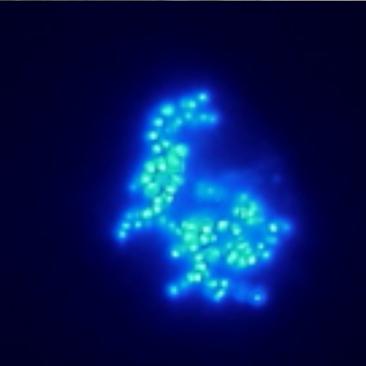
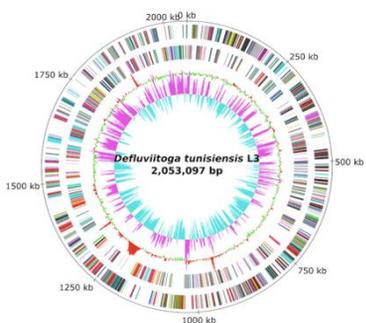
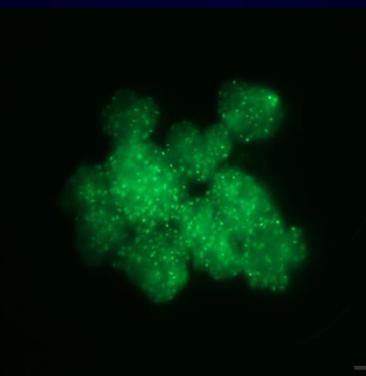




## Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen



## Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen

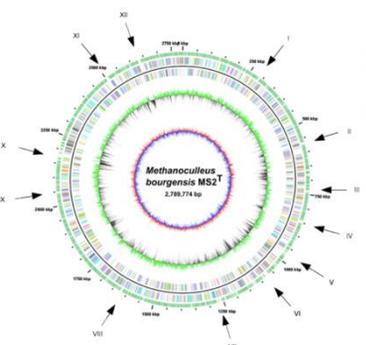


Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



**Bornimer Agrartechnische Berichte**

Heft 92

Potsdam-Bornim 2017

---

# **Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen**

**Genom-Sequenzierung von Isolaten  
aus Biogasanlagen und  
Mapping von Metagenom-Datensätzen**

**Schlussbericht zum Forschungsverbund  
BIOGAS-CORE**

---

**Bornimer Agrartechnische Berichte  
Heft 92**

Potsdam-Bornim 2017

**Herausgeber:**

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)  
*Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB)*  
Max-Eyth-Allee 100  
14469 Potsdam  
☎ (0331)-5699-0  
Fax.: (0331)-5699-849  
E-mail: atb@atb-potsdam.de  
Internet: <http://www.atb-potsdam.de>

April 2017

**Redaktion:**

Dr. Michael Klocke

**Layout:**

Andrea Gabbert

**Quellennachweis der Umschlagfotos**

(von oben nach unten)

- (1) Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie
- (2) Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Labor für Angewandte Mikrobiologie
- (3) Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
- (4) Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V., Abt. Bioverfahrenstechnik
- (5) Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie
- (6) Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie

Herausgegeben vom Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB).

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Eine Weiterveröffentlichung von Teilen ist unter Quellenangabe und mit Zustimmung des Leibniz-Instituts für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. möglich.

ISSN 0947-7314

# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema:

**Verbundvorhaben: Etablierung eines core-Mikrobioms für Biogasanlagen - Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen**

**Teilvorhaben 1: Stickstoff-Umsetzer und MALDI-TOF MS Analytik**

**Teilvorhaben 2: Genomsequenzierung und CORE-Datenbank**

**Teilvorhaben 3: Acido- und acetogene Bakterien**

**Teilvorhaben 4: Methanogene Archaeen**

**Teilvorhaben 5: Hydrolytische Bakterien**

Zuwendungsempfänger:

**Teilvorhaben 1: Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.**

**Teilvorhaben 2: Universität Bielefeld**

**Teilvorhaben 3: Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Teilvorhaben 4: Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**

**Teilvorhaben 5: Technische Universität München**

Förderkennzeichen:

**22017111, 22006712, 22006812,  
22006912, 22007012**

Laufzeit:

**01.08.2012 bis 30.09.2015**

Gefördert durch:



**Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft**

Monat der Erstellung:

**12/2015**

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Dr. Sarah Hahnke, Dipl.-Biol. Thomas Langer, **Dr. Michael Klocke** (Koordinator)

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.

Abt. Bioverfahrenstechnik

Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam

Tel.: 0331/5699-113, Fax: 0331/5699-849

Email: mklocke@atb-potsdam.de

Dr. Irena Maus, **Dr. Andreas Schlüter**, Prof. Dr. Alfred Pühler

Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie

Institut für Genomforschung und Systembiologie

Genomforschung Industrieller Mikroorganismen

Universitätsstr. 27, 33615 Bielefeld

Tel.: 0521/106-8757

Email: aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de

Dr. Katharina Gabriela Cibis, **Prof. Dr. Helmut König**

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

Becherweg 15, 55128 Mainz

Tel.: 06131/39-24634, Fax: 06131/39-22695

Email: hkoenig@uni-mainz.de

Dr. Yong-Sung Kim, Dr. Sandra Off, **Prof. Dr. Paul Scherer**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences / FSP Biomassennutzung Hamburg

Lohbruegger Kirchstraße 65, 21033 Hamburg-Bergedorf

Tel.: 040/42875-6355 oder -6351, Fax : 040/42875-6359

Email: paul.scherer@haw-hamburg.de

Dr. Daniela Köck, Dr. Wolfgang H. Schwarz, **Prof. Dr. Wolfgang Liebl**

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising-Weihenstephan

Tel.: 08161/71-5450, Fax: 08161/71-5475

Email: wliebl@wzw.tum.de

## Inhalt

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
Schlussbericht zu Teilvorhaben 1: Stickstoff-Umsetzer und MALDI-TOF MS Analytik.....	23
Schlussbericht zu Teilvorhaben 2: Genomsequenzierung und CORE-Datenbank .....	91
Schlussbericht zu Teilvorhaben 3: Acido- und acetogene Bakterien .....	169
Schlussbericht zu Teilvorhaben 4: Methanogene Archaeen .....	249
Schlussbericht zu Teilvorhaben 5: Hydrolytische Bakterien.....	335

## Zusammenfassung

### 1 Ziele

Die Gewinnung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen und landwirtschaftlichen Reststoffen ist wesentlicher Baustein einer nachhaltigen und CO<sub>2</sub>-neutralen Energieerzeugung. Der anaerobe Abbau von Biomasse zu Biogas erfolgt durch eine komplexe und dynamische Lebensgemeinschaft bestehend aus einer Vielzahl von Bakterien und Archaeen. Zur Aufklärung der mikrobiologischen Strukturen und funktionellen Zusammenhänge gewinnen Hochdurchsatztechnologien zur DNA-Analyse zunehmend an Bedeutung. Grundlegend hierfür ist der Aufbau einer Referenzdatensammlung für das Kern- („core“) Mikrobiom von exemplarischen Biogasanlagen. Im Rahmen von fünf Teilvorhaben sollten dazu folgende Teilziele erreicht werden:

- (1) Gewinnung von Isolaten für cellulolytische, acidogene, acetogene und stickstoffumsetzende Bakterien sowie für methanogene *Archaea* unter Etablierung neuartiger Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren,
- (2) Sequenzierung und bioinformatische Auswertung der Genome der Isolate ausgewählter, insbesondere neuartiger mikrobieller Arten,
- (3) ergänzende Erhebung, Analyse und Interpretation des mikrobiellen Metagenoms von ausgewählten Biogasreaktoren und Abgleich mit bereits vorhandenen Metagenomdaten und den erzeugten Isolaten.

### 2 Partner

An dem Verbundvorhaben waren folgende Partner beteiligt:

- Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB), Abt. Bioverfahrenstechnik  
Teilvorhaben 1 - Stickstoff-Umsetzer und MALDI-TOF MS Analytik  
Kontakt: Dr. Michael Klocke (mklocke@atb-potsdam.de)
- Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)  
Teilvorhaben 2 - Genom-Sequenzierung bisher unbekannter Spezies aus Fermentationsproben ausgewählter Biogasanlagen  
Kontakt: Dr. Andreas Schlüter (aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de)
- Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung  
Teilvorhaben 3 - Acido- und acetogene Bakterien  
Kontakt: Prof. Dr. Helmut König (hkoenig@uni-mainz.de)
- Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences  
Teilvorhaben 4 - Methanogene Archaeen  
Kontakt: Prof. Dr. Paul Scherer (paul.scherer@haw-hamburg.de)
- Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie  
Teilvorhaben 5 - Hydrolytische Bakterien  
Kontakt: Prof. Dr. Wolfgang Liebl (wliebl@wzw.tum.de)

Die MALDI-TOF MS Analysen zur Identifizierung von Isolaten wurden im Unterauftrag von der RIPAC-LABOR GmbH Potsdam durchgeführt.

### 3 Untersuchte landwirtschaftliche Biogasanlagen und Laborfermenter

Im Rahmen dieses Vorhabens erfolgten Probennahmen aus insgesamt 16 mesophilen und thermophilen landwirtschaftlichen Biogasanlagen sowie aus sechs unterschiedlichen Modellfermentern im Labormaßstab (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Im Rahmen dieser Studie beprobte landwirtschaftliche Biogasanlagen und Laborfermenter. Die Probennahme erfolgte sofern nicht anders angegeben aus den Hauptfermentern der jeweiligen Anlage.

Nr. Interne Bezeichnung	Standort	Koordinaten	Betriebs-temperatur	Gärsubstrate	Anlagentyp	Raumbelastung	Bearbeitet durch <sup>1</sup>
<i>Praxisanlagen</i>							
1 ATB-1 (BGA 03)	Leer	53,248599° N 7,515641° E	40 °C	Mais-, Roggen-, Grassilage, Ferkelmist, Rindergülle	Nassfermentation, Plugflow	13 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	TUM
2 ATB-2 (BGA 07)	Hille	52,355196° N 8,731620° E	40 °C	Maissilage, Grünroggen, Rinder- und Schweinegülle	Nassfermentation, Rührkesselreaktor	5 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	TUM
3 TUM-1 (18/E)	Windorf-Rathsmannsdorf	48,670414° N 13,250140° E	43 °C	Mais-, Grassilage	k. A. <sup>2</sup>	k. A.	TUM
4 TUM-3 (Eggertshofen)	Freising	48,362185° N 11,716570° E	38 °C	Mais-, Grassilage	Nassfermentation, Rührkesselreaktor	k. A.	TUM
5 JGU-1 (Bioenergie Glahn)	Zweibrücken	49,285734° N 7,380477° E	43 / 53 °C	Mais-, Grassilage Schweinegülle	Nassfermentation, Rührkesselreaktor	k. A.	TUM, JGU
6 JGU-2 (Obere Blies)	Oberthal	49,508641° N 7,060937° E	40 °C	Mais-, Grassilage, Rindergülle	Nassfermentation, Rührkesselreaktor	k. A.	TUM, JGU
7 JGU-3 (Wagner)	Steinweiler	49,105083° N 8,134044° E	45 / 46 °C	Maissilage	Nassfermentation, Rührkesselreaktor	k. A.	TUM, JGU
8 JGU-4	Kaschenbach	49,87839° N 6,482587° E	40 °C	Mais-, Grassilage, Rindergülle	Nassfermentation, NOVA-Fermenter	8,0 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	TUM, JGU, HAW, ATB
9 HAW-1 (Butschen)	Viersen	51,225648° N 6,328076° E	54 °C	Maissilage, Gerste, Rindermist, Schweinegülle	Rührkesselreaktor	k. A.	TUM, HAW
10 HAW-2 (Beta-Biomethan)	Schuby	54,525559° N 9,461097° E	40 °C	Zuckerrübensilage	Rührkesselreaktor	15,5 t d <sup>-1</sup> in 800 m <sup>3</sup> Fermenter	TUM, HAW
11 HAW-3 (Agrarferm Technologies)	Hohenwart	48,597670° N 11,381838° E	42 °C	Gras-, Maissilage	Rührkesselreaktor	3 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	HAW
12 HAW-5 (Biowerk)	Hamburg	53,584989° N 9,909038° E	41 °C	Speisereste	Nassfermentation, stehender Rührreaktor	k. A.	HAW
13 HAW-6 (Bützberg)	Tangstedt	53,724706° N 10,102454° E	37 °C	Grüne kommunale Bioabfälle	Trockenfermentation, Garagenform	3,5 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	HAW
14 HAW-7 (Agrartech Italia, Schutzname Dario)	Nord-Italien	k. A.	47 °C	Maissilage, Getreide	Trockenfermentation, liegender Rührreaktor	3,5 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	HAW
15 HAW-8 (Agrartech Italia, Schutzname Ernesto)	Nord-Italien	k. A.	41 °C	Maissilage, Getreide	Trockenfermentation, liegender Rührreaktor	20 t d <sup>-1</sup> in 1.700 m <sup>3</sup> Fermenter	HAW
16 HAW-9 (Hocke)	Benz	53,918825° N 11,582895° E	40 °C	Mais-, Grassilage, Rindergülle	Nassfermentation, stehender Rührreaktor	3,0 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> , batchweise	ATB
<i>Laborfermenter</i>							
17 ATB-3	Potsdam-Bornim	52,438566° N 13,013446° E	37 °C	Maissilage, Weizenstroh	Nassfermentation, zweistufiges Aufstrom-Verfahren	3,0 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	ATB
18 ATB-4	Potsdam-Bornim	52,438566° N 13,013446° E	37 °C	Maissilage, Rinder-, Schweinegülle	Nassfermentation, einstufiger Rührkessel-Reaktor	8,5 kg <sub>TS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	ATB
19 ATB-5	Potsdam-Bornim	52,438566° N 13,013446° E	37 °C	Maissilage, Rinder-, Schweinegülle	Nassfermentation, einstufiger Rührkessel-Reaktor	k. A.	JGU
20 UHoH-50bar	Stuttgart-Hohenheim	48,712138° N 9,204532° E	38 °C	Maissilage	Hochdruck-Batch-Fermenter	k. A.	JGU
21 UHoH-100bar	Stuttgart-Hohenheim	48,712138° N 9,204532° E	38 °C	Maissilage	Hochdruck-Batch-Fermenter	k. A.	JGU
22 TUM-4 (BM2T)	Freising	48,362185° N 11,716570° E	55 °C	Grassilage, Rindergülle	einstufiger Rührkessel-Reaktor	k. A.	TUM

