

Schlussbericht zum Projekt

Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)

Schlussbericht im Rahmen des
Förderprogramms „Nachwachsende Rohstoffe“

FKZ 22020308

Schlussbericht zum Projekt FNR 22020308

Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)

Berichtverfasser

Dr. Sarah Hahnke
Dr. Michael Klocke

Zuwendungsempfänger

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik
Max-Eyth-Allee 100
D-14469 Potsdam

Projektleiter

Dr. Michael Klocke
Tel.: (0331) 5699-113
Email: mklocke@atb-potsdam.de

Förderkennzeichen

22020308

Vorhabenbezeichnung

Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)

Laufzeit des Vorhabens

01.09.2010 bis 31.08.2012

Berichtszeitraum

01.09.2010 bis 31.08.2012

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele

I.1 Aufgabenstellung	1
I.2 Voraussetzungen	1
I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens	2
I.4 Stand der Wissenschaft und Technik	2
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	5

II. Ergebnisse

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse	6
II.1.1 Organisatorische Maßnahmen und Aufbau der technischen Infrastruktur	6
II.1.2 Anreicherungen von Archaea	6
II.1.3 Gewinnung von bakteriellen Isolaten und ihre taxonomische Einordnung	14
II.1.4 Charakterisierung einer neuen Bakterienart der Gattung <i>Clostridium</i>	16
II.1.5 Ergebnisse von Seiten Dritter	20
Zitierte Literatur	21
II.2 Verwertung	22
II.3 Erkenntnisse von Dritten	22
II.4 Veröffentlichungen	23

III. Kurzfassung **24**

IV. Berichtsblatt **26**

Anhänge **A1**

Anhang 1: Anreicherungsschemata für methanogene Archaea mit verschiedenen Medien und Substraten	A2
Anhang 2: TRFLP-Profile ausgewählter Anreicherungskulturen	A8

I. Ziele

I.1 Aufgabenstellung

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlich erzeugter Biomasse besitzt ein hohes Potential zur Reduktion von regenerativer Energie, zur Reduktion des CO₂-Ausstoßes sowie zur Fortentwicklung einer nachhaltigen Landwirtschaft. Die Bildung von Biogas erfolgt dabei durch eine komplexe und teilweise syntrophe mikrobielle Gemeinschaft aus methanbildenden Archaea und fermentativen Bacteria.

Im Rahmen des Projektes sollte der Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea erfolgen. Primär sollten dabei Stämme aus verschiedensten Arten von Biogasanlagen im ländlichen Raum isoliert und in Reinkulturen überführt werden. Hierbei sollten jeweils auch prozessrelevante Faktoren wie Reaktorstandort, -konstruktion, -betriebsweise und -leistung erfasst werden. Ziel war der Aufbau einer Sammlung, welche die Biodiversität der in landwirtschaftlichen Biogasanlagen auftretenden methanogenen Archaea repräsentiert.

Im Einzelnen sollten folgende Arbeitsziele erreicht werden:

- Einrichtung eines Anaerobier-Labors am Standort ATB
- Beprobung verschiedenster Biogasanlagen von landwirtschaftlichen Betrieben und Aufnahme aller relevanten Prozessparameter
- Isolierung der methanbildenden Euryarchaeota aus dem Probenmaterial und Entwicklung von Reinkulturen, taxonomische Einordnung der Isolate mittels mikro- und molekularbiologischer Verfahren
- Aufbau einer Stammsammlung
- Aufbau einer Datenbank zur Verwaltung der Stammsammlung

I.2 Voraussetzungen

Das Vorhaben wurde am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik durchgeführt. Für das Vorhaben waren folgende technische und organisatorische Voraussetzungen gegeben:

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik (Abteilungsleiter: Prof. Dr. B. Linke) betreibt anwendungsorientierte Grundlagenforschung zur Entwicklung neuer Verfahren für die biotechnologische Konversion nachwachsender Rohstoffe sowohl zur Energiegewinnung als auch zur Erzeugung von Grundchemikalien. Bearbeitet werden schwerpunktmäßig Themen der verfahrenstechnischen Grundlagen der Biokonversion, der Umweltbioverfahrenstechnik sowie der technischen Mikrobiologie. Die Forschung der Abteilung Bioverfahrenstechnik ist eingebunden in die abteilungsübergreifenden Forschungsstruktur des ATB insbesondere in die Forschungsprogramme *Erzeugung und Nutzung von Bioenergie* sowie *Biokonversion stärkehaltiger Agrarrohstoffe*. Des Weiteren sind Wissenschaftler der Abteilung Bioverfahrenstechnik beteiligt an den Forschungsthemen *Stoff- und Energieströme in der nachhaltigen Ressourcenbewirtschaftung* und *Qualitätssicherung bei Futtermitteln und leichtverderblichen Produkten*.

Die AG Mikrobielle Systemökologie (Leitung: Dr. M. Klocke) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik bearbeitet molekularbiologische Fragestellungen aus dem Bereich der angewandten Mikrobiologie. Zu den Arbeitsschwerpunkten gehören die Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in technischen Anwendungen mittels molekulargenetischer Methoden, die Entwicklung von marker-

gestützten Nachweisverfahren für bioverfahrenstechnisch genutzte Mikroorganismen sowie die prozessbegleitende mikrobiologische Analytik zur Identifikation von Kontaminanten und Isolaten.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Ablauf des Vorhabens orientierte sich an der Arbeitsplanung des Projektantrages. In der ersten Phase des Projektes (6 Monate) wurde ein Anaerobier-Labor am Standort ATB eingerichtet. Zur weiteren Qualifikation der eingestellten Fachkraft wurden Praktika im Bereich der Anaerobierkultivierung an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, sowie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz organisiert. Erste Kultivierungstestversuche mit Archaea aus Beständen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) wurden erfolgreich durchgeführt. Da sich erste Anreicherungs- bzw. Isolierungsversuche zur Kultivierung von Archaea aus Laborfermentern als unerwartet schwierig und langwierig erwiesen, wurde – wie im Zwischenbericht geschildert – als zusätzliches Projektziel die Isolierung fermentativer Bacteria angestrebt, die in Biogasreaktoren die hauptsächliche Leistung im Abbau insbesondere von pflanzlicher Biomasse vollziehen.

In der zweiten Projektphase (18 Monate) wurde die Isolierung von Bacteria durchgeführt und eine Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam, zur Schnellidentifizierung von mikrobiellen Reinkulturen aufgebaut. Unbekannte Isolate wurden mittels molekularbiologischer Methoden – d. h. Sequenzierung des 16S rRNA Gens und anschließender Abgleich mit der NCBI (National Center for Biotechnology Information) -Datenbank und Stammbaumanalysen mittels ARB – taxonomisch eingeordnet. Eine neue Bakterienart der Gattung *Clostridium* wurde auf phäno- und genotypischer sowie physiologischer Ebene charakterisiert. Zur Kultivierung methanogener Archaea wurden unterschiedliche Langzeitansätze durchgeführt, die zur Anreicherung verschiedener Archaea führten.

Aufgrund der unerwarteten Kultivierungsschwierigkeiten bzw. der Projekterweiterung, entfiel die Beprobung verschiedenster Biogasanlagen von landwirtschaftlichen Betrieben. Entsprechende Arbeiten sollen aber in dem Nachfolgeprojekt BIOGAS-CORE (FNR 22017111) durchgeführt werden. Die Isolierungsarbeiten wurden mit Material aus Laborfermentern durchgeführt und weiterentwickelt. Abweichend von der Vorhabenbeschreibung wurden in dem Projekt zusätzlich Bacteria isoliert und eine neue Bakterienart beschrieben.

Die langwierigen, jedoch vielversprechenden Kultivierungsansätze zur Isolierung von methanogenen Archaea sollen über die Projektzeit hinaus weiterlaufen und dienen ebenfalls als Vorarbeiten für das Verbundvorhaben BIOGAS-CORE (FNR 22017111).

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik

Die Biogasfermentation als mikrobieller Prozess

In Biogasanlagen erfolgt der anaerobe Abbau von Biomasse in vier Stufen: (1) die Hydrolyse der makromolekularen Inhaltsstoffe in der Biomasse zu Mono-, Di- und Oligosacchariden, (2) die Acidogenese durch die anaerobe Vergärung dieser Zucker zu kurzkettigen organischen Verbindungen wie Fettsäuren (*volatile fatty acids*, VFA) aber auch Alkoholen, (3) die Acetogenese im Zuge der sekundären Vergärung dieser Verbindungen zu Acetat (CH_3COOH), Kohlendioxid (CO_2) und molekularem Wasserstoff (H_2), (4) die eigentliche Methanogenese, welche durch Reduktion von CO_2 oder Acetat zu Methan (CH_4) erfolgt.

Die Schritte (1) - (3) erfolgen durch Mikroorganismen der Domäne Bacteria. Dabei weist die zahlenmäßige Dominanz von Vertretern aus der Klasse *Clostridia* in unterschiedlichen Biogasanlagen (z. B. KRAUSE *et al.*, 2008; SCHLÜTER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; RADEMACHER *et al.*, 2012) auf eine wichtige Rolle dieser Bakteriengruppe bei den Prozessen des anaeroben Abbaus von Biomasse hin. Schritt (4) kann ausschließlich durch bestimmte, methanogene Archaea umgesetzt werden. Basierend auf den genutzten Substraten lassen sich verschiedene Typen von methanogenen Archaea definieren: (1) Acetotrophe bzw. acetoklastische Methanogene nutzen ausschließlich Acetat als Kohlenstoffdonor; (2) hydrogenotrophe Methanogene reduzieren CO₂ oder Formiat unter Verwendung von H₂ als Elektronendonator; (3) methylotrophe Methanogene katabolisieren Methylverbindungen wie Methanol, methylierte Amine oder Methylschwefelverbindungen. Vereinzelt sind manche Methanogene auch in der Lage eine Reihe verschiedener Substrate zur Methanogenese zu nutzen und stellen diesbezüglich Generalisten dar.

Mikrobiologie der Methanogenese

Zur Bildung von Methan sind nur wenige prokaryotische Mikroorganismen und zwar ausnahmslos Archaea befähigt. Es sind derzeit keine methanbildenden Bacteria bekannt.

Methanogene Archaea finden sich ausschließlich im Stamm Euryarchaeota (Phylum All nach dem taxonomischen System von Bergey's Manual) und hier in den Klassen *Methanobacteria* (Class I), *Methanococci* (Class II) und *Methanopyri* (Class VII), wobei letztere ausschließlich extremophile, hyperthermophile Arten, die z. B. in geothermalen Quellen zu finden sind, enthalten (GARRITY & HOLT, 2001).

In Biogasanlagen sind große Unterschiede bezüglich der Biodiversität der auftretenden methanogenen Archaea zu beobachten. So ist in Praxisbiogasanlagen häufig nur eine verhältnismäßig uniforme Population einiger weniger, meist hydrogenotropher Arten vertreten (NETTMANN *et al.*, 2008; SCHLÜTER *et al.*, 2008). In Modellanlagen im Labormaßstab (und vereinzelt auch in Praxisanlagen) findet sich dagegen, evtl. bedingt durch eine andere Bauart oder Betriebsweise, eine wesentlich vielfältigere Flora von Archaea mit unterschiedlichen Substratnutzungseigenschaften (KLOCKE *et al.*, 2007; KLOCKE *et al.* 2008). Der Nachweis einzelner Stämme erfolgte in den Studien mittels eines kulturunabhängigen Verfahrens (Sequenzanalyse der archaeellen 16S rDNA). Auffallend ist, dass die in dem Biogasreaktor nachgewiesenen Stämme häufig große Unterschiede zu bekannten Arten, teilweise sogar zu bekannten Klassen und Ordnungen zeigen.

Nationale Sammlungen von methanogenen Archaea

Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig (URL:<http://www.dsmz.de>) ist eine übernationale Sammlung von Bakterien und Archaea und umfasst über 15.500 Stämme verschiedenster Mikroorganismen. Die DSMZ führt 234 Stämme von 28 verschiedenen Gattungen von methanogenen Archaea (Stand vor Projektbeginn April 2008). Die DSMZ sammelt nicht gezielt agrartechnisch-genutzte Stämme, ebenso bezieht sie keine verfahrenstechnischen Informationen in die Dokumentation mit ein. Diese Sammlung gibt daher keine Übersicht über die Biodiversität in agrartechnischen Systemen. Eine Entwicklung von effektiven Starterkulturen wird somit erschwert.

Bislang wurden Archaea aus deutschen Biogasanlagen immer nur vereinzelt isoliert. Eine gezielte Sammlung von Archaea aus verschiedenen Biogasanlagen zum Aufbau einer Stammsammlung sowie zur Beschreibung der auftretenden Biodiversität ist nach Kenntnis der Antragsteller bislang weder in Deutschland noch auf internationaler Ebene erfolgt.

Kultivierung anaerober Mikroorganismen

Die Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen erfolgt in speziellen Kulturgefäßen in anoxischem Medium. Ein anoxisches Milieu kann durch Begasen mit sauerstoff-freiem Gas und durch die Zugabe von chemischen Reduktionsmitteln hergestellt werden. Darüber hinaus ermöglicht ein sogenanntes „Anaeroben-Zelt“ zusätzlich die Durchführung von größeren Arbeiten unter einer anoxischen Atmosphäre; so können Überimpfungen ohne Sauerstoffkontaminationen und Isolierungen von Kolonien auf Agarplatten durchgeführt werden (SOWERS & WATTS, 2006). Die Etablierung dieser Techniken ist Gegenstand des vorgelegten Projektes und Voraussetzung für die anschließende Isolierung von anaeroben Mikroorganismen aus Biogasanlagen.

Schutzrechte

Schutzrechte Dritter wurden durch die im Rahmen dieses Projektes umgesetzten Arbeiten nicht berührt.

Eine Übersicht über relevante Fachliteratur findet sich in folgenden Artikeln:

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. (2001) Phylum All. Euryarchaeota phy. nov. *In*: GARRITY, G.M. (Editor-in-Chief): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Springer.

