGCATTTCAAACCTGGAAGTCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATC 60
          |||
A520 2 2   CAACTTGGGTGCTGCATTTCAAACCTGGAAGTCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATC 61
          |||
A520 1 61   CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC 120
          |||
A520 2 62   CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC 121
          |||
A520 1 121  TGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 180
          |||
A520 2 122  TGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 181
          |||
A520 1 181  GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTAGGGTTTGCATGACCTCTGTGCCGC 240
          |||
A520 2 182  GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTAGGGTTTGCATGACCTCTGTGCCGC 241
          |||
A520 1 241  CGAAACGCATTAAGTATTCGCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAAACCAAAGGAA 300
          |||
A520 2 242  CGAAACGCATTAAGTATTCGCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAAACCAAAGGAA 301
          |||
A520 1 301  TTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC 360
          |||
A520 2 302  TTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC 361
          |||
A520 1 361  CTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATTACTCTTAATCGAGGAAGTCCCTTCGGGGACAG 420
          |||
A520 2 362  CTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATTACTCTTAATCGAGGAAGTCCCTTCGGGGACAG 421
          |||
A520 1 421  GAAGACAGGTGGTGCATGGCTTCCC 445
          |||
A520 2 422  GAAGACAGGTGGTGCATGG-TTCCC 445

```

Abbildung 140: Paarweise Sequenzalignierung der Sequenzen der DGGE-Banden A520 1 (447 bp) aus Unterkultur Ap1a520 mit der Sequenz A520 2 (445 bp) aus selbiger Unterkultur, A; Übereinstimmungen: 444 bp/ 445 bp (99 %), Lücken: 0 bp/ 445 bp (0 %); Strangrichtung: Plus/Plus

9.2 Paarweise und multiple Alignierungen archaealer partieller 16S rDNA Sequenzen aus archaealen Reinkulturen

```

TAF1b_Ar1000f -----GCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 37
TAF1c_Ar1000f -----ATGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 39
TAF1a_Ar1000f -----TGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 38
Mb_f_DSM1535  GTTACCAGCGGATCCTTCGGGATGCCGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 60
                ** *****

TAF1b_Ar1000f  AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCT 97
TAF1c_Ar1000f  AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCT 99
TAF1a_Ar1000f  AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCT 98
Mb_f_DSM1535  AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCT 120
                *****

TAF1b_Ar1000f  ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 157
TAF1c_Ar1000f  ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 159
TAF1a_Ar1000f  ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 158
Mb_f_DSM1535  ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 180
                *****

TAF1b_Ar1000f  CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 217
TAF1c_Ar1000f  CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 219
TAF1a_Ar1000f  CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 218
Mb_f_DSM1535  CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 240
                *****

TAF1b_Ar1000f  TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCCACACACCGCCCGTCACGCCACC 277
TAF1c_Ar1000f  TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCCACACACCGCCCGTCACGCCACC 279
TAF1a_Ar1000f  TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCCACACACCGCCCGTCACGCCACC 278
Mb_f_DSM1535  TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCCACACACCGCCCGTCACGCCACC 300
                *****

TAF1b_Ar1000f  CAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGTTATGGT----- 318
TAF1c_Ar1000f  CAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGTTATGGTGAATCTAGGTTCTTTGAGG 339
TAF1a_Ar1000f  CAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGTTATGGT----- 318
Mb_f_DSM1535  CAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGTTATGGTGAATCTAGGTTCTTT---- 356
                *****

TAF1b_Ar1000f -----
TAF1c_Ar1000f  AGGGCGAAGTCGTAAAAAG 358
TAF1a_Ar1000f -----
Mb_f_DSM1535 -----

```

Abbildung 141: Multiple Sequenzalignierung der DGGE-Sequenzen TAF1a-c mit dem Typstamm
Methanobacterium formicum^T DSM1535