<sup>1</sup> TUM, Technische Universität München; JGU, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; HAW, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg; ATB, Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie; UHoH, Universität Hohenheim

<sup>2</sup> keine Angaben

Neben der Betriebstemperatur war weiteres Auswahlkriterium die Art des überwiegend eingesetzten Gärsubstrats. Neben Anlagen, welche Mais als hauptsächliches Gärsubstrat verwendeten, wurden ebenfalls Anlagen, die Grassilage oder andere pflanzliche Gärgüter bis hin zu Landschaftspflegegut und Haushaltsbioabfällen für die Biomethanisierung einsetzten, beprobt. Als Wirtschaftsdünger wurden von den beprobten Anlagen Rinder- und/oder Schweinegülle bzw. -festmist verwendet. Ebenfalls untersucht wurden Anlagen, die die Biomethanisierung ohne Verwendung von tierischen Exkrementen durchführten.

#### 4 Isolate aus Biogasreaktoren mit Wachstum bei mesophilen Temperaturen

Zur Isolierung mesophiler *Bacteria* und *Archaea* mit Wachstum bei Temperaturen unter  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  wurden über elf verschiedene Kultivierungsverfahren mit unterschiedlichen Modifikationen angewandt. Eine Übersicht über die jeweils angewandten Verfahren kann den Schlussberichten der jeweiligen Teilprojekte entnommen werden. Entsprechende Zusammenfassungen finden sich bei CIBIS *et al.* [2016] und MAUS *et al.* [2016a]. Artsspezifische Kultivierungsbedingungen wurden in den jeweiligen Fachartikeln im Detail beschrieben.

Für *Bacteria* wurden Isolate für insgesamt 78 Arten von zwölf Klassen entwickelt (**Tabelle 2**). Alleine für die Familien *Clostridiaceae* und *Bacillaceae* konnten Vertreter von jeweils zwölf bzw. elf Arten isoliert werden. Es wurden sowohl Vertreter für hydrolytisch/cellulolytisch aktive Bakterienarten als auch acido-/acetogene Spezies kultiviert. Beispiele hierfür sind die erstmals in dieser Studie beschriebenen Arten *Petrimonas mucosa*, *Fermentimonas caenicola* und *Proteiniphilum saccharofermentans* [HAHNKE *et al.* 2016]. Für mehrere Arten konnten zudem unterschiedliche Isolate mit von einander abweichenden 16S rRNA Gensequenzen kultiviert werden (**Tabelle 2**).

Für die Domäne *Archaea* wurden Vertreter von acht Arten aus zwei Klassen kultiviert (**Tabelle 2**). Die Stammsammlung umfasste sowohl Methanogene mit hydrogenotrophem Stoffwechsel (*Methanobacterium* spp., *Methanoculleus* spp., *Methanospirillum* sp.) als auch Spezies mit mixotropher Methanogenese (*Methanosarcina* spp.).

#### 5 Isolate aus Biogasreaktoren mit Wachstum bei thermophilen Temperaturen

In Ergänzung zu den unter 1.4 genannten Kultivierungsstrategien wurden vergleichbare Verfahren auch zur Gewinnung von thermophilen Mikroorganismen angewandt (Übersicht siehe MAUS *et al.* [2016a]). Die Isolierung dieser Mikroorganismen erfolgte überwiegend aus einem Biogasfermenter mit thermophiler Prozesstemperatur ( $54^{\circ}\text{C}$ )

Für die Domänen *Bacteria* und *Archaea* wurden Isolate für 32 mikrobielle Arten der Klassen *Clostridia*, *Bacilli*, *Thermotogae*, *Methanomicrobia* und *Methanobacteria* er-

zeugt (**Tabelle 3**). Auch hier konnte für eine Reihe von Arten genetisch bzw. physiologisch unterschiedliche Isolate kultiviert werden.

Die bioinformatische Auswertung der molekularen Struktur der Isolate führte zu der Hypothese, dass neben den bekannten Arten *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium* auch die bislang nicht beachtete Art *Defluviitoga tunisiensis* an der Hydrolyse von Hemicellulose und der Produktion von Ethanol, Acetat und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> beteiligt ist. Für thermophile methanbildende *Archaea* wurden hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Methanothermobacter* und *Methanoculleus* isoliert. Diese Mikroorganismen bilden Methan ausschließlich mittels hydrogenotropher Methanogenese auf Basis von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 2:** Isolate aus Biogasreaktoren mit Wachstum bei Temperaturen  $\leq 40^\circ\text{C}$  (Literaturangaben s. Kap. I.8).

Domäne	Klasse	Familie	Art	GenBank Nummer	Stammbezeichnung	Genomsequenz (EMBL-EBI <sup>2</sup> Nr.)	16S rRNA Sequenz (NCBI GenBank Nr.)	16S rRNA Übereinstimmung <sup>3</sup>	Biogasfermentier <sup>4</sup>	Wachstumstemperatur (°C)	Stoffwechsel <sup>5</sup>	Stamm hinterlegt bei Stammsammlung <sup>6</sup>				Referenz			
												DSMZ	CECT	LMG	KCTC				
												Isoliert durch							
<b>Archaea</b>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium congolense</i>	AF276858	Buetzberg <sup>7</sup>	LT607756 - 7	KX619410	99,8 %	HAW-6	37	n. b. <sup>8</sup>	-	-	-	-	HAW	Maus et al., eingereicht		
				AF169245	Blower <sub>L1-2</sub>	-	KX619408	99,7 %	HAW-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	HAW	Torres et al., eingereicht	
					Mb1	HG425166	KX344121	99,9 %	ATB-4	37	M	-	-	-	-	-	-	ATB	Maus et al., 2013, eingereicht.
							JN205052	98,9 %	JGU-2	40	M	DSM 28100	-	-	-	-	-	JGU	Stantschew et al., 2014, eingereicht
					Mb9	ERS549551	JN205060	98,8 %	JGU-4	40	M	-	-	-	-	-	-	JGU	Torres et al., eingereicht
								100,0 %	HAW-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	-	HAW	Maus et al., eingereicht
								99,5 %	ATB-4	37	M	DSM 10019	-	-	-	-	-	ATB	Maus et al., eingereicht
								99,8 %	HAW-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	-	HAW	-
								100,0 %	ATB-4	37	n. b.	-	-	-	-	-	-	ATB	-
								98,9 %	HAW-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	-	HAW	-
<b>Bacteria</b>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces cardiflensis</i>	AJ421779	ING2-E5C	-	KX826957	92,5 %	ATB-5	37	n. b.	-	-	-	ATB	-			
				AB007419	M2/5a	-	KX826976	97,0 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	ATB	-		
				AE017333	L2C	-	KT351634	99,9 %	HAW-1	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	Maus et al., 2016a	
				L27478	37hoer/2	-	KT351632	99,7 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	TUM	Maus et al., 2016a	
				AE016877	GlucSH52	-	KT274744	99,4 %	HAW-1	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	Cibis et al., 2016	
				AY724690	M2/36	-	KX826984	100,0 %	UHoH-50bar	39	A	-	-	-	-	-	JGU	-	
				AB271752	M1/42	-	KX826971	99,9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				U20385	M1A	-	KT351636	99,6 %	HAW-1	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	Maus et al., 2016a	
				EU194897	E2C	-	KX826963	99,9 %	HAW-1	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	Maus et al., 2016a	
				X82492	M1/11	-	KX826966	99,9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
<b>Bacteria</b>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	AY876289	M1/2	-	KX826980	99,9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-			
				AF071856	GlucSH101	-	KT274745	99,6 %	UHoH-100bar	39	A	-	-	-	-	JGU	Cibis et al., 2016		
				U49079	M1/20	-	KX826965	99,0 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	ATB	-		
				AJ306612	Isol1/37	-	KX826970	99,7 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	TUM	-	
				AJ420805	M1/41	-	KT274743	99,7 %	UHoH-50bar	39	A	-	-	-	-	-	JGU	Cibis et al., 2016	
				CP003504	GlucSH51	-	KX826972	99,7 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				EF197994	M1/46	-	KX826983	99,9 %	ATB-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				D16552	ING2-D1F	-	KX826953	99,7 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	TUM	-	
				AB326354	Isol9/1	-	KX826967	99,9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				AY167814	Isol5/45	-	KX826985	99,8 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	TUM	-	
<b>Bacteria</b>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus wamleri</i>	L37603	M3/1	-	KX826985	99,8 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-			
				EF364097	M2/35	-	KX826983	100,0 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	-	ATB	-		
				AF429763	M2/8	-	KX826978	99,9 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	ATB	-		
				DQ232532	Isol6/1	-	KX826978	98,9 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	-	TUM	-	
				DS264555	ING2-D5A	-	KX826954	99,9 %	ATB-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				KP233810	ING2-E1D	-	KX826956	99,6 %	ATB-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	-	
				KP233808	ING2-E5B	LN515532	KP233810	100,0 %	ATB-5	37	n. b.	-	-	-	-	-	ATB	Hahnke et al., 2016, 2016,	
				KP233808	ING2-E5A	ERS1319466	KP233808	100,0 %	ATB-5	37 ( $\leq 50$ )	H, A	DSM 28696	8609	28429	-	-	ATB	Maus et al., eingereicht	
				KP233809	M3/6	LT605205	KP233809	100,0 %	ATB-3	37	H, A	DSM 28695	8611	-	-	-	ATB	Hahnke et al., 2016, eingereicht	
								100,0 %	ATB-3	37	H, A	DSM 28694	8610	28239	-	-	ATB	Maus et al., eingereicht	

Tabelle 2 (Forts.)