NETTMANN, E.; BERGMANN, I.; MUNDT, K.; LINKE, B.; KLOCKE, M. (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J Appl Microbiol*, 105:1835-1850.

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 monosubstrate. *Syst Appl Microbiol* 31: 139-151.

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. *Syst Appl Microbiol* 31:190-205.

KRAUSE, L.; DIAZ, N.N.; EDWARDS, R.A.; GARTEMANN, K.H.; KRÖMEKE, H.; NEUWEGER, H.; PÜHLER, A.; RUNTE, K.J.; SCHLÜTER, A. ET AL. (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol* 136: 91-101.

RADEMACHER, A.; ZAKRZEWSKI, M.; SCHLÜTER, A.; SCHÖNBERG, M.; SZCZEPANOWSKI, R.; GOESMANN, A.; PÜHLER, A.; KLOCKE, M. (2012) Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 785-799.

SCHLÜTER, A.; BEKEL, T.; DIAZ, N.N.; DONDRUP, M.; EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.; KRAHN, I.; KRAUSE, L.; KRÖMEKE, H. ET AL. (2008) The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136: 77-90.

SOWERS, K.R.; WATTS, J.E.M. (2006) The study of strictly anaerobic microorganisms. *Methods in Microbiology* 35: 757-782.

WANG, H.; LEHTOMÄKI, A.; TOLVANEN, K.; PUHAKKA, J.; RINTALA, J. (2009) Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure. *Biore-sour Technol* 100: 2311-2315.

Folgende Informations- und Dokumentationsdienste wurden genutzt:

- ISI Web of Knowledge (URL: <http://isiwebofknowledge.com/>)
- PubMed der U.S. National Library of Medicine (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>)
- Digitaler Katalog der Universitätsbibliothek Potsdam (URL: <http://info.ub.uni-potsdam.de>)
- Katalog der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (www.dsmz.de)

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH aufgebaut, um gewonnene Isolate mittels MALDI-TOF MS innerhalb kurzer Zeit zu screenen und zu identifizieren. Ebenfalls wurde ein Netzwerk zur Isolierung neuer Stämme aus Biogasreaktoren eingerichtet. Partner des Netzwerks sind:

- Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie, Institut für Genomforschung und Systembiologie, Genomforschung Industrieller Mikroorganismen (Dr. Andreas Schlüter, Prof. Dr. Alfred Pühler)
- Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (Prof. Dr. Helmut König)
- Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences / FSP Biomassenutzung Hamburg (Prof. Dr. Paul Scherer)
- Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie (Dr. Wolfgang H. Schwarz, Prof. Dr. Wolfgang Liebl)

II. Ergebnisse

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

II.1.1 Organisatorische Maßnahmen und Aufbau der technischen Infrastruktur

Der Aufbau eines Anaerobier-Labor am Standort ATB wurde erfolgreich durchgeführt. Hierzu wurde eine begasungsfähige Arbeitsbank sowie ein ebenfalls begasungsfähiges sog. „Anaerobier-Zelt“, welches die Einbringung größerer Kulturgefäße erlaubt, beschafft. Zur Versorgung der Arbeitsbänke wurde planungsgemäß eine Gasversorgung mit CO₂, N₂, H₂ und Mischgas eingerichtet. Ebenfalls wurde ein System zur Ultratiefkühlung von mikrobiologischen Isolaten bei -152°C mit einem System zur Versorgung mit Flüssigstickstoff bei Havarien (Notkühlsystem) eingerichtet.

Zur Bearbeitung des Vorhabens sowie zur Leitung des Anaerobier-Labors wurde nach öffentlicher Ausschreibung eine Fachkraft mit der Qualifikation Umweltschutztechniker und Biologielaaborantin, Frau J. Striesow, eingestellt. Zur weiteren Qualifikation von Frau Striesow wurden verschiedene Praktika an unterschiedlichen wissenschaftlichen Einrichtungen organisiert:

- Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences, AG Scherer (18. - 19.10.10 und 29. - 30.11.10)
- Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, AG König (18.07.11 - 05.08.11)

Gegenstand dieser Praktika war jeweils die Kultivierung und Lagerung von methanogenen Archaea.

Zur Unterstützung der wissenschaftlichen Arbeit wurde im November 2011 eine über Haushaltsmittel finanzierte wissenschaftliche Mitarbeiterin, Frau Dr. S. Hahnke, eingestellt.

Weiterhin wurde eine Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam, aufgebaut. Dieser Wirtschaftspartner ist u. a. spezialisiert auf die Kultivierung anaerober Bakterien u. a. auch aus Biogasanlagen sowie deren Schnellidentifizierung mittels MALDI-TOF MS.

II.1.2 Anreicherungen und Isolierung von Archaea

Als erste mikrobiologische Arbeiten erfolgte testweise die Kultivierung verschiedener methanogener Archaea aus Beständen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) zur Referenz für alle weiteren mikrobiologischen Arbeiten. Als Teststämme wurden die Methanbildner *Methanosarcina barkeri* (DSM 800), *Methanosarcina mazei* (DSM 2053) sowie das zellulolytische Bakterium *Clostridium thermocellum* (DSM 1237) verwendet.

Weiterhin wurden erste Versuche zur Anreicherung methanogener Archaea aus Laborfermentern mit verschiedenen Kulturmedien erprobt, die in Abstimmung mit HAW Hamburg und Univ. Mainz modifiziert wurden. Im Einzelnen getestet wurden die DSMZ Medien 119, 120, 141, 287, 318, 332, 387. In einem größeren Anreicherungsansatz wurden schließlich die Medien 120, 287 und 318 mit verschiedenen Substraten (Acetat, Formiat, Methanol, H₂/CO₂) eingesetzt, um das Wachstum unterschiedlicher Archaea zu stimulieren. Zum Animpfen der Kulturen wurde Material aus einem mesophilen Laborfermenter (CSTR) verwendet, der mit einem Substratgemisch aus 45% Rindergülle, 45% Schweinegülle und 10% Maissilage gefüttert wurde (kontinuierliche Fütterung, Raumbelastung 3 g_{OS} l⁻¹ d⁻¹).

Basierend auf MA *et al.* (2006) wurden mit dem Impfmateriel Verdünnungsreihen angesetzt, um besonders abundante Vertreter zu kultivieren. Nach mindestens vierwöchiger Inkubation wurden die Kulturen in frisches Medium transferiert, eine längere Inkubation erfolgte, sofern nach vier Wochen noch keinerlei Wachstum zu erkennen war. Ab dem zweiten Anreicherungszyklus wurden den Medien Antibiotika zugesetzt, um das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Als Beispiel ist in Abb. 1 das Anreicherungsschema mit DSMZ Medium 287 (mit Acetat und H₂/CO₂) gezeigt. Weitere Ansätze in Verdünnungskulturen wurden auch mit den DSMZ Medien 318 (mit Methanol) und 120 (mit komplexem Substrat) durchgeführt (Anhang, Abb. A1 und A2). Alle Ansätze wurden in Anaeroben-Kulturröhrchen (Fa. Dunn Labortechnik GmbH) in 5 ml Medium angesetzt. Die verschiedenen Gase zum Herstellen der sauerstoff-freien Atmosphäre wurden von der Firma Air Liquide bezogen.

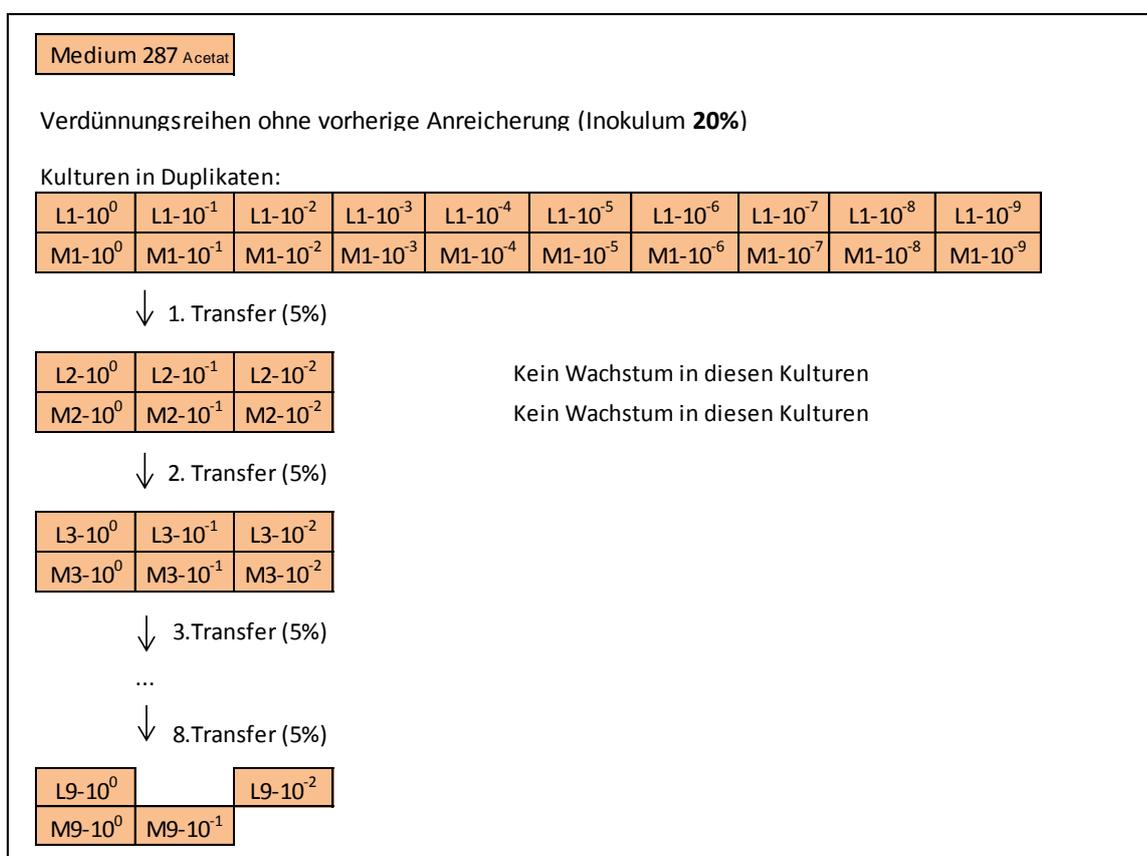


Abb. 1: Schema des Kultivierungsansatzes zur Anreicherung von Archaea in Verdünnungsreihen in DSMZ Medium 287 mit Acetat und H₂/CO₂.

Anhand der für methanogene Archaea typischen blauen Autofluoreszenz des Coenzym Faktor F₄₂₀, die durch Anregung mit UV-Licht entsteht (DOLFING & MULDER 1985), konnte in den Kulturen mit verschiedenen Medien bzw. Substraten Wachstum von unterschiedlichen Methanogenen festgestellt werden. Nach siebenmonatiger Anreicherung wiesen die einzelnen Kulturen im lichtmikroskopischen Bild noch Mikroorganismen unterschiedlicher Morphologie auf. In einigen Kulturen war die Anreicherung jedoch so weit fortgeschritten, dass ein Archaea-Morphotyp vorherrschte (z. B. Abb. 2 a - d).

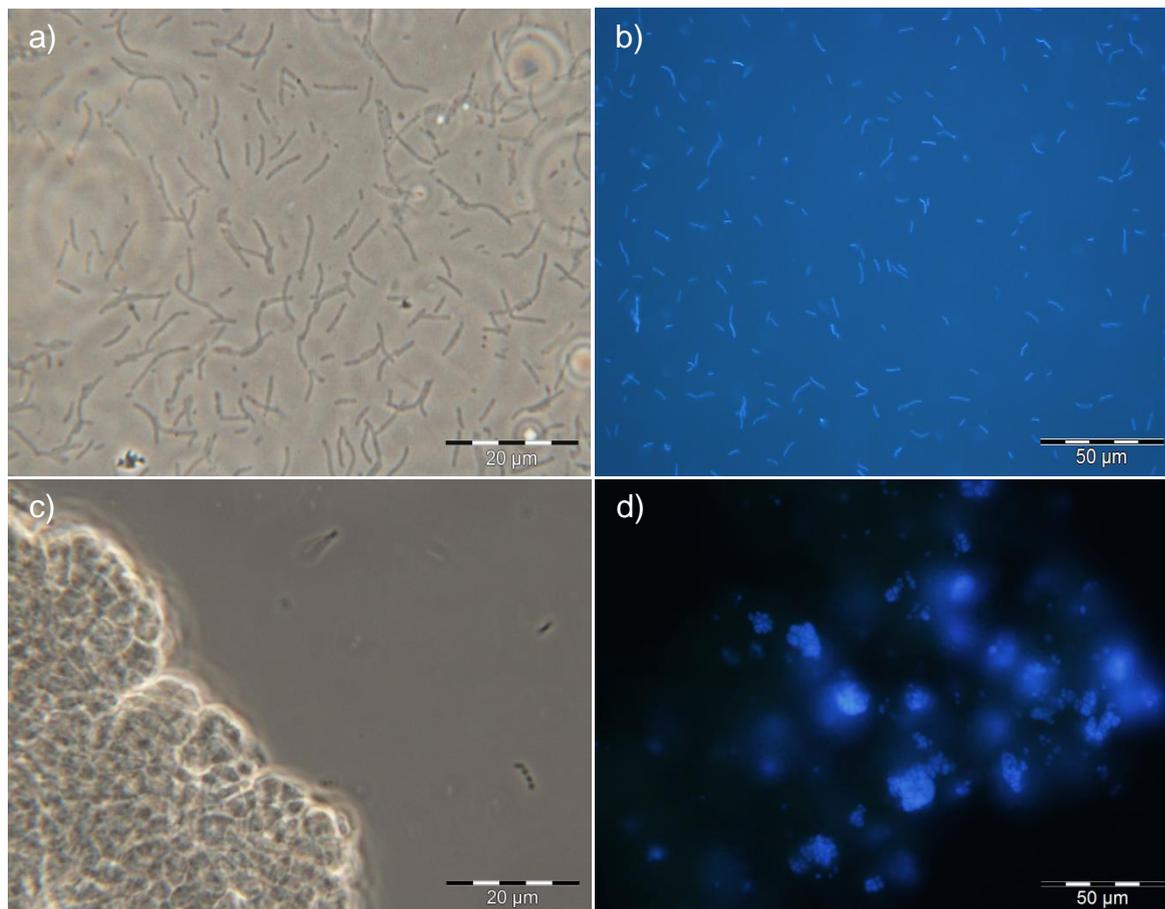


Abb. 2: Anreicherung unterschiedlicher methanogener Archaea nach siebenmonatiger Kultivierung. a) Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme der Anreicherungskultur M6-10⁻¹ in DSM Medium 287 mit Acetat und H₂/CO₂; b) Für methanogene Archaea typische Autofluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht derselben Kultur. c) Phasenkontrast-Aufnahme der Anreicherungskultur O6-10⁰ in DSM Medium 318 mit Methanol; d) Autofluoreszenz von *Methanosarcina*-ähnlichen Zellen in der Kultur O6-10⁰.