```

TAF1.2a_Ar1000f -----CCGGGACGATG 11
TAF1.2b_Ar1000f -----CCTCCGGGACGATG 14
Ms.mazeiT_DSM2053 TAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCTGCCACTGTTACCAGCATGTCCCTCCGGGACGATG 60
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f GGTACTCTGTGGGGACCGCCGATGTTAAATCGGAGGAAGGTGCGGGCCACGGTAGGTCAG 71
TAF1.2b_Ar1000f GGTACTCTGTGGGGACCGCCGATGTTAAATCGGAGGAAGGTGCGGGCCACGGTAGGTCAG 74
Ms.mazeiT_DSM2053 GGTACTCTGTGGGGACCGCCGATGTTAAATCGGAGGAAGGTGCGGGCCACGGTAGGTCAG 120
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f TATGCCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGGGCTACAATGGATGGGACAATGGGTCCCTCC 131
TAF1.2b_Ar1000f TATGCCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGGGCTACAATGGATGGGACAATGGGTCCCTCC 134
Ms.mazeiT_DSM2053 TATGCCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGGGCTACAATGGATGGGACAATGGGTCCCTCC 180
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f CCTGAAAAGGGCTGGTAATCTCACAAACCCATTTCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGTAACTC 191
TAF1.2b_Ar1000f CCTGAAAAGGGCTGGTAATCTCACAAACCCATTTCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGTAACTC 194
Ms.mazeiT_DSM2053 CCTGAAAAGGGCTGGTAATCTCACAAACCCATTTCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGTAACTC 240
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f GCCCTCGTGAAGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAATATAGCGCGGTGAATACGTCC 251
TAF1.2b_Ar1000f GCCCTCGTGAAGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAATATAGCGCGGTGAATACGTCC 254
Ms.mazeiT_DSM2053 GCCCTCGTGAAGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAATATAGCGCGGTGAATACGTCC 300
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCACCCGAGTGAGGTATGGGTGAGGGCACGGA 311
TAF1.2b_Ar1000f CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCACCCGAGTGAGGTATGGGTGAGGGCACGGA 314
Ms.mazeiT_DSM2053 CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCACCCGAGTGAGGTATGGGTGAGGGCACGGA 360
                      *****

TAF1.2a_Ar1000f CTCCGTGCCGTGTTTCGAACCTGTGCTTTGCAAGGGGGTTAAGTCGTACCAG 363
TAF1.2b_Ar1000f CTTCGTGCCGTGTTTCGAACCTGTGCTTTGCAAGGGGGTTAAGTCG-ACCAG 365
Ms.mazeiT_DSM2053 CTTCGTGCCGTGT----- 373
                      ** *****

```

Abbildung 142: Multiple Sequenzalignierung der DGGE-Sequenzen TAF1.2a und b mit dem Typstamm *Methanosarcina mazei*^T DSM2053

```

Mb.f_Ar1000f -----TGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 38
TAF1c_Ar1000f -----ATGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 39
BEG1c_Ar1000f -----TGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 38
TAF1b_Ar1000f -----GCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 37
TAF1a_Ar1000f -----TGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 38
BEG1b_Ar1000f -----TGCAGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 38
Mb.f_DSM1535 GTTACAGCGGATCCTTCGGGATGCCGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 1080
BEG1a_Ar1000f -----AGGATC-TTCGGGATGCCGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGG 51
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 98
TAF1c_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 99
BEG1c_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 98
TAF1b_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 97
TAF1a_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 98
BEG1b_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 98
Mb.f_DSM1535 AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 1140
BEG1a_Ar1000f AGGAAGGAGTGGACGACGGTAGGTCCGTATGCCCGAATCCCTGGGCTACACGCGGGCT 111
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 158
TAF1c_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 159
BEG1c_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 158
TAF1b_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 157
TAF1a_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 158
BEG1b_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 158
Mb.f_DSM1535 ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 1200
BEG1a_Ar1000f ACAATGGTTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACCTGGC 171
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 218
TAF1c_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 219
BEG1c_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 218
TAF1b_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 217
TAF1a_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 218
BEG1b_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 218
Mb.f_DSM1535 CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 1260
BEG1a_Ar1000f CTTAGTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAATGCGTAGTAATCGCG 231
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 278
TAF1c_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 279
BEG1c_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 278
TAF1b_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 277
TAF1a_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 278
BEG1b_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 278
Mb.f_DSM1535 TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 1320
BEG1a_Ar1000f TGTCATAACCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCACGCCACC 291
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGTCGAATCTAGGTTCTTTGAG 337
TAF1c_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGTCGAATCTAGGTTCTTTGAG 338
BEG1c_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGTCGAATCTAGGTTCTTTGAG 337
TAF1b_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGTC----- 318
TAF1a_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGT----- 318
BEG1b_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTATGTGTAT----- 316
Mb.f_DSM1535 CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCTTTGGT-TATGGTCGAATCTAGGTTCTTT--- 1376
BEG1a_Ar1000f CAAAAAGGGTTTGGATGAGGCCATAGTCT-----TATG-----TGTA----- 328
                * * * * *