Isolate aus Biogasfermentern (Wachstumstemperatur ≤ 40 °C)																	
Domäne	Klasse	Familie	Art	GenBank Nummer	Stammbezeichnung	Genomsequenz (EMBL-EBI <sup>1</sup> Nr.)	16S rRNA GenBank Nr.)	16S rRNA Übereinstimmung <sup>3</sup>	Biogasfermentier <sup>4</sup>	Wachstumstemperatur (°C)	Stoffwechsel <sup>5</sup>	Stamm hinterlegt bei Stammsammlung <sup>6</sup>			Referenz		
												DSMZ	CECT	LMG		KCTC	KCTC
Clostridia	Clostridiaceae	Clostridiaceae	<i>Clostridium bommense</i>	JQ388596	M2/40	HG917868-9	JQ388596	100,0 %	ATB-3	35	A	DSM 25664	CECT 8097	KCTC 15508	Hahnke et al. 2014a, b, Tomazetto et al. 2016, Maus et al. eingereicht		
			<i>Clostridium butyricum</i>	AJ458420	Iso12/2	-	-	99,4 %	TUM-3	37	n. b.	-	-	-	-	TUM	-
			<i>Clostridium thetaiotaomicum</i>	X71850	M2/26	KX826982	98,1 %	ATB-3	37	n. b.	ATB	-	-	-	-	ATB	-
			<i>Clostridium cochlearium</i>	M59093	ASG1_4B	KT274730	99,9 %	JGU-1	39	A	JGU	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Clostridium kluyveri</i>	DG911271	SG1_4	KT274739	99,8 %	JGU-1	39	A	JGU	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Clostridium oryzae</i>	AB904755	Iso4/1	-	99,9 %	TUM-3	37	n. b.	TUM	37	n. b.	-	-	TUM	-
			<i>Clostridium perfringens</i>	CP000246	M1/36	KX826968	99,9 %	ATB-3	37	n. b.	ATB	37	n. b.	-	-	ATB	-
			<i>Clostridium putrefaciens</i>	Y18177	N3C	FMJL01000001 - FMJL01000109	94,3 %	HAW-1	37	n. b.	HAW-1	37	n. b.	DSM 10006	-	ATB	Maus et al. eingereicht
			<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	CP06721	N1F	KT351631	94,2 %	HAW-1	37	n. b.	HAW-1	37	n. b.	-	-	ATB	Maus et al. 2016a
			<i>Clostridium sporogenes</i>	X68189	Iso11/1	-	99,4 %	TUM-3	37	n. b.	TUM-3	37	n. b.	-	-	TUM	-
			<i>Clostridium subterminale</i>	AB294137	ING2-D1E	KX826952	100,0 %	ATB-5	37	n. b.	ATB	37	n. b.	-	-	ATB	-
			<i>Proteinilasticum ruminis</i>	DC852338	Iso4/37	-	99,7 %	TUM-3	37	n. b.	TUM-3	37	n. b.	-	-	TUM	-
			<i>Clostridium aminovalericum</i>	X73436	LG2_3	KT274719	99,3 %	JGU-2	39	n. b.	JGU-2	39	n. b.	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Clostridium amygdalinum</i>	AY353957	ING2-E1K	KX826959	97,1 %	ATB-5	37	n. b.	ATB-5	37	n. b.	DSM 28740	-	ATB	-
			<i>Clostridium celerecrescens</i>	X71848	Iso4/2	-	98,4 %	TUM-3	37	n. b.	TUM-3	37	n. b.	-	-	TUM	-
			<i>Clostridium herbivorans</i>	L34418	SG1_1	KT274738	99,6 %	JGU-1	39	n. b.	JGU-1	39	n. b.	DSMZ	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Clostridium lactifermentans</i>	AY033434	M3/9	LN868251	97,0 %	TUM-3	37	H, A	TUM-3	37	H, A	DSM 10033	-	TUM	-
			<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	U88891	EG2_4	KT274742	92,7 %	JGU-2	39	A	JGU-2	39	A	DSM 10005	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Clostridium bifermentans</i>	AY167952	ING2-E1C	KX826955	99,8 %	ATB-5	37	n. b.	ATB-5	37	n. b.	-	-	ATB	-
<i>Peptostreptococcus russelli</i>	X98011	ING2-D1D	KX826951	99,7 %	ATB-5	37	n. b.	ATB-5	37	n. b.	-	-	ATB	-			
<i>Anaeroridium agile</i>	X66002	37hoel5	-	98,9 %	TUM-3	37	n. b.	TUM-3	37	n. b.	-	-	TUM	-			
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	X66002	ASG2_3	KT274731	98,7 %	JGU-2 / JGU-3	39	A	JGU-2 / JGU-3	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016			
Tissierella	Tissierellaceae	Tissierellaceae	<i>Thermoanaerobacter tepidanaerobacter syntrophicus</i>	AY353956	ASW3.2, ASW3.3, ASW3.5, M3/3	FMDO01000001 - FMDO01000062	-	96,0 %	JGU-2	40	A	DSM 10306	-	JGU	Maus et al. eingereicht		
			<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	EF116488	B42-13	KT351641	95,9 %	HAW-1	37	A	37	A	-	-	ATB	-	
			<i>Soehngenia saccharolytica</i>	FR749955	LakSH53A	KT274726	99,1 %	Uhhoh-50bar	39	A	Uhhoh-50bar	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Trissierella creatinini</i>	AF542228	ASSH103	KT274737	97,3 %	Uhhoh-100bar	39	A	Uhhoh-100bar	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Peptoniphilus assacheroilyticus</i>	AF542228	ING2-D1G	LM997412	90,5 %	ATB-5	37	A	ATB-5	37	A	DSM 28672	-	ATB	Maus et al. Eingereicht, Tomazetto et al. 2014, eingereicht
			<i>Gaillcola barnesae</i>	AB038361	SG1_4B	KT274740	90,5 %	JGU-1	39	A	JGU-1	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Sporeanaerobacter acetigenes</i>	AF358114	LW3_3B	KT274725	99,1 %	JGU-3	39	n. b.	JGU-3	39	n. b.	-	-	JGU	Cibis et al. 2016
			<i>Peptoniphilus assacheroilyticus</i>	AF542228	XP2-13-3	KX826989	89,8 %	ATB-4	37	n. b.	ATB-4	37	n. b.	-	-	ATB	Maus et al. eingereicht
			<i>Peptoniphilus assacheroilyticus</i>	AF542228	XP2-13-3	KT351640	98,7 %	HAW-1	37	n. b.	HAW-1	37	n. b.	-	-	ATB	Maus et al. 2016a
			<i>Peptoniphilus assacheroilyticus</i>	AF542228	Iso2/45	-	98,9 %	TUM-3	37	n. b.	TUM-3	37	n. b.	-	-	TUM	-
			<i>Acholeplasma equifetale</i>	AY538165	BSPT-1-6	KX826991	92,1 %	ATB-4	37	n. b.	ATB-4	37	n. b.	-	-	ATB	-
			<i>Acholeplasma morum</i>	AY538168	ASSH51	KT274736	91,8 %	Uhhoh-50bar	39	A	Uhhoh-50bar	39	A	-	-	JGU	Cibis et al. 2016

Tabelle 2 (Forts.)

Domäne	Klasse	Familie	Art	GenBank Nummer	Stammbezeichnung (3 weitere Isolate: LW3.4, LW3.5, LW3.6)	Genomsequenz (EMBL-EBI Nr.)	16S rRNA GenBank Nr.)	16S rRNA Übereinstimmung <sup>3</sup>	Biogasfermenter <sup>4</sup>	Wachstumstemperatur (°C)	Stoffwechsel <sup>5</sup>	Stamm hinterlegt bei Stammsammlung <sup>6</sup>				Referenz
												DSMZ	CECT	LMG	KCTC	
Negativcultures	Selenomonadaceae	Selenomonadaceae	<i>Selenomonas bovis</i>	EF139191	GIW3.4	-	KTZ74741	97.0 %	JGU-3	39	A	-	-	-	JGU	Cibis <i>et al.</i> 2016
				AJ010982	LG2.4 (3 weitere Isolate: LW3.4, LW3.5, LW3.6)	-	KTZ74720 (KTZ74721-3)	95.7 %	JGU-2/ JGU-3	39	A	-	-	-	-	JGU
Spirochaeta	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Sphaerochaeta globosa</i>	AJ508928	2/2-37	CYSP01000001 - CYSP01000043	LN868253	91.9 %	TUM-3	37	H, A	DSM 10062	-	TUM	Koeck <i>et al.</i> 2016, Maus <i>et al.</i> eingereicht	
				CP002541	MSP8-1-8b	-	KX826987	92.9 %	ATB-4	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
Synergista	Synergistales	Synergistaceae	<i>Aminobacterium colombiense</i>	CP001997	MP17-1a	-	KX826988	99.9 %	ATB-4	37	n. b.	-	-	ATB	-	
				AF073521	PP17-6c	-	KX826990	99.6 %	ATB-4	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
Thermotogae	Thermotogales	Petrogaceae	<i>Deftuivittoga tunisiensis</i>	FR850164	L3 (8 weitere Isolate: L2, L5, AS22, AS30, ASV2, Succ20, Succ22, LW3.3)	LN824141	KTZ74705 (KTZ74707 - 12, KTZ74724)	99.9 %	HAW-1/ JGU-3	(54)/39	A	DSM 29926	-	JGU	Maus <i>et al.</i> 2015a, 2016a, b, eingereicht Cibis <i>et al.</i> 2016	
				AB567741	M1/6	-	KX826982	97.6 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
β-Proteobacteria	Alcaligenaceae	Alcaligenaceae	<i>Advenella faeciporci</i>	D14320	M2/14	-	KX826979	99.9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	ATB	-	
				AF233877	M2/15	-	KX826980	97.4 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
γ-Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter koseri</i>	KC010298	M2/5b	-	KX826977	99.0 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	ATB	-	
				AF025372	M2/25	-	KX826981	99.1 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
Moraxellaceae	Moraxellales	Moraxellaceae	<i>Shigella flexneri</i>	CU928158	M1/37	-	KX826989	99.6 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	ATB	-	
				DQ885256	M1/12	-	KX826964	99.9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas formosensis</i>	X81660	M2/2	-	KX826974	99.9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	ATB	-	
				AF509823	M2/4	-	KX826973	99.9 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	-	ATB	-
				JF432053	M1/5	-	KX826961	100.0 %	ATB-3	37	n. b.	-	-	ATB	-	

<sup>1</sup> National Center for Biotechnology Information<sup>2</sup> European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute<sup>3</sup> Übereinstimmung mit nächst verwandtem NCBI GenBank Eintrag<sup>4</sup> Details zu den beprobten Biogasfermentern siehe Tabelle 1<sup>5</sup> C, cellulolytisch; H, hydrolytisch; A, acetolytisch; M, methanogen (hydrogenotroph)<sup>6</sup> DSMZ: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig

CECT: Spanish Type Culture Collection, Valencia University, Valencia, Spain

LMG: BCWLMG Bacteria Collection, University of Gent, Gent, Belgium

KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea

ATB: Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB), Abt. Bioverfahrenstechnik, Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam; Ansprechpartner: Dr. M. Klocke

HAW: Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Ulmenliet 20, 21033 Hamburg; Ansprechpartner: Prof. Dr. Paul Scherer

JGU: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Becherweg 15, 55099 Mainz; Ansprechpartner: Prof. Dr. Helmut König

TUM: Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising-Weihenstephan; Ansprechpartner: Dr. Wolfgang H. Schwarz, Prof. Dr. Wolfgang Lieb

<sup>7</sup> zu > 95% angereichert<sup>8</sup> nicht experimentell bestimmt<sup>9</sup> keine Angabe, Anlage nicht im Beprobungsplan enthalten

**Tabelle 3: Isolate aus Biogasreaktoren mit Wachstum bei Temperaturen  $\geq 50^\circ\text{C}$  (Literaturangaben s. Kap. I.8).**

Isolate aus Biogasfermentern (Wachstumstemperatur $\geq 50^\circ\text{C}$ )																
Domäne	Klasse	Familie	Art	GenBank Nummer	Stammbezeichnung	Genomsequenz (EMBL-EBI <sup>7</sup> Nr.)	16S rRNA Gensequenz (NCBI GenBank Nr.)	16S rRNA Übereinstimmung <sup>3</sup>	Biogasfermenter <sup>4</sup>	Wachstumstemperatur (°C)	Stoffwechsel <sup>5</sup>	Stamm hinterlegt bei Stammsammlung <sup>6</sup>			Referenz	
												DSMZ	CECT	LMG		KCTC
Archaea	Methanobacteria	Methanobacteriaceae	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	CP001710	HAW-Vleisen	-	KU667127	99,7 %	HAW-1	53	M	-	-	-	HAW	Maus et al. 2016a
				NR_074260	HAW-Emesto <sup>7</sup>	-	-	100,0 %	HAW-5	53	n. b.	-	-	-	-	HAW
Methanomicrobia	Methanomicrobiaceae	Methanococcaceae	<i>Methanothermobacter wolfei</i>	AB104858	SIV6	ERS1319767	KT368944	100,0 %	HAW-1	54	M	-	-	-	JGU	Maus et al. 2016a, Maus et al.
				AB065297	VZ.1	-	KT368945	100,0 %	HAW-1	53	M	-	-	-	-	JGU
Bacteria	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	L27478	Neu19 1A1	CCRF01000001 - CCRF01000106	LN881587	99,5 % 99,3 %	HAW-1 k. A. <sup>3</sup>	55 50/7,55	H, A A	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				CP000557	J2B	-	-	100,0 %	HAW-1	50	n. b.	-	-	-	-	ATB
Bacteroidia	Bacteroidia	Porphyromonadaceae	<i>Petrimonas mucosa</i>	AY167814	Y4-6A	-	KT351639	99,1 %	HAW-1	50	n. b.	-	-	-	ATB	Maus et al. 2016a
				AB101584	AGA	-	KT351635	100,0 %	HAW-1	50	n. b.	-	-	-	-	ATB
Clostridia	Clostridiaceae	Clostridiaceae	<i>Clostridium isatidis</i>	X98395	MV1	-	LN881568	99,9 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				Y18177	RX1	-	LN881572	99,3 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	-	TUM
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	<i>Herbinix luporum</i>	LN626359	SD1D	LN879430	LN626359	96,4 %	HAW-1	55	C, A	-	-	-	TUM	Koeck et al. 2016a, d.
				M96655	L14	-	KT274713	99,5 %	HAW-1	54	A	-	-	-	-	JGU
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae	<i>Clostridium caenicola</i>	AB221372	Neu21	-	LN881582	97,6 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				AB186359	K50/5	-	LN881585	100,0 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	-	TUM
Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacter syntrophicus</i>	AJ310082	Neu14	-	LN881576	99,3 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				AB125279	Neu18	-	LN881580	98,3 %	HAW-1	55	H	-	-	-	-	TUM
Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	<i>Thermoanaerobacterium</i>	CP000568	HAW2/1	-	HG917924	99,9 %	HAW-1	55	C, A	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				Y18180	ISO4/1b	-	-	99,9 %	k. A.	60	C	-	-	-	-	TUM
Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Y18180	ISO4/1b	-	LN881583	99,8 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	TUM	Maus et al. 2016a
				LN868252	GGR1	-	LN868252	100,0 %	TUM-4	55	C, A	-	-	-	-	TUM
Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacterium</i>	L09177	DG5	ERP006074	LN881577	98,9 %	HAW-1	60	C, A	-	-	-	TUM	Koeck et al. 2014b, Maus et al. 2016a, eingereicht
				AB106353	AS34	-	KT274714	96,6 %	HAW-1	54	A	-	-	-	-	JGU
Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacterium</i>	AS46	AS46	-	KT274715	96,2 %	HAW-1	54	A	-	-	-	JGU	Maus et al. 2016, Cibis et al. 2016, eingereicht
				CP002171	ISO6/1b	-	LN881584	99,2 %	HAW-1	55	n. b.	-	-	-	-	TUM
Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacterium</i>	GLuc2	GLuc2	-	KT274716	99,9 %	HAW-1	54	A	-	-	-	JGU	Maus et al. 2016a
				GLuc4	GLuc4	-	KT274717	99,9 %	HAW-1	54	A	-	-	-	-	JGU