In weiteren Anreicherungsansätzen wurden in den Medien 287 und 318 zunächst Vorinkubationen mit komplexem Substrat (Zugabe von 5% Reaktorflüssigkeit) durchgeführt und dann mit einzelnen Substraten (Acetat, Formiat, Methanol, H₂/CO₂) selektiv weiterkultiviert (Abb. 3 und Abb. A3 im Anhang). Die Anreicherungsansätze basieren auf dem Manuskript von STANTSCHIEFF *et al.* (in Vorbereitung) über die Isolierung von methanogenen Archaea aus Biogasanlagen, an welchem das ATB beteiligt ist (siehe II.1.5 Ergebnisse von Seiten Dritter).

Die Kultivierung in DSMZ Medium 287 mit verschiedenen Substraten nach dem in Abb. 3 gezeigten Schema führte zu einer Anreicherung von Archaea. Das mikroskopische Bild der Ausgangskultur (Kultur A3) zeigte viele Zellen unterschiedlicher Morphologie, von denen nur sehr wenige die für methanogene Archaea typische Autofluoreszenz zeigten (Abb. 4 a, b). Durch monatlichen Transfer in frisches Selektivmedium mit unterschiedlichen Substraten wurde das Wachstum von Archaea stimuliert und ebenfalls eine Anreicherung von unterschiedlichen Archaea-Morphotypen erzielt (Abb. 4 c - h). Wachstum von Bakterien wurde durch die Zugabe von Antibiotika ab dem zweiten Anreicherungszyklus reduziert. Die mikrobielle Gemeinschaft einzelner Anreicherungen wurde mittels der auf der 16S rRNA Gensequenz basierenden, kultivierungs-unabhängigen TRFLP-Methode (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) analysiert (Fa. Beckman Coulter). Bei dieser Methode werden Genabschnitte der Mischpopulation vervielfältigt, dabei

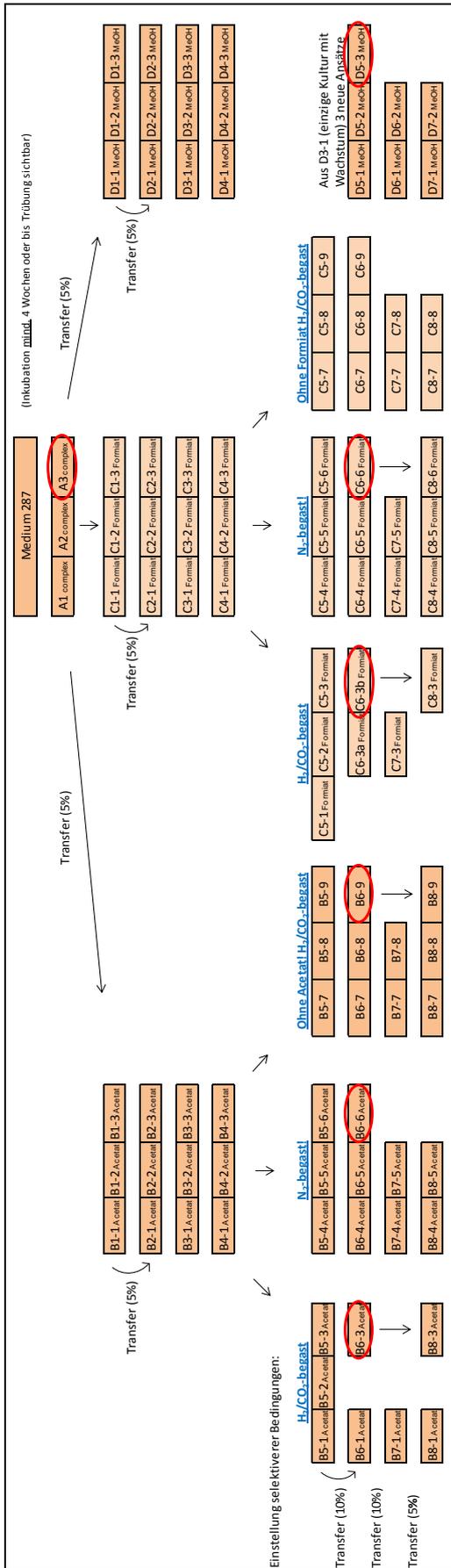


Abb. 3: Schema der Anreicherung von Archaea in DSMZ Medium 287 mit Acetat, Formiat und Methanol. Eine Vorinkubation erfolgte mit komplexem Substrat (Zugabe von Reaktorflüssigkeit, Ansätze A1 - A3) mit anschließender Überführung in Medium mit definiertem Substrat (Ansätze B - D). Alle Kulturen wurden zunächst mit H₂/CO₂ begast. Nach einigen Inkubationszyklen wurden die Bedingungen selektiver eingestellt (blaue Beschriftung), so dass nur noch H₂/CO₂ in der Gasphase oder eines der anderen Substrate im Medium verfügbar war. Rot umkreist sind die Kulturen, die mittels der TRFLP-Methode molekularbiologisch untersucht wurden. Aufgrund von zu geringem Wachstum in der Kultur C6-9 war die DNA-Ausbeute nach der Extraktion verschwindend gering; es konnten keine PCR-Produkte für die TRFLP-Analyse gewonnen werden.

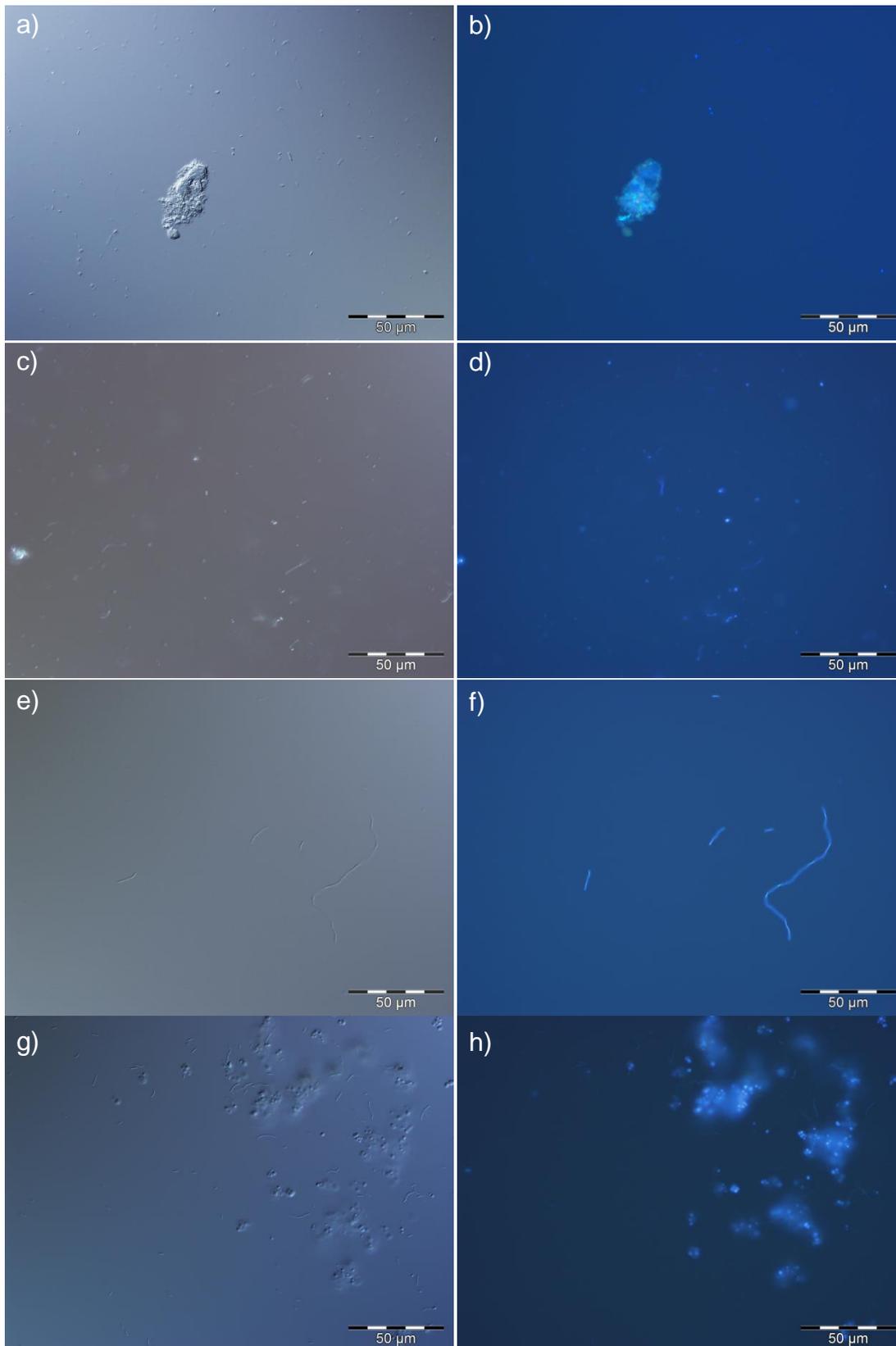


Abb. 4: Lichtmikroskopische Differentialinterferenzkontrast (DIC) -Aufnahmen (links) und die für methanogene Archaea typische Autofluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht der Zellen desselben Bildausschnitts (rechts). (a,b) Ausgangskultur A3, Vorinkubation mit komplexem Substrat; (c,d) Anreicherungskultur B6-3 mit Acetat und H_2/CO_2 ; (e,f) Anreicherungskultur B6-6 mit Acetat (*Methanosaeta*-ähnliche Zellen); (g,h) Anreicherungskultur D5-3 mit Methanol und H_2/CO_2 (stäbchenförmige Archaea und *Methanosarcina*-ähnliche Zellen).

endständig fluoreszenzmarkiert und durch Restriktionsendonukleasen spezifisch geschnitten. Die abhängig von der DNA-Sequenz unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden anschließend elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenz detektiert. Aus der DNA eines einzelnen Organismus resultiert so ein Fragment mit entsprechender Fluoreszenzintensität im TRFLP-Muster. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge der einzelnen Fragmente. Zur Vervielfältigung der DNA wurden für Bacteria die Primer 27f (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG, Cy5-markiert) und 926MRr (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) verwendet und für Archaea die Primer Ar109f (ACK GCT CAG TAA CAC GT, Cy5-markiert) und Ar912r (CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA).

Um DNA für diese Analysen zu gewinnen, wurden repräsentative Kulturen (Abb. 3 bzw. Abb. A1 und A4 im Anhang, rot markiert) in einem größeren Maßstab (20 ml) kultiviert und nach vierwöchigem Wachstum eine Chloroform-DNA-Extraktion durchgeführt. Die Ergebnisse der TRFLP-Analysen zeigten geringe Abundanzen einiger weniger Archaea in der Ausgangs-Anreicherungskultur A3, sowie eine höhere Bacteria-Diversität in ebenfalls geringen Abundanzen (Abb. 5). Wie oben beschrieben, konnte diese geringe Archaea-Abundanz auch anhand des mikroskopischen Bildes festgestellt werden. Die Profile weiterer Kulturen zeigten, ebenfalls in Übereinstimmung mit der mikroskopischen Überprüfung, dass durch selektive Kultivierung Archaea gegenüber Bacteria stark angereichert werden konnten. In den Kulturen C6-3 (mit Formiat und H₂/CO₂) bzw. C6-6 (mit Formiat) dominierten zwei bzw. ein Archaea-Fragment (TRFs der Längen 340 und 472 nt). Verschiedene (gegenüber den zugesetzten Antibiotika resistente) Bacteria waren in den Kulturen nur in geringeren Abundanzen vorhanden (Abb. 5). TRFLP-Analysen mit DSMZ-Reinkulturen zeigten, dass die Fragmente mit den Längen 340 bzw. 472 nt evtl. *Methanobacterium* sp. bzw. *Methanosarcina* sp. zugeordnet werden können. Die Profile anderer Kulturen wiesen auch andere Archaea-Fragmente auf. In der Kultur B6-6 (mit Acetat) wurde ein dominantes Archaea-Fragment (472 nt) und drei kleinere Fragmente detektiert (108, 340 und 432 nt, Abb. 5). Eine phylogenetische Zuordnung dieser Organismen durch Abgleich mit Reinkulturen war nicht möglich. Bacteria-DNA konnte aus der Kultur B6-6 mittels PCR nicht vervielfältigt werden. Dieses könnte daran liegen, dass die DNA-Menge dieser Organismen in der nur sehr schwach bewachsenen Kultur zu gering war. Das gleiche war der Fall bei der Kultur B6-9 (mit H₂/CO₂), die nur einen Archaea-Phylotyp aufwies (Abb. 5). In der Kultur B6-3 (mit Acetat und H₂/CO₂) wurden drei Archaea sowie zwei Bacteria detektiert, die jedoch recht dominant waren (Abb. 5). TRFLP-Profile weiterer Anreicherungskulturen finden sich im Anhang (Abb. A6).