Mb.f_Ar1000f GAGGGCGAAGTCGTAAAAA- 356
TAF1c_Ar1000f GAGGGCGAAGTCGTAAAAAG 358
BEG1c_Ar1000f GAGGGCGAAGTCGTAAAA--- 354
TAF1b_Ar1000f -----
TAF1a_Ar1000f -----
BEG1b_Ar1000f -----
Mb.f_DSM1535 -----
BEG1a_Ar1000f -----

```

Abbildung 143: Multiple Sequenzalignierung der DGGE-Sequenzen TAF1a-c und BEG1a-c mit dem Typstamm *Methanobacterium formicicum*^T DSM1535

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CTGCTATCGGTGTTTCGACTAAGCCATGCGAGTCAAATGTTCTTCGTGAAC 50
Mmv.thermophilaT_DSM17232 -----
LFP3.1_Met86f -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 ATGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTTAGGTCTGGCAT 100
Mmv.thermophilaT_DSM17232 -----ACGGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTTAGGACTGGCAT 43
LFP3.1_Met86f -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 AACCCCGGGAACCTGGGGATAATTCCGGATAGATCATGGATGCTGGAATG 150
Mmv.thermophilaT_DSM17232 AACCCCGGGAACCTGGGGATAATTCCGGATAGTTTCATGGTAGCTGGAATG 93
LFP3.1_Met86f ---CCCGG-GAACTGGGGATAATTCCGGATAGATCATAGATGCTGGAATG 46
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
***** .*****:****. *:*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f_LGC -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CACCGTGGTCGAAAGCTTTTGTGCCTAAGGATGGGTCTGCGGTCTATCAG 200
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CTCCATGATCGAAAGCTATTGCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGTCTATCAG 143
LFP3.1_Met86f CGCTGTGGTCCAAAGCTATTGCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGTCTATCAG 96
LFP3.1_Ar1500r_LGC_rev_compl -----
* * .**.* *****:*** *****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GTTGTAGTGGGTGTAACGTACCTACTAGCCTACGACGGATACGGGTTGTG 250
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GTAGTAGTGGGTGTAATGTACCTACTAGCCGACGACGGATACGGGTTGTG 193
LFP3.1_Met86f GTCGTAGTGGGTGTAATGTACCTACTAGCCTACGACGGATACGGGTTGTG 146
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
** ***** *****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGG 300
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGG 243
LFP3.1_Met86f GGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGG 196
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GGTGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGAAACCGCGATAAGGGGA 350
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGAAACCGCGATAAGGGGA 293
LFP3.1_Met86f GGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGAAACCGCGATAAGGGGA 246
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
** *****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CACCGAGTGCCAGCATCCTATGTTGGCTGTCCATATGTATAAATAACATG 400
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CACCGAGTGCCAGCATCCTATGTTGGCTGTCCGATGTATAAATCACATG 343
LFP3.1_Met86f CACCGAGTGCCAGCATCCTATGTTGGCTGTCCATATGTCTAAATCGCATA 296
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
***** ***** . ****.***** .***.

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TGTTAGCAAGGGCCGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAACACCGG 450
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TGTTAGCAAGGGCCGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAACACCGG 393
LFP3.1_Met86f TGTTAGCAAGGGCCGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGGTAACACCGG 346
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CGGCCCGAGTGGTGGCCACTATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGT 500
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CGGCCCGAGTGGTGGCCACTATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGT 443
LFP3.1_Met86f CGGCCCGAGTGGTGGCCACTAAATATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGC 396
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****:*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TTGGTCAGTCTTCCGGGAAATCTGACGGCTTAACCGTTAGGCTTTCCGGG 550
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TTGGTCAGTCTTCCGGGAAATCTGACGGCTTAACCGTTAGGCTTTCCGGG 493
LFP3.1_Met86f TTGGTCAGTCTTCCGGGAAATCTGACGGCTTAACCGTTAGGCTTTCCGGG 446
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
***** *****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GATACTGCCAGGCTTGGGACCGGGAGAGGTAAGAGGTACTACGGGGGTAG 600
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GATACTACCAGGCTTGGGACCGGGAGAGGTAAGAGGTACTACGGGGGTAG 543
LFP3.1_Met86f GATACTACCAGGCTTGGGACCGGGAGAGGTAAGAGGTACTACGGGGGTAG 496
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GAGTGAATCTTGTAATCCCTGTGGGACCACCAGTGGCGAAGGCGTCTTA 650
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GAGTGAATCTTGTAATCCCTGTGGGACCACCAGTGGCGAAGGCGTCTTA 593