Da in den untersuchten Biogasfermentern keine Akkumulation von Acetat und Ethanol zu beobachten war, müssen diese Intermediate mittels syntropher Oxidation umgesetzt worden sein. In dieser Studie wurden Mikroorganismen aus der Gattung *Tepidanaerobacter* isoliert, die u.U. in der Lage sind, sowohl mit Vertretern der Gattung *Methanothermobacter* als auch der Gattung *Methanoculleus* solche syntrophen Gemeinschaften einzugehen. Ebenfalls wurden molekulare Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der Gattung *Syntrophaceticus* gefunden. Für diese Gattung sind ebenfalls Arten beschrieben, die in Syntrophie mit Vertretern der Gattung *Methanoculleus* leben. Die Überprüfung dieser Beziehungen muss jedoch erst noch im Rahmen einer folgenden Studie erfolgen.

Darüber hinaus konnten ebenfalls aus mesophilen Biogasfermentern Stämme isoliert werden, welche in der Lage waren bei thermophilen Temperaturen  $\geq 50^{\circ}\text{C}$  zu wachsen (s. **Tabelle 3**). Beispiele hierfür sind das hydrolytisch aktive Bakterium *Petrimonas mucosa* und ein thermophiles Isolat für die methanogene Art *Methanosarcina mazei* (vgl. Schlussbericht zu Teilvorhaben 4). Ebenso konnte aus einer mesophilen Praxisanlage ein Isolat für *Methanothermobacter thermoautotrophicus* entwickelt werden.

## 6 Erstmals beschriebene Mikroorganismen und Genome von Mikroorganismen aus meso- und thermophilen Biogasfermentern

Im Rahmen dieser Studie wurden acht neue Arten von Mikroorganismen beschrieben (**Tabelle 4**). Die Charakterisierung einer weiteren neuen Bakterienart, *Proteiniborus* sp., ist in Vorbereitung. Vier Arten, *Fermentimonas caenicola* (Familie *Porphyromonadaceae*, Klasse *Bacteroidia*), *Herbinix hemicellulosilytica* und *Herbinix luporum* (Familie *Lachnospiraceae*, Klasse *Clostridia*) sowie *Herbivorax saccincola* (Familie *Rumioncoccaceae*, Klasse *Clostridia*), wurden bislang unbekannten Gattungen zugeordnet. Zudem wurde die Gattung *Proteiniphilum* erweitert beschrieben.

Teil der mikrobiologischen Charakterisierung war die Sequenzierung und Annotierung der zugehörigen mikrobiellen Genome (**Tabelle 4**). Für insgesamt 16 Arten aus der Domäne *Bacteria* und fünf Arten aus der Domäne *Archaea* liegen *draft*-Genome vor. Fünf dieser Genome sind derzeit ausführlich charakterisiert, u.a. von den cellulolytisch/hydrolytisch aktiven Bacteria *Clostridium thermocellum* und *Defluviitoga tunisensis*, den acidogenen Bacteria *Peptoniphilus elegans* und *Clostridium bornimense* sowie von dem hydrogenotroph methanogenen Archaeon *Methanoculleus bourgensis*.

Grundlage der Einordnung eines Isolats als neue Art ist neben strukturellen und physiologischen Eigenschaften unter anderem auch die Nukleotidsequenz des 16S rRNA Gens. Allgemein akzeptiert ist, dass Sequenzunterschiede  $> 3\%$  zu dem nächst verwandten Typstamm auf das Vorliegen einer neuen Art hinweist (STACKEBRANDT & GOEBEL 1994). Neuere Studien zeigten jedoch, dass bereits Sequenzähnlichkeiten  $< 98,65\%$  ein Indiz für unterschiedliche Arten sind (KIM *et al.* 2014). Wie aus den **Tabellen 2** und **3** ersichtlich, wurden für eine Reihe von Isolaten aus mesophilen und thermo-

philen Biogasanlagen deutlich geringere Sequenzähnlichkeiten zu bisher bekannten Typstämmen gefunden. Beispiele für thermophile Mikroorganismen sind Stamm AS46 mit 96,2% Ähnlichkeit zu *Tepidanaerobacter syntrophicus*, Stamm D1 mit 96,2% Ähnlichkeit zu *Tepidimicrobium ferriphilum* sowie die Stämme Neu23 und N1F mit 94,2% Ähnlichkeit zu *Clostridium putrefaciens*. Im Falle der Isolate aus mesophilen Biogasreaktoren sind die Stämme M3/9 mit 89,8% Ähnlichkeit zu *Clostridium lactatifermentans*, PP17-6a mit 89,8% zu *Sporanaerobacter acetigenes* und SG1.4B mit 90,5% Ähnlichkeit zu *Gallicola barnesae* besonders bemerkenswert, da sie wahrscheinlich sogar neuen Gattungen zugeordnet werden können.

**Tabelle 4:** Erstmals beschriebene Mikroorganismenarten und Genome von Mikroorganismen aus meso- und thermophilen Biogasfermentern (Literaturangaben s. Kap. I.8).

Taxonomische Einordnung				Erstbeschreibung der Art	(Erst-) Beschreibung des Genoms	Bemerkung
Domäne	Klasse	Familie	Art			
Archaea	Methanobacteria	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium congolense</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. eingereicht, Torres et al. eingereicht	
			<i>Methanobacterium formicicum</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. 2014, Maus et al. eingereicht	
			<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. eingereicht	
	Methanomicrobia	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus bourgenis</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. 2012, Maus et al. 2015b, Maus et al. eingereicht	
			<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. eingereicht	
Bacteria	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Koeck et al. 2014a	
	Bacteroidia	Porphyromonadaceae	<i>Fermentimonas caenicola</i>	Hahnke et al. 2016	Hahnke et al. 2015, Maus et al. eingereicht	Neue Gattung
			<i>Petrimonas mucosa</i>	Hahnke et al. 2016	Maus et al. eingereicht	Neue Art
			<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	Hahnke et al. 2016	Maus et al. eingereicht	Erweiterte Beschreibung der Gattung
	Clostridia	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp. str. N3C	Bislang nicht publiziert	Maus et al. eingereicht	Neue Art
			<i>Clostridium bornimense</i>	Hahnke et al. 2014a	Hahnke et al. 2014b, Tomazetto et al. 2016, Maus et al. eingereicht	Neue Art
		Lachnospiraceae	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	Koeck et al. 2015b	Koeck et al. 2015a	Neue Gattung
			<i>Herbinix luporum</i>	Koeck et al. 2016d	Koeck et al. 2016a	Neue Gattung
		Ruminococcaceae	<i>Clostridium thermocellum</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Koeck et al. 2013, Koeck et al. 2014c, Maus et al. eingereicht	
			<i>Herbivorax saccincola</i>	Koeck et al. 2016b	Beschreibung in Vorbereitung	Neue Gattung
			<i>Ruminoclostridium cellulosi</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Koeck et al. 2014a, Maus et al. eingereicht	
	Unclassified		<i>Proteiniborus</i> sp. str. BA2-13	Beschreibung in Vorbereitung	-	Neue Art
			<i>Proteiniborus</i> sp. str. DW1	-	Maus et al. eingereicht	Gleiche Art wie <i>Proteiniborus</i> sp. str. BA2-13
			<i>Sporanaerobacter</i> sp. str. PP17-6a	Bislang nicht publiziert	Maus et al. eingereicht	Vermutlich neue Gattung
	Tissierellia	Peptoniphilaceae	<i>Peptoniphilus elegans</i>	Tomazetto et al. eingereicht	Tomazetto et al. 2014, Tomazetto et al. eingereicht, Maus et al. eingereicht	Neue Art
Negativicutes	Sporomusaceae	<i>Propionispora</i> sp. str. 2/2-37	Bislang nicht publiziert	Koeck et al. 2016c	Vermutlich neue Gattung	
Thermotogae	Petrotoaceae	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	Frühere Studien anderer Autoren	Maus et al. 2015a, Maus et al. 2016b, Maus et al. eingereicht		

## 7 Fazit

Durch die Kombination von traditionellen Techniken zur Kultivierung repräsentativer Arten von Mikroorganismen für alle Stoffwandlungsprozesse während der Biomethanisierung von Biomasse mit modernen Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung mikrobieller Genome und Metagenome wurden erste Schritte zur Identifizierung und Definition eines Kern-Mikrobioms unternommen. Deutlich muss dabei zwischen den Gemeinschaften von mesophilen und thermophilen Biogasfermentern unterschieden werden.

Bei dieser Studie konnten darüber hinaus erstmals eine Reihe bislang nicht charakterisierter mikrobieller Arten taxonomisch und funktionell beschrieben werden. Durch die parallele Analyse von exemplarischen Metagenomen für verschiedene Biogas-Mikrobiome konnte die Abundanz dieser neuen Arten ermittelt werden.

Die Analyse der mikrobiellen Metagenome wies zugleich auf einen sehr hohen Anteil unbekannter Arten hin. Lediglich 17,5% der sequenzierten 16S rRNA Gene konnten bekannten Gattungen zugeordnet werden. Dieses unterstreicht die Bedeutung des in dieser Studie angewandten kombinierten Ansatzes insbesondere hinsichtlich der Anwendung und weiteren Entwicklung von Kultivierungsstrategien und klassischen mikrobiologischen Arbeiten.

## 8 Auswahl von Veröffentlichungen zu den Ergebnissen des Verbunds

Die Ergebnisse dieses Verbundvorhabens wurden in bislang 29 Fachartikeln veröffentlicht. Weitere Manuskripte befinden sich in Vorbereitung oder sind derzeit zur Begutachtung eingereicht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse in deutscher Sprache erfolgt in den Schlussberichten der einzelnen Teilprojekte.