Bei der Interpretation der Daten ist zu bedenken, dass während der TRFLP-Methode sog. Pseudofragmente entstehen können, die nicht auf mikrobielle DNA zurückzuführen sind, sondern während der PCR entstehen (EGERT & FRIEDRICH 2003). Zudem können unterschiedliche Organismen Fragmente gleicher Größe hervorbringen. Daher ist für die genauere Charakterisierung der Anreicherungen bzw. für die Überprüfung der Kulturen auf Reinheit eine weitere Analyse z. B. mittels DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) notwendig. Ein DGGE-Fingerprinting ermöglicht es, DNA-Sequenzen unterschiedlicher Mikroorganismen zu trennen, anschließend zu sequenzieren und anhand der DNA-Sequenzinformation eine phylogenetische Einordnung vorzunehmen. Da diese Methode dem ATB derzeit noch nicht zur Verfügung steht, konnten die Archaea-Kulturen bislang noch nicht abschließend charakterisiert werden. Entsprechende Arbeiten sind jedoch für Anfang 2013 geplant.

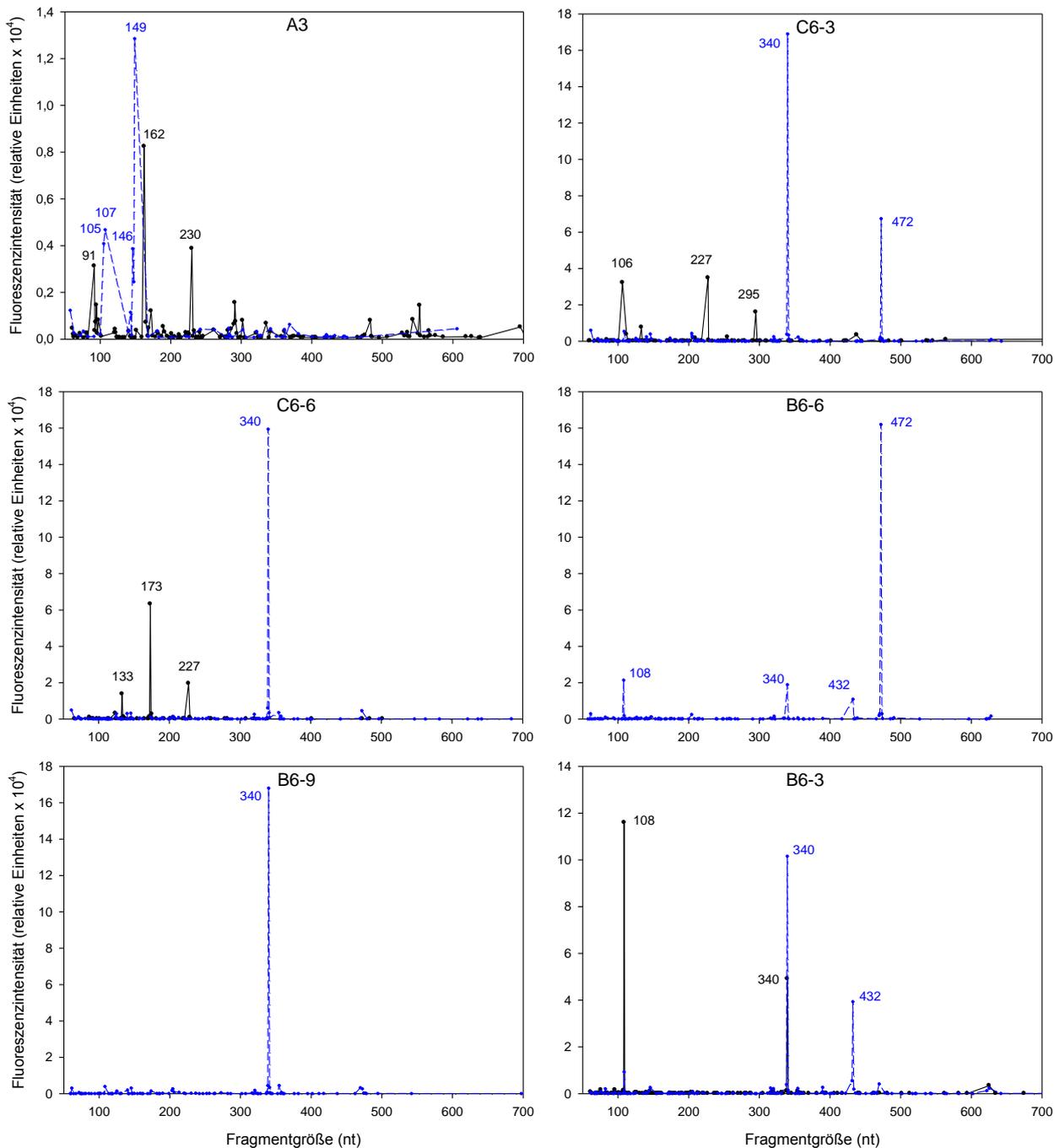


Abb. 5: TRFLP-Profile der Anreicherungskulturen. Schwarz: Bacteria-DNA-Fragmente; blau: Archaea-DNA-Fragmente. Die Zahlen geben die Fragmentlängen in Nukleotiden (nt) an. Für die Analysen der verschiedenen Kulturen wurden jeweils identische Mengen an PCR-Produkten eingesetzt.

Des Weiteren wurden im Rahmen der Kultivierungsansätze Kulturen mit einem dominanten Zellmorphotyp in entsprechendem Medium sukzessive verdünnt (Abb. A4 und A5 im Anhang), um Bacteria geringerer Abundanz herauszuverdünnen (sog. „dilution-to-extinction“ Methode). Das mikroskopische Bild der Kulturen B7-8 (10^4 -fach verdünnt und unter den vorangegangenen Bedingungen weiterkultiviert) und M8- 10^0 (10^9 -fach verdünnt) wiesen Zellen einheitlicher Morphologie sowie schwache archaelle Eigenfluoreszenz auf (Abb. 6); es handelt sich also möglicherweise bereits um Reinkulturen. Eine abschließende molekularbiologische Überprüfung liegt derzeit jedoch noch nicht vor, da die Inkubation dieser Verdünnungen erst gegen Projektende

durchgeführt werden konnten. Da Archaea nicht durch Ausstriche auf Agarplatten kultiviert werden können, wurden zur Kolonievereinzelung außerdem Agarkulturen basierend auf WIDDEL & BAK (1992) hergestellt. Dabei wird Medium mit zugesetztem Agar im flüssigen Zustand mit Anreicherungsmedium beimpft (die verwendeten Anreicherungen sind im Anhang in Abb. A1, A3, A4 und A5 grün markiert), dann zum Festwerden abgekühlt und bei 37°C inkubiert. Im Agar gewachsene Einzelkolonien können mit einer Kanüle ausgestochen und zur Gewinnung von Reinkulturen erneut in Medium überführt werden. Nach Inkubation konnte in einigen der Agarkulturen Wachstum festgestellt werden (z. B. Abb. 7); die Inkubationen und Transfers dieser Kulturen bzw. Kolonien laufen derzeit noch.

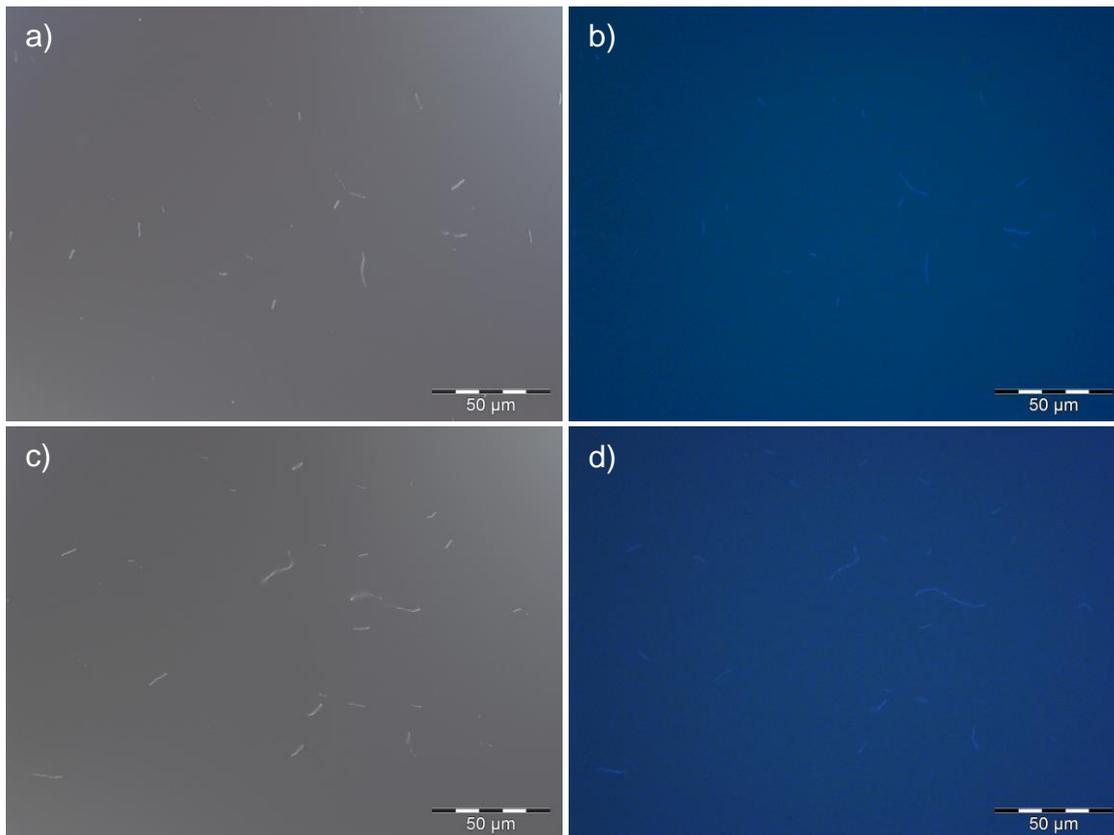


Abb. 6: Lichtmikroskopische Differentialinterferenzkontrast(DIC)-Aufnahmen (links) und die für methanogene Archaea typische Autofluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht der Zellen desselben Bildausschnitts (rechts). (a,b) Anreicherungskultur B7-8 (10^4 fache Verdünnungskultur); (c,d) Anreicherungskultur M8-2- 10^0 (10^9 fache Verdünnungskultur).



Abb. 7: Agarkultur in DSM Medium 318 mit Methanol und Acetat. Die Anreicherung O9-10⁰, die als Inokulum verwendet wurde, enthielt Methanol als einziges Substrat.

Um die noch vorhandenen Bacteria aus Archaea-Anreicherungen zu isolieren, wurden die Kulturen (M8-10⁰, B7-1, B7-4, B7-7, C7-3, C7-4, C7-7, D6-1, G7-1, F6-2, O8-10⁰; s. Abb. 1, 3, A1 und A3) auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach vierwöchiger Inkubation konnte nur auf den beiden Platten mit den Kulturen F6-2 und O8-10⁰ schwaches Wachstum festgestellt werden. Nach einem erneuten Ausstrich und bisheriger zweiwöchiger Inkubation wurde jedoch kein erneutes Wachstum beobachtet, was vermuten lässt, dass diese Organismen nur in Flüssigmedium kultiviert werden können.

II.1.3 Gewinnung von bakteriellen Isolaten und ihre taxonomische Einordnung

Da sich die Kultivierung von Methanogenen, wie im Zwischenbericht beschrieben, als unerwartet schwierig und langwierig erwies, wurde als zusätzliches Projektziel die Kultivierung von fermentativen Bacteria angestrebt. Hierzu wurden verschiedene Medien in Form von Agarplatten verwendet (Columbia Agar, Sabouraud-4% Glucose mit Chloramphenicol, Anaerobier-Agar nach Brewer, GS2-Medium, LB-Agar, DSMZ Medium 119, Endo-Agar). Material zum Beimpfen wurde zwei verschiedenen Reaktorsystemen entnommen: einem mesophilen CSTR mit 45% Rindergülle, 45% Schweinegülle und 10% Maissilage (kontinuierliche Fütterung, Raumbelastung 3 g_{os} l⁻¹ d⁻¹) und einem zweistufigen mesophilen UASS Reaktor (MUMME *et al.*, 2010) mit Maissilage + 5% Weizenstroh (kontinuierliche Fütterung, Raumbelastung 3 g_{os} l⁻¹ d⁻¹). Gewachsene Kolonien wurden zur Vereinzelung weiter ausgestrichen.

Ein System zum Screening und der Identifizierung der Kolonien mittels MALDI-TOF MS wurde in Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH eingerichtet. Auf diese Weise konnten die 105 gewonnenen mikrobiellen Isolate aus Biogasfermentern schnell analysiert bzw. identifiziert werden. 35 der Stämme erwiesen sich nach der MALDI-TOF MS als unbekannt (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die gewonnenen Isolate.

Taxonomische Zuordnung (lt. MALDI-TOF MS Analyse)	Anzahl der Isolate
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Acinetobacter</i> sp.	6
<i>Bacillus cereus</i> group	4
<i>Bacillus circulans</i>	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	2
<i>Bacillus oleronius</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	5
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	3
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Citrobacter koseri</i>	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1
<i>Clostridium bifermentas</i>	1
<i>Clostridium perfringens</i>	2
<i>Enterococcus hirae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Leucobacter</i> sp.	2
<i>Paenibacillus</i> spp.	5
<i>Proteus mirabilis</i>	5
<i>Riemerella</i> sp.	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	20
Unbekannt	35
Summe	105

Von den über das MALDI-TOF MS System nicht identifizierten Isolaten wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und universellen Bakterien- bzw. Pilzprimern (Fa. Biomers) das 16S rRNA-Gen (bei Pilzen die ITS-Region) vervielfältigt, aufgereinigt (QIAquick PCR purification kit, Fa. Qiagen) und anschließend sequenziert (Fa. GATC Biotech, Konstanz). Durch Abgleich der Gensequenz mit der NCBI(National Center for Biotechnology Information)-Datenbank wurden die Mikroorganismen phylogenetisch eingeordnet (Tab. 2). Da vier der unbekanntenen Isolate nach Kryokonservierung nicht wieder in Kultur gebracht werden konnten, konnte eine Identifizierung dieser Stämme nicht erfolgen.