LFP3.1_Met86f GAGTGAATCTTGTAATCCCGTGGGACCACCAGTGGCGAAGGCGTCTTA 546
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CCAGAACGGGTCCGACGGTGGAGGACGAAAGCTGGGGGCACGAACCGGAT 700
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CCAGAACGGGTCCGACGGTGGAGGACGAAAGCTGGGGGCACGAACCGGAT 643
LFP3.1_Met86f CCAGAACGGGTCCGACGGTGGAGGACGAAAGCTGGGGGCACGAACCGGAT 596
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TAGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAACCTATGCTCGCTAGGTGTCAGGG 750
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TAGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAACCTATGCTCGCTAGGTGTCAGGG 693
LFP3.1_Met86f TAGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAACCTATGCTCGCTAGGTGTCAGGG 646
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 ACGGTGCGACCGTTTCTGTTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCT 800
Mmv.thermophilaT_DSM17232 ACGGTGCGACCGTTTCTGTTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCT 743
LFP3.1_Met86f ACGGTGCGACCGTTTCTGTTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCT 696
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 GGGGAAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCAC 850
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GGGGAAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCAC 793
LFP3.1_Met86f GGGGAAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCAC 746
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TACAACGGGTGGAGCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGAAAACTCA 900
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TACAACGGGTGGAGCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGAAAACTCA 843
LFP3.1_Met86f TACAACGGGTGGAGCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGAAAACTCA 796
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CCGGGGGCGACAGCAATATGTAGGTCAAGCTAAAGACTTTACCAGAATCG 950
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CCGGGGGCGACAGCAATATGTAGGTCAAGCTAAAGACTTTACCAGAATCG 893
LFP3.1_Met86f CCGGGGGCGACAGCAATATGTAGGTCAAGCTAAAGACTTTACCAGAATCG 846
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CTGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGT 1000
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CTGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGT 943
LFP3.1_Met86f CTGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGT 896
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCCGTGCCCACTGTTGCCAGCATGTCCTT 1050
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCCGTGCCCACTGTTGCCAGCATATCCTT 993
LFP3.1_Met86f TAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCCGTGCCCACTGTTGCCAGCATGTCCTT 946
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----GAGACCCGTGCCCACTGTTGCCAGCATGTCCTT 33
*****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 -----ATGTGGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAAGG 45
Mmv.thermophilaT_DSM17232 -----GGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAAGG 41
LFP3.1_Met86f CCGGATGATGGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAAGG 1100
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl TGGGATGATGGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAAGG 1043
CGGGATGATGGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAA-- 994
CGGGATGATGGGTACTCTGTGGGACCGCCGATGCTAAATCGGAGGAAGG 83
| *****

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TGCGGGCTACGGTAGGTACAGTATGCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGG 95
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TGCGGGCTACGGTAGGTACAGTATGCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGG 91
LFP3.1_Met86f TGCGGGCTACGGTAGGTACAGTATGCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGG 1150
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl TGCGGGCTACGGTAGGTACAGTATGCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGG 1093
TGCGGGCTACGGTAGGTACAGTATGCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGG 133

LFP3.1_Ar1000f_2 -----
LFP3.1_Ar1000f_1 -----
LFP3.1_Ar1000f -----
Mmv.hollandicaT_DSM15978 -CTG-----GGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 41
Mmv.thermophilaT_DSM17232 GCTACAATGACTGGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 145
LFP3.1_Met86f GCTACAATGACTGGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 141
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl GCTACAATGACTGGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAAAGGGGATGGTAATC 1200
GCTACAATGACTGGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAGAGGGGATGGTAATC 1143
GCTACAATGACTGGGACAAATGGGCCCCCTACCCCGAAAGGGGACGGTAATC 183
**
*****