### ***Manuskripte eingereicht zur Begutachtung***

- (1) **MAUS I., BREMGES A., STOLZE Y., HAHNKE S., CIBIS K. G., KOECK D.E., KIM Y.S., KREUBEL J., HASSA J., WIBBERG D., WEIMANN A., OFF S., STANTSCHIEFF R., ZVERLOV V.V., SCHWARZ W.H., KÖNIG H., LIEBL W. SCHERER P., MCHARDY A.C., SCZYRBA A., KLOCKE M., PÜHLER A., SCHLÜTER A.** (eingereicht): Genome characteristics of bacterial and archaeal isolates from anaerobic digestion microbiomes and their prevalence in industrial biogas plants
- (2) **MAUS I., KIM Y.S., WIBBERG D., STOLZE Y., OFF S., ANTONCZYK S., PÜHLER A., SCHERER P., SCHLÜTER A.** (eingereicht): Biphasic study to characterize agricultural biogas plants by high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing and microscopic analysis
- (3) **TOMAZETTO G., HAHNKE S., LANGER T., WIBBERG D., BLOM J., MAUS I., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A.** (eingereicht): The completely annotated genome, comparative genomics and description of *Peptoniphilus elegans* sp. nov., a novel acidogenic bacterium isolated from a mesophilic biogas reactor
- (4) **TORRES G., KIM Y.S., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., OFF S., PÜHLER A., SCHERER P., SCHLÜTER A.** (eingereicht): Genome sequence of *Methanobacterium congolense* strain Buetzberg, a hydrogenotrophic, methanogenic archaeon, isolated from a mesophilic industrial-scale biogas plant utilizing bio-waste

## 2016

- (5) **CIBIS K.G.**, GNEIPEL A., **KÖNIG H.** (2016): Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *Journal of Biotechnology* 220: 51-63. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.008
- (6) **HAHNKE S.**, **LANGER T.**, **KOECK D.E.**, **KLOCKE M.** (2016): Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov. isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1466-1475. DOI: 10.1099/ijsem.0.000902
- (7) **KOECK D.E.**, **MAUS I.**, WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2016a). Complete genome sequence of *Herbinix luporum* SD1D, a new cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Genome Announcements* 4: e00687-16. DOI: 10.1128/genomeA.00687-16
- (8) **KOECK D.E.**, MEHELKE M., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **SCHWARZ W.H.** (2016b): *Herbivorax saccincola* gen. nov.; sp. nov.; a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via in sacco enrichments from a lab scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, im Druck. DOI: 10.1099/ijsem.0.001374
- (9) **KOECK D.E.**, **MAUS I.**, WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2016c): Draft genome sequence of *Propionispora* sp. 2/2-37, a new xylan degrading bacterium isolated from a mesophilic biogas reactor. *Genome Announcements* 4: e00609-16. DOI: 10.1128/genomeA.00609-1
- (10) **KOECK D.E.**, **HAHNKE S.**, ZVERLOV V.V. (2016d): *Herbinix luporum* sp. nov.; a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, im Druck. DOI: 10.1099/ijsem.0.001324
- (11) **MAUS I.**, **KOECK D.E.**, **CIBIS K.G.**, **HAHNKE S.**, **KIM Y.S.**, **LANGER T.**, KREUBEL J., **ERHARD M.**, BREMGES A., **OFF S.**, STOLZE Y., JAENICKE S., GOESMANN A., **SCZYRBA A.**, **SCHERER P.**, **KÖNIG H.**, **SCHWARZ W.H.**, ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.**, **KLOCKE M.** (2016a): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels* 9:171. DOI: 10.1186/s13068-016-0581-3
- (12) **MAUS I.**, **CIBIS K.G.**, BREMGES A., STOLZE Y., WIBBERG D., TOMAZETTO G., BLOM J., **SCZYRBA A.**, **KÖNIG H.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.** (2016b): Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *Journal of Biotechnology* 232: 50-60. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.001
- (13) Tomazetto G., **Hahnke S.**, **Koeck D.E.**, Wibberg D., **Maus I.**, **Pühler A.**, **Klocke M.**, **Schlüter A.** (2016): Complete genome analysis of *Clostridium bornimense* strain M2/40T: a new acidogenic *Clostridium* species isolated from a mesophilic two-phase laboratory-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 232: 38-49. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.001

## 2015

- (14) **HAHNKE S.**, **MAUS I.**, WIBBERG D., TOMAZETTO G., **PÜHLER A.**, **KLOCKE M.**, **SCHLÜTER A.** (2015): Complete genome sequence of the novel *Porphyromonadaceae* bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 193: 34-36. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.010
- (15) **KOECK D.E.**, **MAUS I.**, WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2015a): Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosily-*

- tica* T3/55T, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 214: 59-60. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.07.022
- (16) **KOECK D.E.**, LUDWIG W., WANNER G., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **SCHWARZ W.H.** (2015b): *Herbinix hemicellulosilytica*, gen. nov.; sp. nov.; a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2365-2371. DOI: 10.1099/ijs.0.000264
- (17) **KOECK D.E.**, KOELLMEIER T., SCHIFFNER S., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **SCHWARZ W.H.** (2015c): Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 424-432. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.06.005
- (18) **MAUS I.**, **CIBIS K.G.**, WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., **KÖNIG H.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.** (2015a): Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *Journal of Biotechnology* 203: 17-18. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.006
- (19) **MAUS I.**, WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., STOLZE Y., BLOM J., EIKMEYER FG., FRACOWIAK J., **KÖNIG H.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.** (2015b): Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *Journal of Biotechnology* 201: 43-53. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.020
- (20) ZVERLOV V.V., **KOECK D.E.**, **SCHWARZ W.H.** (2015): The role of cellulose-hydrolyzing bacteria in the production of biogas from plant biomass. In: Kamm, B. (ed.): *Microorganisms in Biorefineries*. *Microbiology Monographs* 26: 335-361. DOI: 10.1007/978-3-662-45209-7\_12

## 2014

- (21) **HAHNKE S.**, STRIESOW J., ELVERT M., MOLLAR X.P., **KLOCKE M.** (2014a): *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2792-2797. DOI: 10.1099/ijs.0.059691-0
- (22) **HAHNKE S.**, WIBBERG D., TOMAZETTO G., **PÜHLER A.**, **KLOCKE M.**, **SCHLÜTER A.** (2014b): Whole genome sequence of *Clostridium bornimense* strain M2/40 isolated from a lab-scale mesophilic two-phase bio-gas reactor digesting maize silage and wheat straw. *Journal of Biotechnology* 184: 199-200. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.026
- (23) **KIM Y.S.**, WESTERHOLM M., **SCHERER P.** (2014): Dual investigation of methanogenic processes by quantitative PCR and quantitative microscopic fingerprinting (QMF). *FEMS Microbiology* 360: 76-84. DOI: 10.1111/1574-6968.12592
- (24) **KOECK D.E.**, WIBBERG D., **MAUS I.**, WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2014a): First draft genome sequence of the amyolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology* 192: 154-155. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.017
- (25) **KOECK D.E.**, WIBBERG D., **MAUS I.**, WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2014b): Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology* 188: 136-113. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.024
- (26) **KOECK D.E.**, ZVERLOV V.V., **LIEBL W.**, **SCHWARZ W.H.** (2014c): Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 311-319. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.05.006

- (27) **KOECK D.E.**, PECHTL A., **ZVERLOV V.V.**, **SCHWARZ W.H.** (2014d): Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 29: 171-183. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.07.002
- (28) **MAUS I.**, STANTSCHIEFF R., WIBBERG D., STOLZE Y., WINKLER A., **PÜHLER A.**, **KÖNIG H.**, **SCHLÜTER A.** (2014): Complete genome sequence of the methanogenic neotype strain *Methanobacterium formicicum* MF(T.). *Journal of Biotechnology* 192: 40-41. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.018
- (29) STANTSCHIEFF R., KUEVER J., RABENSTEIN A., SEYFARTH K., DRÖGE S., **KÖNIG H.** (2014): Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 5719-5735. DOI: 10.1007/s00253-014-5652-4
- (30) TOMAZETTO G., **HANKE S.**, **MAUS I.**, WIBBERG D., **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.**, **KLOCKE M.** (2014): Complete genome sequence of *Peptoniphilus* sp. strain ING2-D1G isolated from a mesophilic lab-scale completely stirred tank reactor utilizing maize silage in co-digestion with pig and cattle manure for biomethanation. *Journal of Biotechnology* 192: 59-61. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.011

## 2013

- (31) **KOECK D.E.**, WIBBERG D., KÖLLMEIER T., BLOM J., JAENICKE S., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., **PÜHLER A.**, **SCHWARZ W.H.**, **SCHLÜTER A.** (2013): Draft genome sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation. *Journal of Biotechnology* 168: 62-63. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.011
- (32) **MAUS I.**, WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., **CIBIS K.G.**, EIKMEYER F.G., **KÖNIG H.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.** (2013): Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *Journal of Biotechnology* 168: 734-736. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.013

## 2012

- (33) **MAUS I.**, WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., EIKMEYER F.G., SEFFNER A., BOELTER J., SZCZEPANOWSKI R., BLOM J., JAENICKE S., **KÖNIG H.**, **PÜHLER A.**, **SCHLÜTER A.** (2012): Complete genome sequence of the hydrogenotrophic; methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), isolated from a sewage sludge digester. *Journal of Biotechnology* 194: 5487-5488. DOI: 10.1128/JB.01292-12

## 9 Öffentlich verfügbare Isolate und verfügbares Datenmaterial

Die im Rahmen dieser Studie erzeugten Isolate wurden in verschiedenen Stammsammlungen hinterlegt und sind u.a. über das *Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) erhältlich. Entsprechende Stammsammlungsnummern finden sich in den **Tabelle 2** und **3**. Weitere Isolate sind über die Bearbeiter der jeweiligen Teilprojekte verfügbar.

Die im Rahmen dieser Studie für Referenzarten erzeugten MALDI-TOF MS Spektren (**Tabelle 5**) sind in der öffentlichen Datenbank *MALDI-TOF MS User Platform* herausgegeben durch das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (<http://maldi-tof-ms-user-platform.ua-bw.de/>) hinterlegt. Alle MALDI-TOF MS Spektren für Isolate

(Anhang 3 zum Schlussbericht von Teilvorhaben 1) liegen in einer Replikation vor und können auf Anfrage bei dem Verbundkoordinator (Kontakt: mklocke@atb-potsdam.de) an Dritte weitergeben und in anderen Datenbanken eingespielt werden.

**Tabelle 5:** MALDI-TOF MS Spektren für Referenzarten

Taxonomische Einordnung				Stamm- sammlungs- nr.	Online am <sup>1</sup>
Domäne	Klasse	Familie	Art		
Bacteria	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	DSM 13307	12.09.2016
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Lactobacillus kefir</i>	DSM 20587 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	DSM 18390 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Lactobacillus rapi</i>	DSM 19907 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Lactobacillus rossiae</i>	DSM 15814 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM 20332 <sup>T</sup>	12.09.2016
	Bacteroidia	Porphyromonadaceae	<i>Fermentimonas caenicola</i>	DSM 28696 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Petrimonas mucosa</i>	DSM 28695 <sup>T</sup>	12.09.2016
	Clostridia	Clostridiaceae/Ruminococcaceae	<i>Clostridium</i> sp.	DSM 7072	12.09.2016
			<i>Eubacterium barkeri</i>	DSM 1223 <sup>T</sup>	12.09.2016
		Ruminococcaceae	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	DSM 1294 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Clostridium stercorarium</i>	DSM 8532 <sup>T</sup>	12.09.2016
			<i>Clostridium thermocellum</i>	ATCC 27405 <sup>T</sup>	12.09.2016
				DSM 2360	12.09.2016
				DSM 4150	12.09.2016

<sup>T</sup> Typstamm

<sup>1</sup> <http://maldi-tof-ms-user-platform.ua-bw.de/>



# Schlussbericht

## zum Verbundvorhaben

Thema: **Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen**  
**Teilvorhaben 1: Stickstoff-Umsetzer und MALDI-TOF MS Analytik**

Förderkennzeichen: 22017111

Zuwendungsempfänger: Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.  
Abt. Bioverfahrenstechnik  
Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam

Berichtverfasser: Dr. Sarah Hahnke  
Dipl.-Biol. Thomas Langer  
Dr. Michael Klocke

Kontakt: Dr. Michael Klocke  
Tel.: 0331/5699-113, Fax: 0331/5699-849  
Email: mklocke@atb-potsdam.de

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Ziele</b> .....	<b>25</b>
I.1	Aufgabenstellung .....	25
I.2	Planung und Ablauf des Vorhabens.....	27
I.2.1	Organisatorische Maßnahmen am ATB.....	27
I.2.2	Organisation und wissenschaftlich-technische Planung im Verbund .....	27
I.2.3	Wissenschaftlich-technischer Ablauf im Teilprojekt 1 (ATB) .....	28
I.3	Stand der Wissenschaft und Technik.....	29
I.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....	33
<b>II</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
II.1	Erzielte Ergebnisse .....	35
II.1.1	Ausgewählte Biogasreaktoren und -anlagen.....	35
II.1.2	Kultivierungsarbeiten zur Isolierung von Stickstoff-umsetzenden Bakte- rien aus der thermophilen Praxisanlage Viersen.....	37
II.1.3	Kultivierungsarbeiten zur Anreicherung von Archaeen aus der thermophi- len Praxisanlage Viersen .....	42
II.1.4	Kultivierungsarbeiten zur Bakterienisolierung aus einem zweistufigen mesophilen Labor-Aufstrom-Reaktor .....	44
II.1.5	Kultivierungsarbeiten zur Archaeen- und Bakterienisolierung aus einem mesophilen Labor-Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung $3,0 \text{ g}_{\text{DS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) .....	46
II.1.6	Kultivierungsarbeiten zur Bakterienisolierung aus einem mesophilen La- bor-Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung $8,5 \text{ g}_{\text{DS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).....	49
II.1.7	Diversität aller gewonnenen Isolate .....	50
II.1.8	Genomsequenzierungen für den Aufbau einer Referenzdatenbank zur Erschließung kultivierungsunabhängig erzeugter Sequenzdaten .....	50
II.1.9	Charakterisierung neuer <i>Porphyromonadaceae</i> -Arten.....	52
II.1.10	Entwicklung eines qPCR-Systems zur quantitativen Bestimmung von <i>Petrimonas mucosa</i> in Biogasanlagen .....	69
II.1.11	Etablierung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS .....	71
II.1.12	Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse .....	80
II.2	Verwertung.....	81
II.2.1	Verwertung der wissenschaftlichen Erkenntnisse .....	81
II.2.2	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit .....	82
II.3	Ergebnisse von Seiten Dritter .....	84
II.4	Veröffentlichungen .....	84
	Zitierte Literatur.....	85