Tab. 2: Phylogenetische Einordnung der nach der MALDI-TOF MS Analyse unbekanntenen Isolate.

Nächster beschriebener Verwandter	Ähnlichkeit (%)	Anzahl der Isolate
<i>Brachymonas denitrificans</i>	99	1
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	99	3
<i>Clostridium cellulovorans</i>	94	1
<i>Clostridium lactatifermentans</i>	90	1
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	96	1
<i>Clostridium</i> spp.	99	1
<i>Comamonas denitrificans</i>	98	1
<i>Hydrogenophaga bisanensis</i>	97	1
<i>Lactobacillus ruminis</i>	99	1
<i>Leucobacter aridicollis</i>	98	1
<i>Leucobacter komagatae</i>	99	1
<i>Paenibacillus woosongensis</i>	99	1
<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	97	3
<i>Pseudallescheria boydii</i>	100	1
<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	96	3
<i>Streptococcus henryi</i>	>99	8
<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	97	2
Summe		31

Die Gensequenzen der meisten Isolate wiesen eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen bereits beschriebener Bakterien aus der NCBI-Datenbank auf. Das Isolat M2/40 zeigte allerdings nur 93,9% 16S rRNA Gen-Sequenzähnlichkeit zum nächsten beschriebenen Verwandten *Clostridium cellulovorans* und entspricht somit, unter Berücksichtigung der allgemeinen Kriterien zur taxonomischen Einordnung von Bakterien (GEVERS *et al.*, 2005; TINDALL *et al.*, 2010), einer neuen Art.

II.1.4 Charakterisierung einer neuen Bakterienart der Gattung *Clostridium*

Das Bakterienisolat M2/40 wurde charakterisiert und als neue Art der Gattung *Clostridium* beschrieben. Phylogenetische Stammbaumanalysen basierend auf der 16S rRNA Gensequenz zeigten, dass das Isolat in das Clostridien Cluster I innerhalb der Klasse der *Clostridia* fällt (Abb. 8). Dieses Clostridien-Cluster enthält u. a. das erste beschriebene Bakterium dieser Gattung, *Clostridium butyricum*, somit ist der Stamm M2/40 zu den „echten“ Clostridien zu zählen (COLLINS *et al.*, 1994). Zur Charakterisierung des Bakteriums M2/40 wird derzeit ein Manuskript mit dem Arbeitstitel „*Clostridium bornium* sp. nov., isolated from a mesophilic two-phase lab-scale biogas reactor“ angefertigt, das bei der renommierten Fachzeitschrift „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology“ eingereicht werden soll. Die zur Veröffentlichung notwendige Hinterlegung des Stammes in öffentlichen Sammlungen erfolgte bereits, und zwar bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) sowie der Spanish Type Culture Collection (CECT).

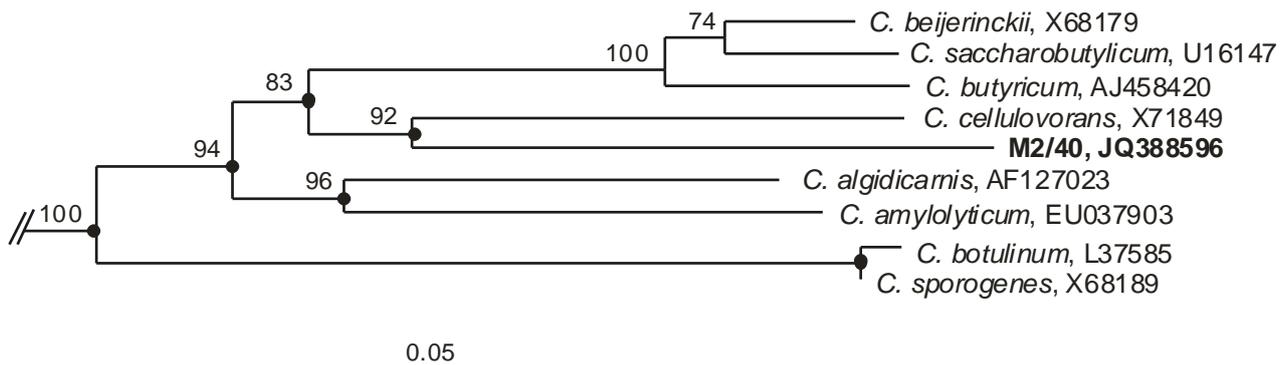


Abb. 8: Der phylogenetische Baum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse des Bakterienisolats M2/40 mit Vertretern des Clostridien Clusters I. Der Baum wurde mit der Neighbour-Joining-Methode in dem Softwarepaket ARB berechnet (LUDWIG *et al.* 2004). Die Bootstrap-Werte (%) sind ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Gruppierung. Kreise kennzeichnen mittels der Maximum-Likelihood-Methode reproduzierbare Knotenpunkte. Der Maßstab entspricht der Anzahl der Substitutionen pro DNA-Base.

Die zahlenmäßige Dominanz von Vertretern aus der Klasse *Clostridia* in Biogasanlagen mit unterschiedlichen Substraten (z. B. KRAUSE *et al.*, 2008; SCHLÜTER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; RADEMACHER *et al.*, 2012) weist auf eine wichtige Rolle dieser Mikroorganismen beim anaeroben Abbau von Biomasse hin. Die wichtigsten Substrate für Vertreter der Clostridien sind Polymere wie Zellulose, Stärke, Pektin oder andere Polysaccharide und Proteine (ANDREESSEN *et al.*, 1989). Während der Fermentation bilden sie organische Säuren (Acidogenese), die durch acetogene Bacteria hauptsächlich zu Acetat abgebaut werden (Acetogenese). Des Weiteren bilden viele Clostridien große Mengen an Wasserstoff (H_2), welches, wie auch Acetat, vielen methanogenen Archaea als Substrat für die Methanbildung dient (Methanogenese).

Das neue Clostridienisolat M2/40 zeigt Stärkehydrolyseaktivität, die Verwertung einiger Monosaccharide, sowie die Produktion von Formiat, Laktat, Acetat, Buttersäure, Ethanol und in geringen Mengen Propionsäure nach Fermentation von Sucrose. Wasserstoff als Fermentationsprodukt konnte derzeit aufgrund der fehlenden Analysetechnik am ATB noch nicht gemessen werden; die Analyse soll aber demnächst und in Kooperation mit dem MARUM - Zentrum für marine Umweltwissenschaften der Universität Bremen (AG Hinrichs) erfolgen. Die Abgrenzung des Isolats zur nächsten beschriebenen Art *Clostridium cellulovorans* erfolgte anhand von phänotypischen und phylogenetischen Unterschieden (Abb. 9, Tab. 3). Die Bestimmung des G+C Gehalts der DNA wurde als Auftragsarbeit von der DSMZ durchgeführt. Ergänzend wurde der Stamm *C. cellulovorans* von der DSMZ bezogen, um vergleichende Wachstumsversuche durchzuführen. Für die Untersuchung des Substratspektrums wurden die Stämme in geeignetem Medium kultiviert und einzelne Substrate zugesetzt. Das Wachstum wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte verfolgt. Fermentationsprodukte im Kulturmedium wurden mittels der chromatographischen HPLC-Analyse gemessen. Für die Bestimmung der Katalase-, Protease- und β -Glucosidase-Aktivität sowie der Indolbildung wurde das API 20 A System zur Identifizierung von Anaerobiern verwendet (Fa. bioMérieux).

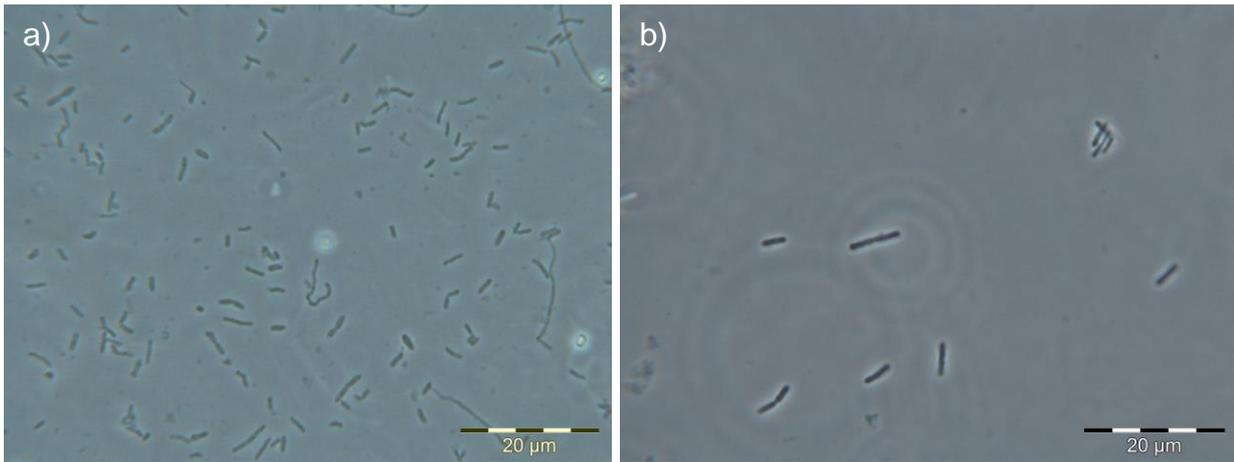


Abb. 9: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen des Isolats M2/40 (a) und *C. cellulovorans* (b).

Tab. 3: Charakteristika des Isolats M2/40 und des Referenzorganismus *Clostridium cellulovorans* Stamm 743B. *, Daten aus der Stammbeschreibung von Sleat *et al.*, 1984; +: positive Reaktion bzw. Wachstum; -: negative Reaktion bzw. kein Wachstum; nn: noch zu nennen (die Analysen liegen derzeit noch nicht vor).

Charakteristika	M2/40	<i>C. cellulovorans</i>
16S rRNA Sequenzähnlichkeit zu M2/40 (%)	100	93,9
Koloniemorphologie	weißlich, undurchsichtig, 0,5-1,0 mm, rhizoid	weißlich, undurchsichtig, 0,5-0,8 mm, glatter Rand. Bei Alterung rhizoides Erscheinungsbild.
Zellmorphologie	Stäbchen/ Filamente	Stäbchen
Zellgröße (µm)	0,6-1,2 x 1,1-16,8	0,6-1,0 x 2,2-7,6
Gramfärbung	variabel	negativ*
Beweglichkeit	-	-*
Katalase	+	-
β-Glucosidase-Aktivität	-	+
Protease-Aktivität	-	-
Indolbildung	-	nn
DNA G+C Gehalt (mol%)	29,6	26-27*
Temperaturbereich (°C)	20-45	20-40*
Temperaturoptimum (°C)	35	37*
pH-Bereich	nn	6,4-7,8*
pH-Optimum	nn	7*
Verwendete Substrate:		
Glucose	+	+
Fructose	-	+
Maltose	+	+
Galactose	-	+
Sucrose	+	+
Laktose	-	+
Cellobiose	-	+
Cellulose	-	+
Mannose	-	- /+*
Rhamnose	-	-
Arabinose	-	-
Trehalose	+	-
Xylose	-	-
Laktat	-	-*
Pyruvat	-	-
Pektin	-	+
Xylan	-	+
Pepton	-	nn
Stärke	schwache Hydrolyse	-
Fermentationsprodukte:		
Acetat	+	+
Butyrat	+	+
Laktat	+	+
Formiat	+	+
Propionat	Spuren	-
H ₂	nn	+
CO ₂	nn	+
Ethanol	+	Spuren*
Pyruvat	nn	-*
Succinat	nn	-*

II.1.5 Ergebnisse von Seiten Dritter

Von Seiten der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, AG König, wird derzeit ein Manuskript für einen wissenschaftlichen Fachartikel zur Isolierung methanogener Archaea aus Biogasanlagen vorbereitet, an welchem das ATB beteiligt ist. Arbeitstitel der Publikation ist: Stantscheff R, Seyfarth K, Dröge S, Klocke M, König H: Culturable methanogenic microbiota from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants and lab-scale biogas fermenters.

Die Einreichung bei einer renommierten Fachzeitschrift ist für 2013 geplant. Dieser Beitrag ist die erste Publikation zur Isolierung methanogener Archaea aus Biogasanlagen, welche auf Basis nachwachsender Rohstoffe betrieben werden.

Zitierte Literatur

- ANDREESEN, J.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. (1989) Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Glostridium*. In: MINTON, N.P. & CLARKE, D.J. (Editors): *Biotechnology Handbooks 3. Clostridia*, pp. 27-34. Plenum Press, New York.
- COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A.E. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44: 812-826.
- DOLFING, J.; MULDER, J.W. (1985) Comparison of methane production rate and coenzyme f(420) content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 49: 1142-1145.
- EGERT, M.; FRIEDRICH, M.W. (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 69: 2555-2562.
- GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, G.B.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev Microbiol* 3: 733-739.
- KRAUSE, L.; DIAZ, N.N.; EDWARDS, R.A.; GARTEMANN, K.H.; KRÖMEKE, H.; NEUWEGER, H.; PÜHLER, A.; RUNTE, K.J.; SCHLÜTER, A. ET AL. (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol* 136: 91-101.
- LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H. *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363-1371.
- MA, K.; LIU, X.; DONG, X. (2006) *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:127-131.
- MUMME, J.; LINKE, B.; TÖLLE, R. (2010) Novel upflow anaerobic solid-state (UASS) reactor. *Bioresour Technol* 101: 592-599.
- RADEMACHER, A.; ZAKRZEWSKI, M.; SCHLÜTER, A.; SCHÖNBERG, M.; SZCZEPANOWSKI, R.; GOESMANN, A.; PÜHLER, A.; KLOCKE, M. (2012) Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 785-799.
- SCHLÜTER, A.; BEKEL, T.; DIAZ, N.N.; DONDRUP, M.; EICHENLAUB, R. *et al.* (2008) The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136: 77-90.
- SLEAT, R.; MAH, R.A.; ROBINSON, R. (1984) Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 48: 88-93.
- STANTSCHIEFF, R.; SEYFARTH, K.; DRÖGE, S.; KLOCKE, M.; KÖNIG, H. Culturable methanogenic microbiota from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants and lab-scale biogas fermenters. In Vorbereitung
- TINDALL, B.J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H.-J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 249-266.