```

```

LFP3.1_Ar1000f_2      TCATAAACCCAGCCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGAAACCCGCCCTCGTGA 91
LFP3.1_Ar1000f_1      TCATAAACCCAGCCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGAAACCCGCCCTCGTGA 195
LFP3.1_Ar1000f        TCATAAACCCAGCCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGAAACCCGCCCTCGTGA 191
Mmv.hollandicaT_DSM15978 TCATAAACCCAGCCCTTAGTTCGGATCGAGGGCTGTAACCCGCCCTCGTGA 1250
Mmv.thermophilaT_DSM17232 TCATAAACCCAGCCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGTAACCCGCCCTCGTGA 1193
LFP3.1_Met86f        -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl TCATAAACCCAGCCGTAGTTCGGATCGAGGGCTGAAACCCGCCCTCGTGA 233
*****:*****

LFP3.1_Ar1000f_2      AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 141
LFP3.1_Ar1000f_1      AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 245
LFP3.1_Ar1000f        AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 241
Mmv.hollandicaT_DSM15978 AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 1300
Mmv.thermophilaT_DSM17232 AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 1243
LFP3.1_Met86f        -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl AGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATACGTCC 283
*****

LFP3.1_Ar1000f_2      CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 191
LFP3.1_Ar1000f_1      CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 295
LFP3.1_Ar1000f        CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 291
Mmv.hollandicaT_DSM15978 CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 1350
Mmv.thermophilaT_DSM17232 CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 1293
LFP3.1_Met86f        -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl CTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAACCCAGTGAGGTATGGGTG 333
*****

LFP3.1_Ar1000f_2      AGGGCATGGACATTGTGCTGTGCTCGAACCTAAATTTGCAAGGGGGGTT 241
LFP3.1_Ar1000f_1      AGGGCATGGACATTGTGCTGTGCTCGAACCTAAATTTGCAAGGGGGGTT 345
LFP3.1_Ar1000f        AGGGCATGGACATTGTGCTGTGCTCGAACCTAAATTTGCAAGGGGGGTT 341
Mmv.hollandicaT_DSM15978 AGGGCATAGACATTGTGCTGTGTTGCAACCTAAATTTGCAAGGGGGGTT 1400
Mmv.thermophilaT_DSM17232 AGGGCATGGACAATGTGCTGTGTTGCAACCTAAATTTGCAAGGGGGGTT 1343
LFP3.1_Met86f        -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl AGGGCA----- 339
*****

LFP3.1_Ar1000f_2      AAGTCGTACCAA----- 253
LFP3.1_Ar1000f_1      AAGTCGTACCAAGC----- 358
LFP3.1_Ar1000f        AAGTC----- 346
Mmv.hollandicaT_DSM15978 AAGTCGTAACAAGGTAAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1449
Mmv.thermophilaT_DSM17232 AAGTCGTAACAAGGTAAGCCG----- 1363
LFP3.1_Met86f        -----
LFP3.1_Ar1500r_rev_compl -----

```

Abbildung 144: Multiple Sequenzalignierung der Sequenzen aus Kultur LFP3.1 mit den Typstämmen *Methanomethylovorans hollandica*^T DSM15978 und *Methanomethylovorans thermophila*^T DSM17232, Sequenz der Oligonukleotide Met86f (hellblau), Ar1000f (gelb) und der Oligonukleotide Ar1500r (pink) und partielle Anlagerungssequenz Met1340r (blau)

9.3 Verwendete Websites

<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<http://www.dsmz.de/>

http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php?act=restriction_new

Eidesstattliche Erklärung

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hertefeld', written over a horizontal line.

Krefeld, den 02.11.2012

Lebenslauf

Name	Kerstin Seyfarth
Geburtsdatum	26. Juni 1981
Geburtsort	Offenbach am Main

Akademischer Werdegang

Februar 2008 - November 2012	Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
September 2005 - Mai 2006	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, technische Universität Darmstadt
Oktober 2000 - Mai 2005	Studium der Biologie, technische Universität Darmstadt Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie, Entwicklungsbiologie

Schulischer Werdegang

August 1991 - April 2000	Leibnizschule Gymnasium der Stadt Offenbach
August 1987 - Juni 1991	Mathildenschule Offenbach am Main