## I Ziele

### I.1 Aufgabenstellung

Die Gewinnung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen und landwirtschaftlichen Reststoffen ist wesentlicher Baustein einer nachhaltigen und CO<sub>2</sub>-neutralen Energieerzeugung. Der anaerobe Abbau von Biomasse zu Biogas im Zuge der Biomethanisierung wird durch eine komplexe und dynamische Lebensgemeinschaft bestehend aus einer Vielzahl von Bakterien und Archaeen bewirkt. Die mikrobiellen Prozesse können dabei in vier Stufen eingeteilt werden: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Bei der Hydrolyse werden polymere Ausgangssubstrate wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette in einfache organische Verbindungen gespalten. Die gebildeten Zwischenprodukte werden dann in der Acidogenese durch säurebildende Bakterien überwiegend zu niederen Säuren wie beispielsweise Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Ameisensäure oder Milchsäure sowie zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut. Bei der Acetogenese entstehen Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Im letzten Schritt des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, werden Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Methan, Wasser und Kohlenstoffdioxid umgewandelt (WEILAND 2010, MERLIN CHRISTY *et al.* 2014). Die Mehrheit der in den verschiedenen Abbaustufen beteiligten Mikroorganismen ist ebenso wie ihre Stoffwechsellösungen bislang nicht wissenschaftlich untersucht. Die Kenntnis der Biogas-Mikrobiologie wird jedoch allgemein als Schlüssel für die weitere technologische Optimierung der Biogasproduktion angesehen.

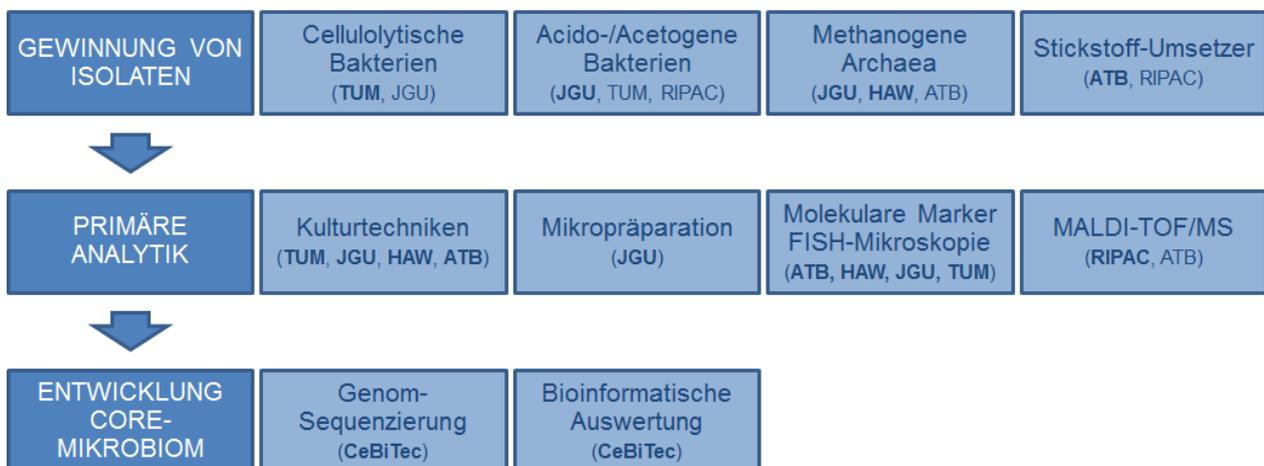
Zur Aufklärung der mikrobiologischen Zusammenhänge gewinnen Hochdurchsatztechnologien zur DNA-Analyse zunehmend an Bedeutung. Jedoch sind die hiermit erhaltenen Datenmengen bislang nur ansatzweise auswertbar, da es häufig an Referenzdaten mangelt. Um die Hochdurchsatz-DNA-Analytik auch für die Biogasanlagenforschung zu erschließen, sollte im Rahmen dieses Verbundvorhabens eine Referenzdatensammlung für das Kern- („core“) Mikrobiom von Biogasanlagen aufgebaut werden. Hierzu sollten gemäß der Vorhabenbeschreibung folgende **Arbeitspakete** durchgeführt werden:

- (AP 1) Auswahl und Beprobung von repräsentativen Biogasanlagen
- (AP 2) Gewinnung von Isolaten für cellulolytische, acidogene, acetogene und stickstoffumsetzende Bakterien sowie für methanogene Archaea
- (AP 3) Etablierung neuartiger Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren
- (AP 4) Sequenzierung der Genome der Isolate und bioinformatische Auswertung
- (AP 5) Strukturierung der Referenzdatenbank anhand bereits vorhandener Metagenomdaten
- (AP 6) Abgleich der Daten und Aufbau einer Referenzdatenbank für den Kernbestand an Mikroorganismen
- (AP 7) Etablierung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS

Zur Umsetzung des Vorhabens wurde ein Konsortium bestehend aus Partnern mit einer langjährigen Expertise auf dem Gebiet der Mikrobiologie anoxischer Habitats, der kulturunabhängigen Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften in Biogasfermentationen, der Genom- und Metagenomsequenzierung sowie der Verfahrenstechnik und Anlagentechnik von Biogasfermentationen aufgebaut (**Abbildung 1**). Im Einzelnen waren folgende Partner beteiligt:

- Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V., Abt. Bioverfahrenstechnik [ATB]
- Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie [CeBiTec]
- Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung [JvGU]
- Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences [HAW]
- Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie [TUM]

Zudem war ein privatwirtschaftliches Labor, die RIPAC-LABOR GmbH Potsdam, mit langjähriger Erfahrung auf dem Gebiet der mikrobiologischen Auftragsanalytik im Bereich Landwirtschaft als Unterauftragnehmer beteiligt, welches die erarbeiteten Ergebnisse zur Verbesserung der analytischen Verfahren und Befundbeurteilung sowie zur Entwicklung von Schnelltests nutzen wird. Die RIPAC-LABOR GmbH ist spezialisiert auf die Kultivierung, Gewinnung und Identifizierung von Mikroorganismen im Bereich der Veterinär-, Human- und Umweltmikrobiologie. Das RIPAC-LABOR verfügt dabei über spezielle Kenntnisse zur Kultivierung anspruchsvoller, insbesondere anaerober Bakterien und kann diese durch spezifische Selektiv- und Anreicherungsmedien isolieren. Zur Identifizierung werden alle Isolate mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert und die typischen Massenspektrenmuster in einer Datenbank identifiziert und gespeichert.



**Abbildung 1:** Zusammenfassung der geplanten Arbeiten sowie der Arbeitsverteilung zwischen den Verbundpartnern.

Im Rahmen von **Teilvorhaben 1** wurden am ATB in Kooperation mit der RIPAC-LABOR GmbH als Unterauftragnehmer sowie der übrigen Verbundpartner Arbeiten mit folgender Schwerpunktsetzung durchgeführt:

- Koordination des Forschungsverbundes
- Isolierung von an der Umsetzung von stickstoffhaltigen Substanzen beteiligten Mikroorganismen
- Isolierung von methanogenen Archaea
- Methodenentwicklung zur Kultivierung von o. g. Mikroorganismen (z. B. unter Anwendung spezifischer anaerober Anreicherungsverfahren)
- Identifizierung kultivierter Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS Analytik und 16S rRNA Gensequenzierung
  - Anlage einer MALDI-TOF MS Datenbank, phylogenetische Auswertung
- Entwicklung molekularer Marker für ausgewählte Arten bzw. Isolate

## **I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens**

### **I.2.1 Organisatorische Maßnahmen am ATB**

Für die wissenschaftliche Bearbeitung des am ATB angesiedelten Teilprojekts sowie zur As-sistenz bei der wissenschaftlichen Koordination des Forschungsverbundes wurde mit Beginn der Förderperiode zum 01.08.2012 Dr. Sarah Hahnke als wissenschaftliche Mitarbeiterin eingestellt. Als technische Assistenz zur Durchführung der Isolierungsarbeiten sowie der technischen Organisation des Anaerobierlabors wurde eine Fachkraft mit der Qualifikation Umweltschutztechnikerin und Biologielaborantin, Jutta Striesow, eingestellt. Frau Striesow schied aufgrund einer beruflichen Neuorientierung zum 31.11.2012 aus dem ATB aus. Als Nachfolger wurde zum 01.01.2013 Dipl.-Biol. Thomas Langer eingestellt.

### **I.2.2 Organisation und wissenschaftlich-technische Planung im Verbund**

Um die Arbeiten im Verbund zu planen und koordinieren, fand am 05.11.2012 ein Auftaktsymposium am ATB in Potsdam statt, an dem mindestens ein Vertreter jedes Verbundpartners teilnahm. Während der Projektlaufzeit wurden darüber hinaus Projekttreffen im jährlichen Abstand durchgeführt, auf denen die Arbeiten und Ergebnisse eines jeden Teilprojekts vorgestellt und diskutiert wurden. Das erste Statustreffen fand am 18./19.04.2013 am CeBiTec der Universität Bielefeld statt, das zweite Treffen wurde am 04.04.2014 an der JvGU in Mainz abgehalten, und das dritte Statusseminar wurde am 12./13.03.2015 von der HAW in Hamburg ausgerichtet. Neben der Ergebnisauswertung erfolgte jeweils auch die Planung der weiteren Vorgehensweise im Projekt (siehe Protokolle in der Anlage).

Der Ablauf des Vorhabens orientierte sich an der im Projektantrag dargestellten Arbeitsplanung. Während des Auftaktsymposiums wurden von den Verbundpartnern die zu Beginn des Vorhabens auszuführenden Arbeiten zur Umsetzung der Arbeitspakete AP 1-7 wie folgt präzisiert:

Arbeitsschwerpunkt 1: Untersuchung der Diversität cellulolytischer Bakterien in Biogasanlagen

Nach dem Stand der Literatur ist ein repräsentativer Vertreter für in Biogasreaktoren auftretende cellulolytische Bakterien *Clostridium thermocellum*. Es ist zu vermuten, dass diesem Bakterium oder hierzu eng verwandte Mikroorganismen eine zentrale Bedeutung bei dem anaeroben Abbau pflanzlicher Biomasse zukommt. In diesem Arbeitspaket sollen daher die in Biogasanlagen auftretenden Varianten dieser Art untersucht werden, insbesondere die Bandbreite deren genetischer Variation. Hierzu soll eine Auswahl von unterschiedlichen Praxisanlagen mit verschiedenen Gärsubstraten und unterschiedlichen Temperaturregimen getroffen werden. Probenmaterial soll dann dem Partner TUM zur Isolierung von *Clostridium thermocellum* bereitgestellt werden. Die dabei gewonnenen Isolate sollen außerdem mittels MALDI-TOF MS-Analysen durch das RIPAC-LABOR in Potsdam identifiziert werden. Basierend auf den erhaltenen Daten sollen dann Isolate für die Genomsequenzierung und die bioinformatische Erstellung von Draft-Genomen (CeBiTec) ausgewählt werden.

Arbeitsschwerpunkt 2: Untersuchung der mikrobiellen Diversität in einer thermophilen Modellanlage

Ziel dieses Arbeitsschwerpunktes ist eine möglichst umfassende kulturbasierte Analyse eines exemplarischen Biogasreaktors. Als Modellanlage soll die thermophile Praxisanlage am Standort Viersen beprobt werden. Ziel ist die Isolierung von Mikroorganismen der vier anaeroben Abbaustufen (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese) mittels der unterschiedlichen Isolierungsstrategien der Projektpartner. Gleichzeitig solle dieses Arbeitspaket zur Etablierung der Kultivierungsplattformen bei den verschiedenen Projektpartnern dienen.

### **1.2.3 Wissenschaftlich-technischer Ablauf im Teilprojekt 1 (ATB)**

Zur Umsetzung des Arbeitsschwerpunktes 1 wurde vom ATB dem Partner TUM Probenmaterial aus zwei Praxisanlagen für die Isolierung von *Clostridium thermocellum* zur Verfügung gestellt. Für am ATB stattfindende Isolierungsarbeiten wurden insgesamt vier Reaktorproben aus drei verschiedenen Biogasreaktoren verwendet. Als gemeinsame Biogasanlage gemäß Arbeitsschwerpunkt 2 wurde zu Projektbeginn die thermophil betriebene Praxisanlage in Viersen von allen Verbundpartnern beprobt. Für die Arbeiten am ATB wurden außerdem zwei mesophile Laborreaktoren beprobt.