WANG, H.; LEHTOMÄKI, A.; TOLVANEN, K.; PUHAKKA, J.; RINTALA, J. (2009) Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure. *Bioresour Technol* 100: 2311-2315.

WIDDEL, F.; BAK, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *In*: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. & SCHLEIFER, K.-H. (Editors): *The prokaryotes*, pp. 3352-3378. Springer-Verlag, New York.

II.2 Verwertung

Im Rahmen dieses Projektes wurde am ATB ein Anaerobier-Labor eingerichtet, das die Anreicherung und Isolierung von zum Teil unbekanntem anaeroben Mikroorganismen aus Biogasanlagen ermöglichte. Untersuchungen an Isolaten erlauben eine umfassende physiologische Charakterisierung der Organismen und liefern somit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der mikrobiellen Prozesse in Biogasanlagen. Durch die Bereitstellung von an der Biogasproduktion beteiligten Mikroorganismen kann u. a. die Entwicklung von Starterkulturen bzw. Impfmateriale ermöglicht werden. Darüber hinaus dienen Isolate als wichtige Referenzen für kultivierungsunabhängige Methoden. Sie ermöglichen z. B. die Zuordnung von Sequenzdaten molekularbiologischer Analysen mikrobieller Gemeinschaften (z. B. Metagenom- und TRFLP-Analysen). Auf Basis der gewonnenen Sequenzinformationen der Isolate können außerdem DNA-Sonden zur Identifizierung und Quantifizierung von relevanten Organismen in Biogasanlagen abgeleitet werden.

Durch die aufgebaute Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH, die auch über das Projekt hinaus bestehen bleiben wird, wurde die RIPAC-Datenbank der MALDI-TOF MS Profile durch unsere unbekanntem Isolate erweitert, was zukünftig eine schnelle Identifizierung dieser Stämme ermöglicht.

Der Aufbau des Anaerobier-Labors, sowie die im Rahmen des Projektes gewonnenen Expertisen ermöglichen darüber hinaus auch zukünftige Isolierungen und Charakterisierungen anaerober Mikroorganismen am ATB, die für den Prozess der Biogasbildung wichtig sind. Die langwierigen, jedoch vielversprechenden Kultivierungsansätze zur Isolierung von methanogenen Archaea sollen über die Projektzeit hinaus weiterlaufen und dienen als Vorarbeiten für das Verbundvorhaben BIOGAS-CORE (FNR 22017111).

Die Veröffentlichung der Charakterisierung einer neuen Bakterienart in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology“ ist für 2013 geplant. Die 16S rRNA Gensequenz des Bakteriums wurde zur allgemeinen Verfügung an die NCBI GenBank übermittelt.

II.3 Erkenntnisse von Dritten

Während der Projektlaufzeit sind unserer Kenntnis nach keine Publikationen über die Isolierung von Archaea aus Biogasreaktoren veröffentlicht worden. Hierzu erfolgte am 08.11.2012 eine Suchanfrage in dem mehrere Datenbanken enthaltenen Online Zitationsindex „ISI Web of Knowledge“ (URL: <http://isiwebofknowledge.com/>) der Fa. Thompson-Reuters. Unter der Rubrik „Title“ wurden Publikationen von 2010 – 2012 nach den Stichworten „methano* AND isolated“,

„archaea AND isolated“, „methano* AND biogas“, „methano* AND reactor“ (*= Platzhalter für beliebige Wendungen; AND= beide Begriffe sollen enthalten sein) bzw. „methanogenic“ durchsucht. Keine der Publikationen bezog sich auf die Isolierung methanogener Archaea aus Biogasanlagen.

Die Isolierung methanogener Archaea aus anderen Habitaten wurde in folgenden Publikationen vorgestellt:

- (1) BRÄUER, S.L.; CADILLO-QUIROZ, H.; WARD, R.J.; YAVITT, J.B.; ZINDER, S.H. (2011) *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 45-52.
- (2) CHENG, L.; DAI, L.; LI, X.; ZHANG, H.; LU, Y. (2011) Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field. *Appl Environ Microbiol* 77: 5212-5219.
- (3) KITAMURA, K.; FUJITA, T.; AKADA, S.; TONOUCI, A. (2011) *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1246-1252.
- (4) LÜ, Z.; LU, Y. (2012) *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil. *PLoS One* 7: e35279.
- (5) MORI, K.; HARAYAMA, S. (2011) *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 138-143.
- (6) MORI, K.; IINO, T.; SUZUKI, K.; YAMAGUCHI, K.; KAMAGATA, Y. (2012) Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen "*Methanosaeta pelagica*" sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment. *Appl Environ Microbiol* 78: 3416-3423.
- (7) SAKAI, S.; EHARA, M.; TSENG, I.C.; YAMAGUCHI, T.; BRÄUER, S.L.; CADILLO-QUIROZ, H.; ZINDER, S.H.; IMACHI, H. (2012) *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family *Methanoregulaceae* fam. nov. within the order *Methanomicrobiales*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1389-1395.
- (8) SHIMIZU, S.; UPADHYE, R.; ISHIJIMA, Y.; NAGANUMA, T. (2011) *Methanosarcina horonobensis* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface Miocene formation. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2503-2507.
- (9) WU, S.Y.; LAI, M.C. (2011) Methanogenic archaea isolated from Taiwan's Chelungpu fault. *Appl Environ Microbiol* 77: 830-838.
- (10) YASHIRO, Y.; SAKAI, S.; EHARA, M.; MIYAZAKI, M.; YAMAGUCHI, T.; IMACHI, H. (2011) *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 53-59.
- (11) ZHU, J.; LIU, X.; DONG, X. (2011) *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2974-2978.

II.4 Veröffentlichungen

Zur Charakterisierung des neuen Clostridien-Isolats Stamm M2/40 wird derzeit ein Manuskript erstellt und soll Anfang 2013 bei einer renommierten Fachzeitschrift eingereicht werden:

HAHNKE, S.; STRIESOW, J.; KLOCKE, M. *Clostridium bornium* sp. nov., isolated from a mesophilic two-phase lab-scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. In Vorbereitung.

III. Kurzfassung

Projekttitle: Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)

FKZ: FNR 22020308

Projektbeschreibung:

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlich erzeugter Biomasse besitzt ein hohes Potential zur Reduktion von regenerativer Energie, zur Reduktion des CO₂-Ausstoßes sowie zur Fortentwicklung einer nachhaltigen Landbewirtschaftung. Die Bildung von Biogas erfolgt dabei durch eine komplexe und teilweise syntrophe mikrobielle Gemeinschaft aus methanbildenden Archaea und fermentativen Bacteria.

Im Rahmen des Projektes soll der Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea erfolgen. Primär sollen dabei Stämme aus verschiedensten Arten von Biogasanlagen im ländlichen Raum isoliert und in Reinkulturen überführt werden. Hierbei sollen jeweils auch prozessrelevante Faktoren wie Reaktorstandort, -konstruktion, -betriebsweise und -leistung erfasst werden. Ziel ist der Aufbau einer Sammlung, welche die Biodiversität der in landwirtschaftlichen Biogasanlagen auftretenden methanogenen Archaea repräsentiert.

Im Einzelnen sollen folgende Arbeitsziele erreicht werden:

- Einrichtung eines Anaerobier-Labors am Standort ATB
- Beprobung verschiedenster Biogasanlagen von landwirtschaftlichen Betrieben und Aufnahme aller relevanten Prozessparameter
- Isolierung der methanbildenden Euryarchaeota aus dem Probenmaterial und Entwicklung von Reinkulturen, taxonomische Einordnung der Isolate mittels mikro- und molekularbiologischer Verfahren
- Aufbau einer Stammsammlung
- Aufbau einer Datenbank zur Verwaltung der Stammsammlung

Projektergebnisse:

In der ersten Phase des Projektes wurde ein Anaerobier-Labor am Standort ATB eingerichtet. Zur weiteren Qualifikation der eingestellten Fachkraft wurden Praktika im Bereich der Anaerobierkultivierung an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, sowie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz organisiert. Da sich erste Anreicherungs- bzw. Isolierungsversuche zur Kultivierung von Archaea aus Laborfermentern als unerwartet schwierig und langwierig erwiesen, wurde – wie im Zwischenbericht geschildert – als zusätzliches Projektziel die Isolierung fermentativer Bacteria angestrebt, die in Biogasreaktoren die hauptsächliche Leistung im Abbau insbesondere von pflanzlicher Biomasse vollziehen. Aufgrund der Projekterweiterung entfiel die Beprobung verschiedenster Biogasanlagen von landwirtschaftlichen Betrieben. Die Isolierungsarbeiten wurden mit Material aus Laborfermentern durchgeführt und weiterentwickelt.

Mit verschiedenen Medien und Substraten konnten Archaea mit unterschiedlichem Morphotyp angereichert werden. Das mikroskopische Bild mancher Kulturen wies Zellen einheitlicher Morphologie sowie archaelle Eigenfluoreszenz auf, es handelt sich also möglicherweise bereits um Reinkulturen, worauf auch erste molekularbiologische Untersuchungen hindeuteten.

Es wurden 105 Bacteria aus Laborfermentern isoliert und zur Schnellidentifizierung von mikrobiellen Reinkulturen mittels MALDI-TOF MS eine Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH (Potsdam) aufgebaut. Unbekannte Isolate wurden mittels molekularbiologischer Methoden taxonomisch eingeordnet und in die RIPAC-Datenbank mit aufgenommen, was zukünftig eine schnelle Identifizierung dieser Stämme ermöglicht. Des Weiteren wurde eine neue Bakterien-Art der Gattung *Clostridium* auf physiologischer, phäno- und genotypischer Ebene charakterisiert.

Project title: Establishment of an ex situ culture collection of methanogenic Archaea derived from biogas plants of rural areas (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)

Project number: FNR 22020308

Project description:

The production of biogas from agriculturally produced biomass has a high potential for the generation of renewable energy, reduction of CO₂ emission and development of sustainable land-use. The formation of biogas is conducted by a complex and partially syntrophic microbial community consisting of methanogenic Archaea and fermentative Bacteria.

Within this project an ex situ collection of methanogenic Archaea shall be established. Therefore a broad range of strains from different types of agricultural biogas plants shall be collected and transferred into pure cultures. Parallel to sampling, all process-relevant data for the sampled reactor shall be determined. The aim of the project is the establishment of a culture collection which reflects the archaeal biodiversity present in agricultural biogas plants.

Within the context of the project, following tasks shall be conducted:

- Setup of a laboratory for handling anaerobic methanogens at ATB site
- Sampling of agricultural biogas plants and development of isolates
- Taxonomic classification of isolates by microbiological and molecular techniques
- Establishment of a culture collection
- Establishment of a database for culture collection management

Project results:

During the first phase of the project the setup of a laboratory for handling anaerobic methanogens at ATB site was successfully accomplished. For further qualification of the recruited technician workshops about the cultivation of anaerobes were organized at the Hamburg University of Applied Sciences and the Johannes Gutenberg University of Mainz. As described in the interim report the enrichment and isolation of Archaea turned out to be unexpected difficult and time-consuming. Thus the isolation of fermentative Bacteria was aimed as an additional objective of this project as these Bacteria are the main players in the degradation of plant-based biomass particularly. Due to the extension of the project the sampling of agricultural biogas plants was omitted, the cultivation assays were carried out with material from laboratory-scale biogas reactors.

Using different media and substrates Archaea with different morphotypes could be enriched. The microscopic image of some cultures exhibited cells with a homogeneous morphology showing archaeal autofluorescence. According to first molecular biological analyses these cultures can be suggested to be pure cultures.

From biogas reactors 105 bacterial isolates were obtained. In order to identify these microorganisms with a fast identification system (MALDI-TOF MS analyses) a collaboration with the RIPAC-LABOR GmbH (Potsdam) was established. Unknown isolates were identified using molecular biological methods and the taxonomic information of these organisms was included in the RIPAC database allowing future identification of these organisms. Furthermore a new bacterial species of the genus *Clostridium* was characterized.