Im Rahmen von Teilprojekt 1 wurden diverse Anreicherungs- und Isolierungsansätze zur Gewinnung von mikrobiellen Isolaten erstellt und über den Projektzeitraum kontinu-

ierlich weitergeführt. Die Anreicherungen wurden im Hinblick auf die enthaltenen mikrobiellen Gemeinschaften untersucht, und es wurden Reinkulturen erzeugt. Drei der Isolate, die als Bakterien identifiziert wurden, die häufig in Biogasanlagen vorkommen und dem Phylum *Bacteroidetes* zuzuordnen sind, wurden umfangreich physiologisch, morphologisch, genotypisch und chemotaxonomisch charakterisiert und als neue Bakterienarten bzw. als neue Bakteriengattung beschrieben.

Alle im Rahmen des Projekts gewonnenen Isolate wurden von dem ATB dem Partner RIPAC-LABOR GmbH für eine MALDI-TOF MS-Analytik bereitgestellt. Ziel war die Erstellung und Einspeisung von Proteinprofilen neuer Bakterienisolate in eine MALDI-TOF MS-Datenbank zum Ausbau der Datenbank für die Schnell Diagnostik von Biogasanlagen. Weiterhin erfolgte die Etablierung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS durch den Partner RIPAC-LABOR GmbH.

Für die Erstellung von Referenzgenomen zur Interpretation von Genomdaten aus der Hochdurchsatz-DNA-Analytik (= Aufbau einer Referenzdatenbank) wurden 11 Isolate des ATB ausgewählt, deren Genome dann von dem Partner CeBiTec sequenziert wurden. Grundlage der bioinformatischen Auswertung solcher hochauflösender Genomdatensätze ist die Kenntnis modernster Software-Applikationen erforderlich. Zur entsprechenden Einarbeitung aller Projektpartner wurde durch das CeBiTec vom 02. - 04.07.2014 ein Workshop in Bielefeld veranstaltet. In Folge dessen konnte am ATB das Genom eines Bakterienisolats aus dem Phylum *Bacteroidetes* vollständig annotiert werden als Grundlage zur umfassenden Auswertung des Genoms. In enger Zusammenarbeit mit dem Partner CeBiTec wurde außerdem das Genom der am ATB charakterisierten neuen Bakterienart *Clostridium bornimense* ausgewertet und veröffentlicht.

### I.3 Stand der Wissenschaft und Technik

Die Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen und landwirtschaftlichen Reststoffen zu Biogas gewinnt als essentieller Bestandteil von Wertschöpfungsketten im Bereich der Landwirtschaft und von Konzepten für eine nachhaltige und CO<sub>2</sub>-neutrale Energieerzeugung zunehmend an Bedeutung. Mittlerweile werden in Deutschland über 8.000 Biogasanlagen mit einer installierten Leistung von mehr als 3,9 GW<sub>elek</sub> betrieben [FNR]. Nach einer Schätzung des Fachverbandes Biogas wurde 2015 durch die Nutzung von Biogas alleine in Deutschland die Emission von mehr als 21 Millionen Tonnen CO<sub>2</sub> aus fossilen Quellen vermieden.

#### **Die Biogasfermentation als mikrobiologischer Prozess**

In Biogasanlagen bewirkt eine komplexe und dynamische mikrobielle Biozönose den Aufschluss und Abbau der organischen Biomasse zu Biogas. Die in pflanzlicher Biomasse gespeicherten langkettigen Kohlenhydrate wie z. B. Cellulose oder Stärke wer-

den dabei zuerst in Oligo- und Monomere der jeweiligen Zuckerverbindungen gespalten (Hydrolyse). Diese wiederum sind Substrate für die Vergärung zu verschiedenen Carbonsäuren, sog. leichtflüchtigen Fettsäuren (*volatile fatty acids*, VFA) (Acidogenese). Im Zuge einer sekundären Gärung können diese Säuren zu anderen Carbonsäuren umgewandelt werden, in erster Linie entsteht dabei Essigsäure (Acetogenese). Unter bestimmten, ungünstigen Fermentationsbedingungen ist Essigsäure das Endprodukt der Gärung. In diesem Fall kommt es zur Anreicherung der Essigsäure in dem Reaktor und dadurch zu einer Versäuerung. Dieses führt in der Folge zum Erliegen der Biogasproduktion und zu einem Stopp der Abbauprozesse.

Unter normalen Prozessbedingungen wird Essigsäure allerdings weiter oxidiert, entweder zu Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff (Acetat-Oxidation) oder zu Methan und Kohlendioxid (acetoklastische Methanogenese). Das Kohlendioxid geht aus und bildet einen Hauptbestandteil des Biogases (bis zu 50%). Alternativ kann das Kohlendioxid mit Hilfe von molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel zu Methan reduziert werden (hydrogenotrophe Methanogenese). Methan ist die brennbare Komponente des Biogases und kann unter optimalen Bedingungen bis zu 80% des Biogases ausmachen.

Während die fermentativen Prozesse durch eine Reihe verschiedener Bakterien hauptsächlich aus den Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes*, aber auch durch *Proteobacteria* umgesetzt werden, besitzen nur Archaeen des Phylums *Euryarchaeota* die notwendige enzymatische Ausstattung zur Methanogenese. Jeder der Schritte von der Biomasse bis zum Biogas kann im Prozess ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt sein.

Trotz einer Reihe von Studien u. a. durch die Antragsteller muss die Biogas-Mikrobiologie im Allgemeinen noch als „*black box*“, also als weitestgehend unbekannter Mikrokosmos angesehen werden. Dennoch wird die Aufklärung der mikrobiellen Zusammenhänge allgemein als Schlüssel für die weitere verfahrenstechnische Optimierung der Biogasfermentation betrachtet. So weist eine Studie des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) zu den Schwerpunkten für Forschung und Entwicklung in den Energietechnologien für den Bereich der Biogasproduktion explizit auf den Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Analyse der Stoffwechselfvorgänge und der beteiligten Organismen sowie den notwendigen Anpassungen der Verfahren an die Anforderungen der Biozönose hin [BMWi 2010: Energietechnologien 2050 – Schwerpunkte für Forschung und Entwicklung. S. 72; Förderschwerpunkt des BMELV (2011) zum Thema: "Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen"].

### **Analyse mikrobieller Gemeinschaften**

Die mikrobiologische Analytik wird dadurch erschwert, dass (1) die mikrobiologische Gemeinschaft aus Hunderten der unterschiedlichsten Arten von Mikroorganismen besteht, welche aufgrund der anaeroben Lebensweise, ähnlicher Nährstoffanforderungen und syntropher bzw. symbiotischer Wechselbeziehungen häufig nicht oder nur schwer

kultivierbar sind, (2) daher viele der auftretenden Arten bislang weder taxonomisch noch physiologisch beschrieben sind, (3) die mikrobiologische Gemeinschaft zeitlich und in Abhängigkeit der Betriebsweise des Biogasreaktors stark variiert.

In den letzten Jahren konnten in der mikrobiologischen Analytik gewaltige technologische Durchbrüche erzielt werden, welche es möglich erscheinen lassen, die „*black box*“ der Biogas-Mikrobiologie zu entschlüsseln. Insbesondere wurden verschiedene kultur-unabhängige Hochdurchsatzverfahren zur molekularen Analyse etabliert, welche die Bearbeitung von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften ermöglichen. Hierzu zählen insbesondere sog. OMIK-Technologien, wie Genomik (Analyse des gesamten Erbguts einer Zelle), Transkriptomik (Analyse der exprimierten Gene einer Zelle), Proteomik (Analyse der Proteine in einer Zelle) und Metabolomik (Analyse des Stoffwechsels einer Zelle). Zur Aufklärung komplexer mikrobieller Strukturen können solche Hochdurchsatzverfahren auch als Meta-Analyse eingesetzt werden z. B. zur Entschlüsselung des gesamten Erbgutes einer mikrobiellen Gemeinschaft (z. B. Metagenomik). Auf Basis solcher, sehr umfangreicher Datenpakete zur Struktur und zu dem genetischen Potential mikrobieller Gemeinschaften lassen sich mit bioinformatischen Auswertungsverfahren funktionelle Netzwerke erstellen, die wesentlich sind für die Aufklärung der Stoffwandlungsprozesse innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, des Mikrobioms.

Im Rahmen der BMBF/PtJ geförderten Vorhaben FABES (03SF0346B) und BiogasPlusProjekt (03SF0349C) wurden in Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec mehrere Metagenom-Analysen von Biogasfermentationen durchgeführt. Bislang resultierten aus diesen Arbeiten DNA-Sequenzinformationen im Umfang von 441 Mio. Basenpaaren (Mb) verteilt auf 1,1 Mio. DNA-Stücken (*environmental gene tags*, EGTs). Ein großer Anteil dieser Sequenzen (ca. 40 - 50%) ist bislang jedoch nicht interpretierbar, da in den verfügbaren Datenbanken keine vergleichbaren DNA-Sequenzen hinterlegt sind. Weitere Sequenzen können nur „ungenau“ bestimmten taxonomischen Gruppen und metabolischen Funktionen zugeordnet werden, da sie größere Unterschiede zu den verfügbaren Referenzsequenzen aufweisen. Eine Ursache hierfür liegt darin, dass bislang nur wenige Mikroorganismen aus Biogasanlagen isoliert und mikro- bzw. molekularbiologisch charakterisiert wurden. Wesentlich häufiger finden sich in den Datenbanken Informationen von Mikroorganismen aus natürlichen, teilweise sogar extremen Lebensräumen.

### **Methoden zur Detektion und Identifizierung von Mikroorganismen**

Zur spezifischen Detektion von Mikroorganismen stehen grundsätzlich drei alternative Analyseverfahren zur Verfügung: (1) der Nachweis der Mikroorganismen *in situ*, (2) die Kultivierung der Mikroorganismen mittels spezieller Nähr- und Selektionsmedien, (3) der kultur- bzw. kultivierungsunabhängige Nachweis der Mikroorganismen auf Basis artspezifischer Moleküle (z. B. der PCR-gestützte Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen). Die Generierung umfassender Sequenzdatenbanken speziell für Biogas-

Fermentationen erlaubt die Entwicklung von molekularen Markern, welche zum art- evtl. auch stammgenauen Nachweis mittels FISH-Mikroskopie und PCR sowie evtl. auch zur zielgerichteten Isolierung nutzbar sind.

Alternativ kann eine zeitnahe Identifizierung von Isolaten („Agarplatten-Kolonien“) auch auf Basis der Erzeugung spezifischer Zellproteinprofile mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) erfolgen. Hierbei wird das zu untersuchende Isolat mit einer speziellen Matrix zur Kristallisierung vermischt. Mithilfe eines UV-Lasers wird diese Mischung dann verdampft, wobei insbesondere aus den Bestandteilen der Mikroorganismen ionisierte Partikel unterschiedlicher Größe und Ladungen entstehen. Die ionisierten Partikel, vorrangig Peptide, besonders ribosomale Proteine mit wachstums-unabhängiger Zusammensetzung, werden in einem elektrischen Feld in eine vorgegebene Richtung beschleunigt. Abhängig von dem Masse/Ladungsverhältnis erhalten die unterschiedlichen Partikel individuelle Geschwindigkeiten, wobei leichtere Partikel schneller „fliegen“ als schwerere Partikel. Dieses ermöglicht die getrennte Detektion dieser Partikel am Ende der Flugstrecke (*time-of-flight* Prinzip). Mittels geeigneter Detektoren ist parallel auch die Ermittlung der jeweiligen Partikelzahl möglich, so dass bei einer in MALDI-Systemen standardisierten Ladungszahl von 1 als Endergebnis ein Profil der Partikelgröße (X-Wert) und -häufigkeit (Y-Wert) erhalten wird (Spektrum). Dieses Spektrum ist erwiesenermaßen einzigartig für jeden Mikroorganismus. Über den Vergleich der erhaltenen Spektren mit Referenzspektren kann somit fast unmittelbar eine Identifizierung des Testkeims erfolgen (Messdauer 15 - 45 s).

Die MALDI-TOF MS-Analyse ermöglicht ein Screening vieler hundert Isolate innerhalb weniger Tage. So kann rasch eine Identifizierung unbekannter Isolate erfolgen, welche dann mittels PCR-gestützter Verfahren taxonomisch eingeordnet und daraufhin ggf. zur Genomsequenzierung genutzt werden können.