IV. Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Schlussbericht	
3a. Titel des Berichts Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)		
3b. Titel der Publikation		
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Hahnke, Sarah; Klocke, Michael		5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.08.2012
		6. Veröffentlichungsdatum
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))		7. Form der Publikation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) Max-Eyth-Allee 100 D-14469 Potsdam		9. Ber. Nr. Durchführende Institution
		10. Förderkennzeichen *) 22020308
		11a. Seitenzahl Bericht 37 Seiten
		11b. Seitenzahl Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		12. Literaturangaben
		14. Tabellen
		15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlich erzeugter Biomasse besitzt ein hohes Potential zur Reduktion von regenerativer Energie, zur Reduktion des CO ₂ -Ausstoßes sowie zur Fortentwicklung einer nachhaltigen Landwirtschaft. Die Bildung von Biogas erfolgt dabei durch eine komplexe und teilweise syntrophe mikrobielle Gemeinschaft aus methanbildenden Archaea und fermentativen Bacteria. Im Rahmen des Projektes sollte am Standort ATB ein Anaerobier-Labor eingerichtet werden und der Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea erfolgen. Primär sollten dabei Stämme aus verschiedensten Arten von Biogasanlagen im ländlichen Raum isoliert und in Reinkulturen überführt werden. Ziel war der Aufbau einer Sammlung, welche die Biodiversität der in landwirtschaftlichen Biogasanlagen auftretenden methanogenen Archaea repräsentiert. Da sich erste Anreicherungs- bzw. Isolierungsversuche zur Kultivierung von Archaea als unerwartet schwierig und langwierig erwiesen, wurde als zusätzliches Projektziel die Isolierung fermentativer Bacteria angestrebt, die in Biogasreaktoren die hauptsächliche Leistung im Abbau insbesondere von pflanzlicher Biomasse vollziehen. Mit verschiedenen Medien und Substraten konnten Archaea unterschiedlicher Zellmorphologie angereichert werden. Das mikroskopische Bild mancher Kulturen wies Zellen einheitlicher Morphologie sowie archaelle Eigenfluoreszenz auf, es handelt sich also möglicherweise bereits um Reinkulturen, worauf auch erste molekularbiologische Untersuchungen hindeuteten. Des Weiteren wurden 105 Bacteria aus Laborfermentern isoliert und zur Schnellidentifizierung von mikrobiellen Reinkulturen mittels MALDI-TOF MS eine Kooperation mit RIPAC-LABOR GmbH (Potsdam) aufgebaut. Unbekannte Isolate wurden mittels molekularbiologischer Methoden taxonomisch eingeordnet und in die RIPAC-Datenbank mit aufgenommen, was zukünftig eine schnelle Identifizierung dieser Stämme ermöglicht. Außerdem wurde eine neue Bakterien-Art der Gattung <i>Clostridium</i> auf physiologischer, phäno- und genotypischer Ebene charakterisiert.		
19. Schlagwörter Biogas, mikrobielle Gemeinschaft, Kultivierung anaerober Mikroorganismen, methanogene Archaea, fermentative Bacteria, Clostridien		
20. Verlag		21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Anhänge

Anhang 1: Anreicherungsschemata für methanogene Archaea mit verschiedenen Medien und Substraten

Anhang 2: TRFLP-Profile ausgewählter Anreicherungskulturen

Anhang 1

Anreicherungsschemata für methanogene Archaea mit verschiedenen Medien und Substraten

Die Anreicherung methanogener Archaea aus einem Laborfermenter wurde mit verschiedenen Kulturmedien und Substraten durchgeführt. Nach mind. vierwöchiger Inkubation wurden die Kulturen in frisches Medium transferiert, eine längere Inkubation erfolgte sofern nach vier Wochen noch keinerlei Wachstum zu erkennen war. Ab dem zweiten Anreicherungszyklus wurden den Medien Antibiotika zugesetzt, um bakterielles Wachstum zu hemmen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Schemata der Anreicherungsansätze mit den verschiedenen Medien und Substraten.

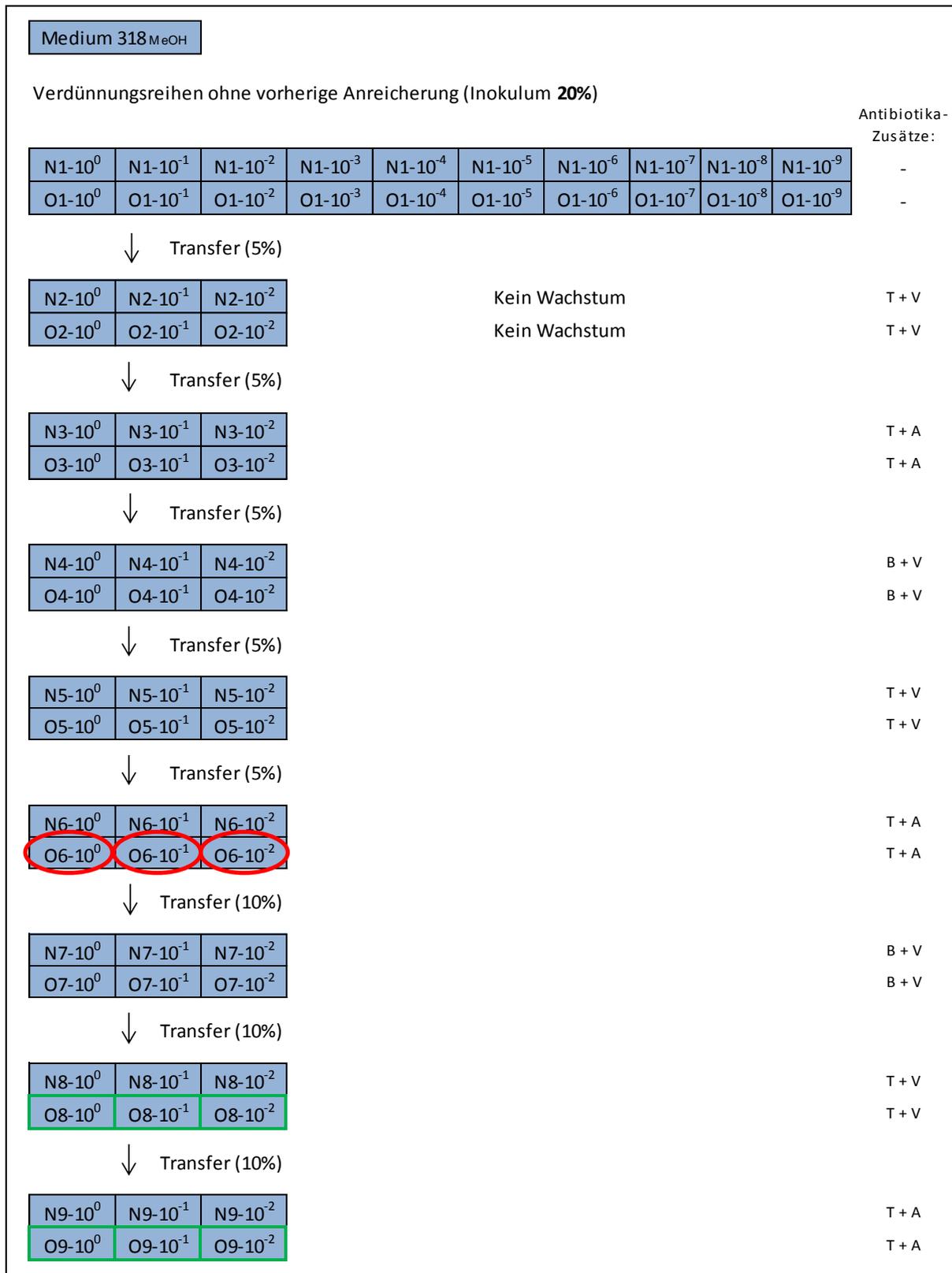


Abb. A1: Schema des Kultivierungsansatzes zur Anreicherung von Archaea in Verdünnungsreihen in DSMZ Medium 318 mit Methanol. T + V: Tetracyclin + Vancomycin; T + A: Tetracyclin + Ampicillin; B + V: Bacitracin + Vancomycin. Rot umkreist sind die Kulturen, die mittels der TRFLP-Methode molekularbiologisch untersucht wurden. Grüne Markierung: Kulturen, die zusätzlich in Agarkulturen überführt wurden.

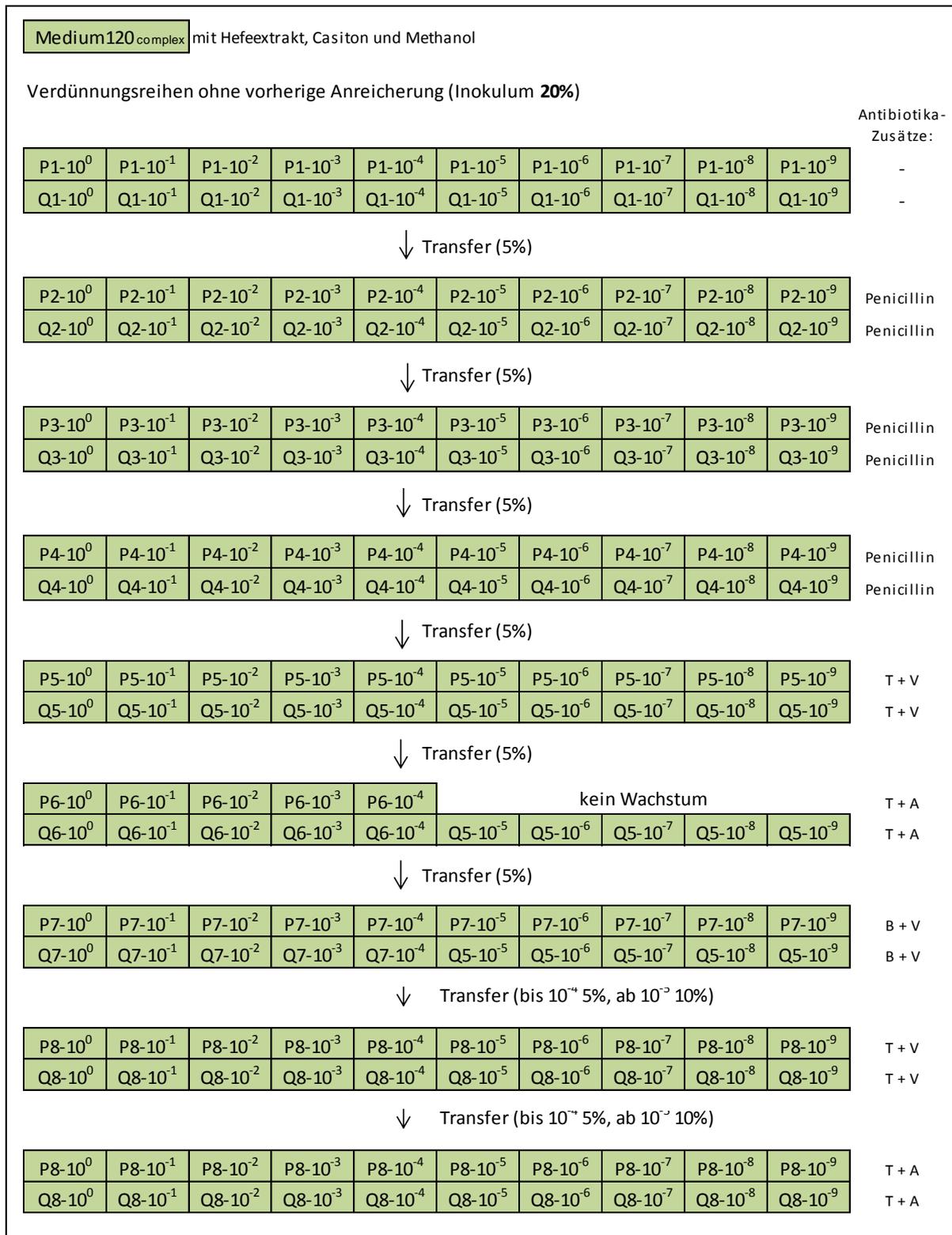


Abb. A2: Schema des Kultivierungsansatzes zur Anreicherung von Archaea in Verdünnungsreihen in DSMZ Medium 120 mit komplexem Substrat. T + V: Tetracyclin + Vancomycin; T + A: Tetracyclin + Ampicillin; B + V: Bacitracin + Vancomycin.

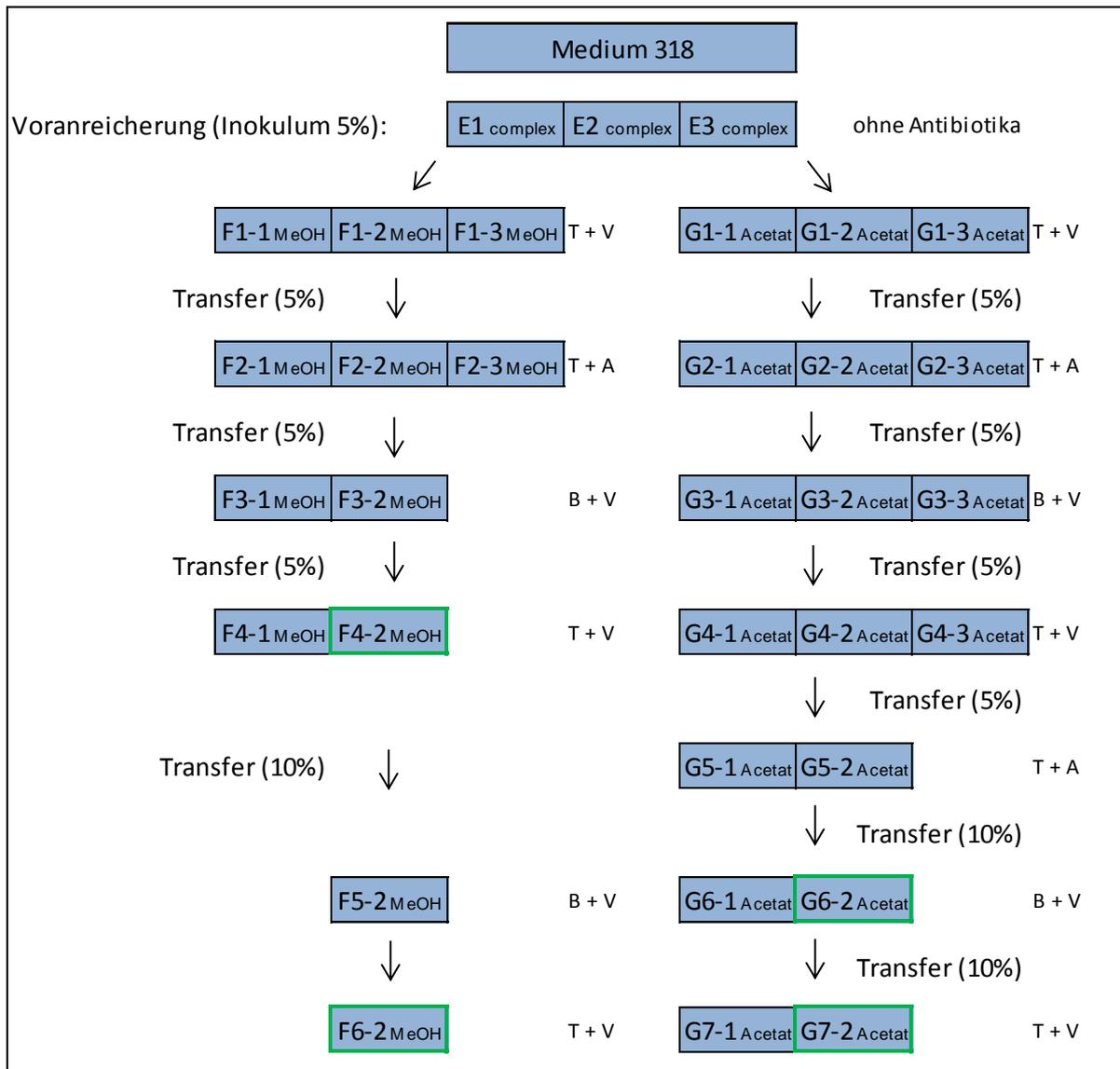


Abb. A3: Schema des Kultivierungsansatzes zur Anreicherung von Archaea in DSMZ Medium 318 mit Acetat und Methanol. Eine Vorinkubation erfolgte mit komplexem Substrat (Zugabe von Reaktorflüssigkeit, Ansätze E1 - E3) mit anschließender Überführung in Medium mit definiertem Substrat (Ansätze F und G). T + V: Tetracyclin + Vancomycin; T + A: Tetracyclin + Ampicillin; B + V: Bacitracin + Vancomycin. Grüne Markierung: Kulturen, die zusätzlich in Agarkulturen überführt wurden.

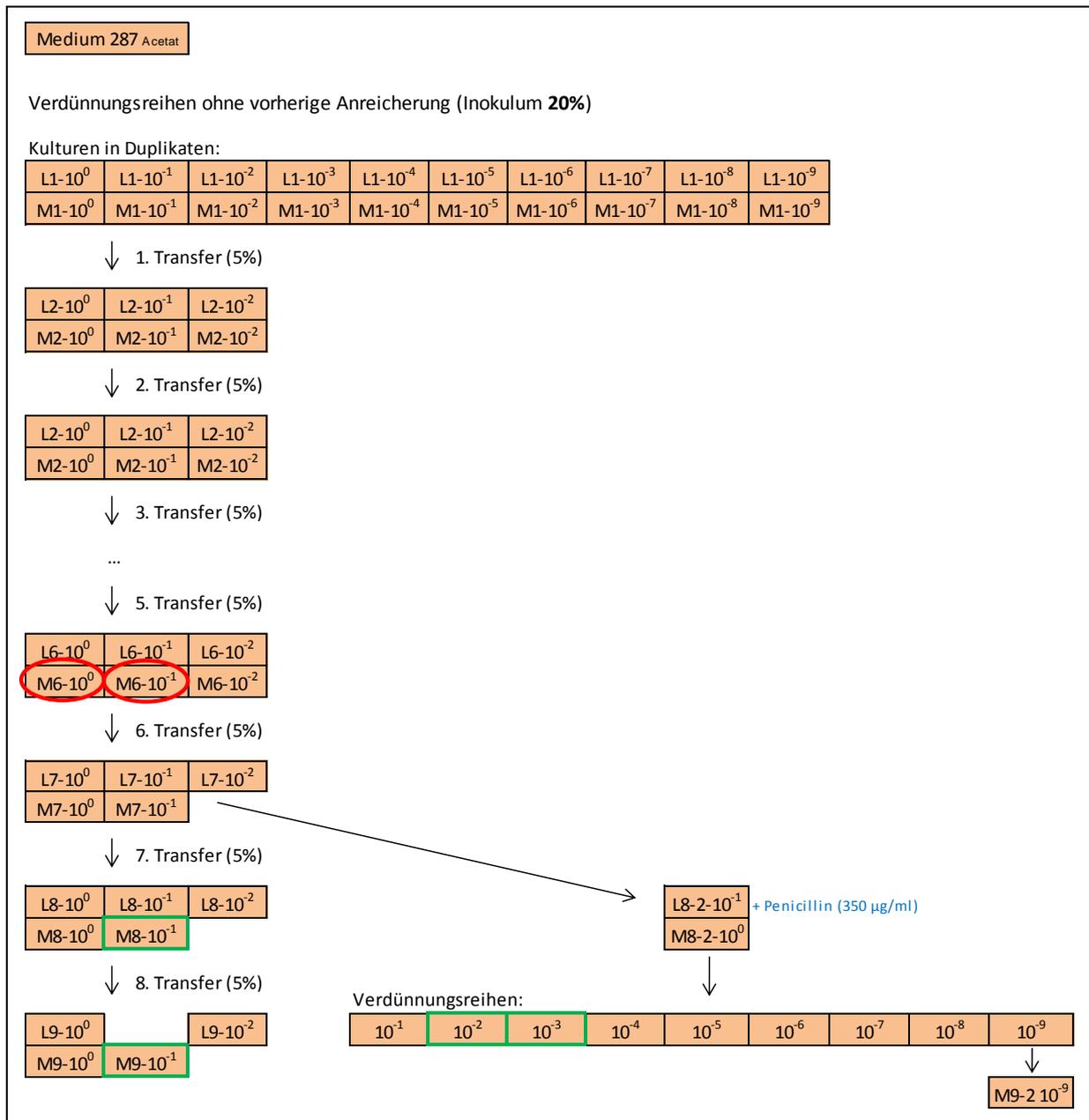


Abb. A4: Schema des Kultivierungsansatzes zur Anreicherung von Archaea in Verdünnungsreihen in DSMZ Medium 287 mit Acetat und H₂/CO₂. Grüne Markierung: Kulturen, die zusätzlich in Agarkulturen überführt wurden. Rot umkreist sind die Kulturen, die mittels der TRFLP-Methode molekularbiologisch untersucht wurden.

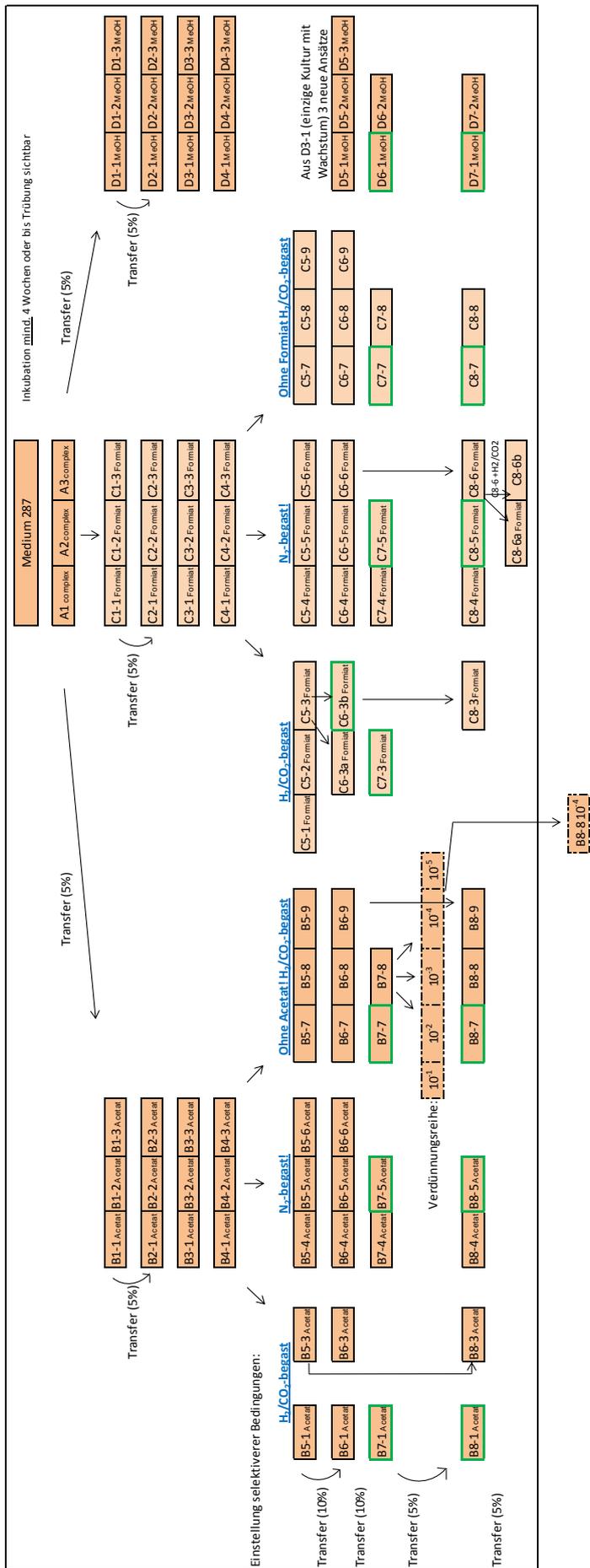


Abb. A5: Schema der Anreicherung von Archaea in DSMZ Medium 287 mit Acetat, Formiat und Methanol. Eine Vorinkubation erfolgte mit komplexem Substrat (Zugabe von Reaktorflüssigkeit, Ansätze A1 - A3) mit anschließender Überführung in Medium mit definiertem Substrat (Ansätze B - D). Alle Kulturen wurden zunächst mit H₂/CO₂ begast. Nach einigen Inkubationszyklen wurden die Bedingungen selektiver eingestellt (blaue Beschriftung), so dass nur noch H₂/CO₂ in der Gasphase oder eines der anderen Substrate im Medium verfügbar war. Grüne Markierung: Kulturen, die zusätzlich in Agarkulturen überführt wurden.

Anhang 2

TRFLP-Profile ausgewählter Anreicherungskulturen

Die mikrobielle Gemeinschaft einzelner Anreicherungen wurde mittels der auf der 16S rRNA Gensequenz basierenden, kultivierungs-unabhängigen TRFLP-Methode (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) analysiert. Die folgende Abbildung zeigt die Archaea- sowie Bacteria-Diversität in einzelnen Anreicherungskulturen.

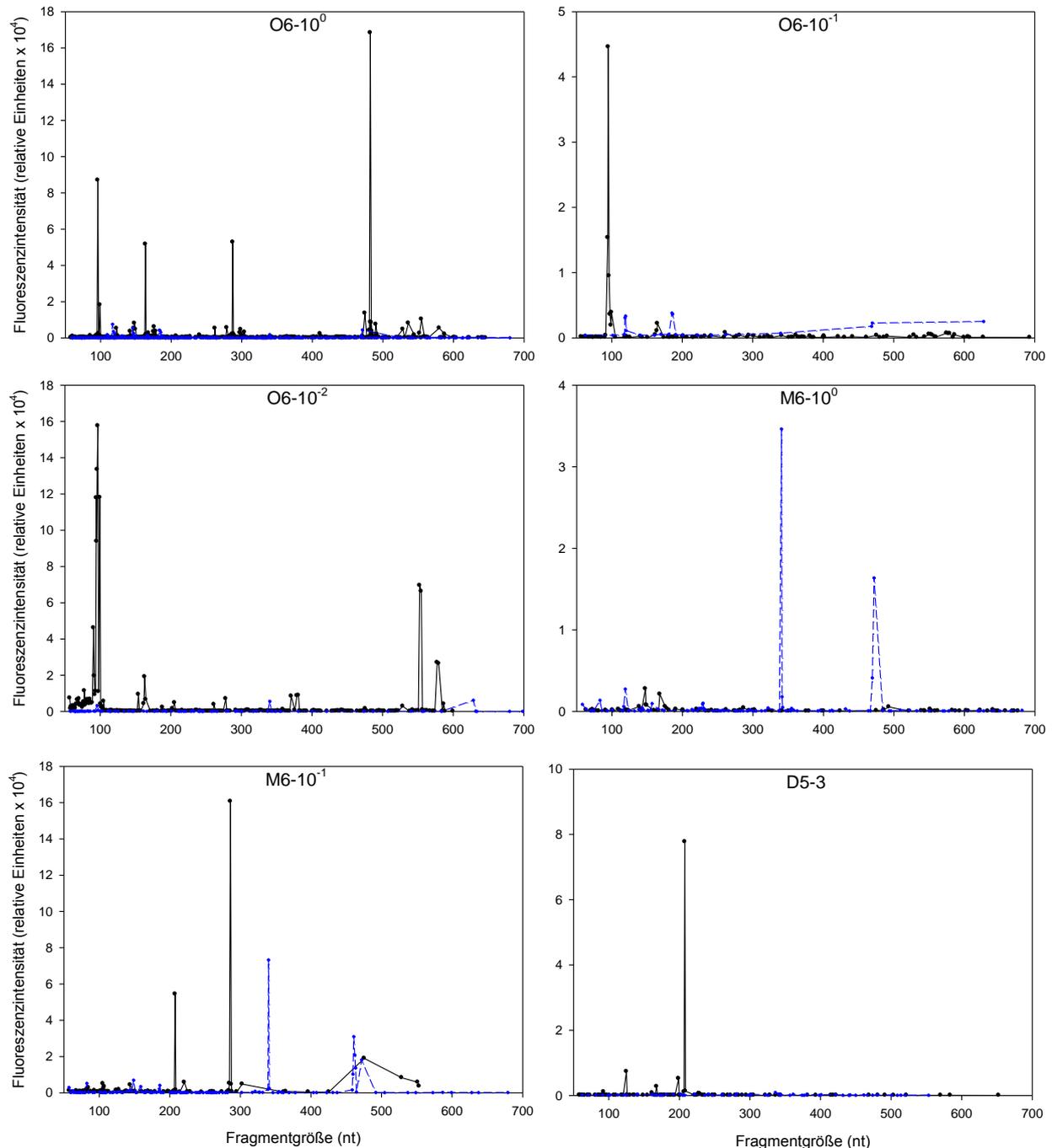


Abb. A6: TRFLP-Profile verschiedener Anreicherungskulturen. Die Verdünnungskulturen O6-10⁰ bis 10⁻² wurden in DSM Medium 318 mit Methanol inkubiert, die Kulturen M6-10⁰ und 10⁻¹ in DSMZ Medium 287 mit Acetat und H₂/CO₂ und die Kultur D5-3 in DSM Medium 287 mit Methanol und H₂/CO₂. Schwarz: Bacteria-DNA-Fragmente; blau: Archaea-DNA-Fragmente. Die DNA-Fragmentlängen in Nukleotiden (nt) sind gegen die Fluoreszenzintensitäten aufgetragen, die ein Maß für die Häufigkeit der Fragmente sind. Für die Analysen der verschiedenen Kulturen wurden jeweils identische Mengen an PCR-Produkten eingesetzt.