### **Schutzrechte**

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

## I.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Teilprojekts 1 wurde mit allen Verbundpartnern insofern zusammengearbeitet, dass bei regelmäßigen Treffen eine Ergebnisvorstellung und -diskussion sowie die gemeinschaftliche Planung über das weitere Vorgehen im Verbund stattfand. Unter anderem wurden gemeinsam mit allen Verbundpartnern eine (thermophile) Praxisanlage beprobt und mit den bei den jeweiligen Partnern etablierten bzw. optimierten Methoden untersucht (**AP 1 - 3**). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse werden derzeit in einem Manuskript zusammengestellt. Solch eine umfangreiche polyphasische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft einer (thermophilen) Praxisanlage ist bisher einzigartig.

Mit den Projektpartnern RIPAC-LABOR GmbH, CeBiTec und TUM wurde im Einzelnen wie folgt zusammengearbeitet:

- Dem RIPAC-LABOR wurden gewonnene Bakterienisolate für MALDI-TOF MS-Analysen bereitgestellt, wodurch Zellproteinspektren verschiedener neuer Bakterienisolate erstellt und in die Datenbank zur Schnelldiagnostik von Biogasanlagen mit eingespeist werden konnten (Aufbau der Datenbank, **AP 6 und 7**).
- Vom CeBiTec in Bielefeld wurde von der gemeinschaftlich beprobten Biogasanlage eine Metagenombank des gesamten Geninventars der mikrobiellen Gemeinschaft erstellt. Um ein möglichst genaues Bild der mikrobiellen Gemeinschaft im Reaktor zu erhalten, hat jeder Projektpartner hierzu aus einer Rückstellprobe des Reaktormaterials eine DNA-Extraktion vorgenommen und die extrahierte DNA dem CeBiTec bereitgestellt. Dieses Vorgehen sollte einen möglichen *Bias* durch unterschiedliche DNA-Extraktionsmethoden oder verschieden lange Transportzeiten der Probe bis zur Lagerung ausgleichen.
- Für den Aufbau einer Referenzdatenbank zur Interpretation von Genomdaten aus der Hochdurchsatz-DNA-Analytik wurden seitens des ATB 11 Isolate ausgewählt und die für die Genomsequenzierung benötigten DNA-Mengen bereitgestellt (**AP 4 und 5**). Die Sequenzierung der Genome erfolgte durch den Projektpartner CeBiTec. In Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec wurden hierzu bereits drei Genome Announcements im Journal of Biotechnology veröffentlicht (HAHNKE *et al.* 2014b und 2015, TOMAZETTO *et al.* 2014).
- Zur bioinformatischen Auswertung der erzeugten Genomdaten wurde für alle Projektpartner ein Workshop vom 02. - 04.07.2014 am CeBiTec in Bielefeld veranstaltet, an dem Vertreter aller Verbundpartner teilnahmen.
- Das Genom des am ATB isolierten und charakterisierten Bakteriums *Clostridium bornimense* M2/40 wurde am CeBiTec ausgewertet, am ATB wurden zusätzliche physiologische Experimente durchgeführt, und es wurde eine gemeinschaftliche Publikation erstellt (TOMAZETTO *et al.* 2015). Die Auswertung weiterer Genome in Zusammenarbeit mit dem CeBiTec ist in Planung (**AP 4 und 5**).
- Zur Bearbeitung des Arbeitsschwerpunktes 1 (siehe Abschnitt I.2.2) wurde der TUM durch das ATB Probenmaterial von zwei Praxisanlagen bereitgestellt (**AP 1 und 2**).

- Für die Beschreibung neuer Bakterienarten, die am ATB isoliert wurden, hat der Projektpartner der TUM Messungen extrazellulärer Enzymaktivitäten mit den vor Ort etablierten Methoden durchgeführt. Die Ergebnisse flossen in ein Manuskript zur Charakterisierung von zwei neuen Bakterienarten und einer neuen Bakteriengattung ein. Das Manuskript ist derzeit beim International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology eingereicht.
- Für die Charakterisierung einer neuen cellulolytischen Bakterienart der Klasse *Clostridia*, die von dem Projektpartner der TUM durchgeführt wurde, wurde am ATB die bakterielle Bildung von Wasserstoff nachgewiesen. Das Manuskript zur Artbeschreibung ist derzeit beim International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology eingereicht.

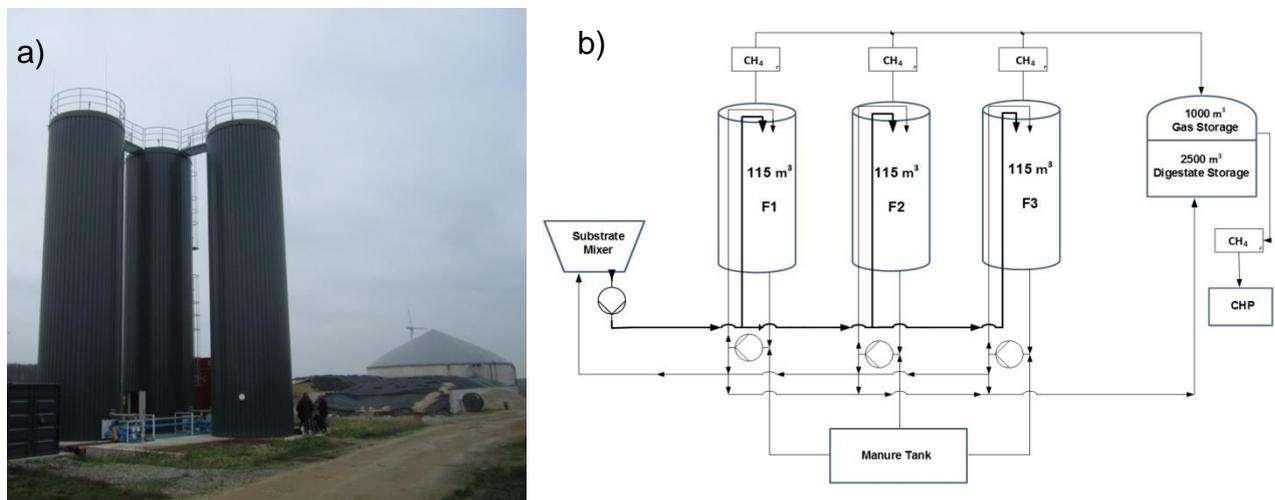
## II Ergebnisse

### II.1 Erzielte Ergebnisse

#### II.1.1 Beprobte Biogasreaktoren und -anlagen

##### *Thermophile Praxisanlage Viersen*

Bei der Praxisanlage Viersen (**Abbildung 2**) handelte es sich um eine thermophile Anlage mit einer Betriebstemperatur von 54°C, für die als Gärsubstrate eine Mischung aus Mais- und Grassilage sowie Schweinegülle eingesetzt wurden. Weitere Betriebsdaten zu dieser Anlage sind in **Tabelle 6** aufgeführt. Der Fermenterinhalt dieser Anlage wurde sowohl für die Bakterien- als auch für die Archaeenkultivierung verwendet.



**Abbildung 2:** a) Thermophile Biogasanlage in Viersen mit drei identischen zylindrischen Fermentern (Höhe: 14 m, Durchmesser 3 m). b) Schematische Darstellung der Biogasanlage. F1 - F3: Fermenter 1 - 3.

**Tabelle 6:** Betriebsdaten BGA Viersen. TS: Trockensubstanz, HRT: hydraulische Verweilzeit.

Betriebsparameter	
Substrat	Festsubstrat 1200 kg/Tag/Fermenter + flüssige Gülle 550 L/Tag/Fermenter: 55% Maissilage (32% TS), 6% Grassilage (30% TS) und 32% Schweinegülle (2% TS).
Temperatur	54°C
HRT	21 Tage
Methangehalt	56%
Fütterung	6 Mal pro Tag

### **Zweistufiges mesophiles Labor-Aufstrom-Verfahren**

Das zweistufige Aufstrom-Verfahren (**Abbildung 3**) wurde mesophil betrieben und bestand aus einem Aufstromfeststoffreaktor (AFR) mit nachgeschaltetem Festbettreaktor (FBR). Das System war zweiphasig, d. h. dass teilweise eine räumliche und zeitliche Trennung von Hydrolyse/Acidogenese und Methanogenese erfolgte. Als Gärsubstrat wurde eine Mischung aus Maissilage und Weizenstroh eingesetzt. Das Reaktormaterial wurde für die Isolierung von Bakterien verwendet.



#### **Betriebsparameter**

Substrat	Maissilage, Weizenstroh
Temperatur	37°C
AFR: Nutzvolumen	29 L, Arbeitsvolumen 27 L
FBR: Nutzvolumen	23 L, Arbeitsvolumen 22 L
MVoTS	95:5
Raumbelastung	3,0 goS L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

**Abbildung 3:** Links: Zweistufiger Aufstromfeststoffreaktor (AFR) mit nachgeschaltetem Festbettreaktor (FBR); zweiphasig, d. h. teilweise räumliche und zeitliche Trennung von Hydrolyse/Acidogenese und Methanogenese. Rechts: Betriebsdaten des Reaktors. MvoTS: Mischungsverhältnis der Substrate bezogen auf die organische Trockensubstanz.



#### **Betriebsparameter**

Substrat	Rinder- und Schweinegülle, Maissilage
Temperatur	37°C
Nutzvolumen	11 L
Arbeitsvolumen	8 L
MVoTS	45:45:10
Raumbelastung	3,0 bzw. 8,5 goS L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

**Abbildung 4:** Links: Einstufiger Rührkessel-Reaktor (CSTR). Rechts: Betriebsdaten des Reaktors. MvoTS: Mischungsverhältnis der Substrate bezogen auf organische Trockensubstanz, B<sub>R</sub>: Raumbelastung.

### **Einstufiger mesophiler Labor-Rührkessel-Reaktor**

Der mesophile Rührkessel-Reaktor (**Abbildung 4**) wurde kontinuierlich mit einer Mischung aus 10% Maissilage (% bezogen auf die organische Trockenmasse) und je 45% Schweine- und Rindergülle gefüttert, wobei die Raumbelastungen über den Versuchszeitraum stetig erhöht wurde. Für die Kultivierung wurde der Reaktor zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt. Zum Zeitpunkt der Probenahmen betrug die Raumbelastung  $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Probenmaterial für die Bakterien- und Archaeenkultivierung) bzw.  $8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Probenmaterial für die Bakterienkultivierung).

### **II.1.2 Kultivierungsarbeiten zur Isolierung von Stickstoff-umsetzenden Bakterien aus der thermophilen Praxisanlage Viersen**

Für die Kultivierung von Bakterien aus der Praxisanlage in Viersen wurden in der Literatur beschriebene Kulturmedien für Denitrifizierer aus Böden basierend auf PATUREAU *et al.* (2000), Su *et al.* (2001) und FALK *et al.* (2010) verwendet. Alle in den Medien enthaltenen Substrate sowie die anorganischen Stickstoffverbindungen sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

**Tabelle 7:** Medien für Denitrifizierer für die Isolierung von Stickstoff-umsetzenden Bakterien aus der thermophilen Praxisanlage Viersen. Es sind jeweils die Konzentrationen der Substrate sowie der anorganischen Stickstoffverbindungen angegeben.

<b>Name des Mediums (Referenz)</b>	<b>Enthaltene N-Verbindungen und Substrate</b>	<b>Konzentration</b>
R2A-Medium: (FALK <i>et al.</i> 2010)	KNO <sub>3</sub>	5 mM
	Na-Pyruvat	2,7 mM
	Glucose	2,8 mM
	Lösliche Stärke	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
	Caseinhydrolysat	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
	Proteosepepton	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
	Hefeextrakt	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
Bodenmedium: (FALK <i>et al.</i> 2010)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100 mM
	NaNO <sub>3</sub>	5 mM
	Nährbouillon	1:10000
	Na-Formiat	10 mM
	Glucose	10 mM
Nitrat Broth: (PATUREAU <i>et al.</i> 2000)	KNO <sub>3</sub>	15 mM
	Pepton	$8,6 \text{ g L}^{-1}$
	Na-Acetat	5,5 mM
	EtOH	0,025%
	Na-Propionat	3,6 mM
Basalmedium: (Su <i>et al.</i> 2001)	NH <sub>4</sub> Cl	5,6 mM
	KNO <sub>3</sub>	19,8 mM
	Na-Succinat	52 mM

Die Kultivierungsansätze wurden in zwei Parallelen in Flüssigmedien in verschiedenen Verdünnungen angesetzt. Dabei wurde Medium mit dem Probenmaterial beimpft und jeweils 1:10 weiter verdünnt bis zu einer Verdünnung von  $10^{-8}$ . Die Kulturen wurden bei 50°C inkubiert und monatlich in frisches Medium überimpft.

Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in den Flüssigkulturen erfolgte mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) und anschließender Reamplifizierung und Sequenzierung der erhaltenen DNA-Banden (Fa. GATC Biotech).

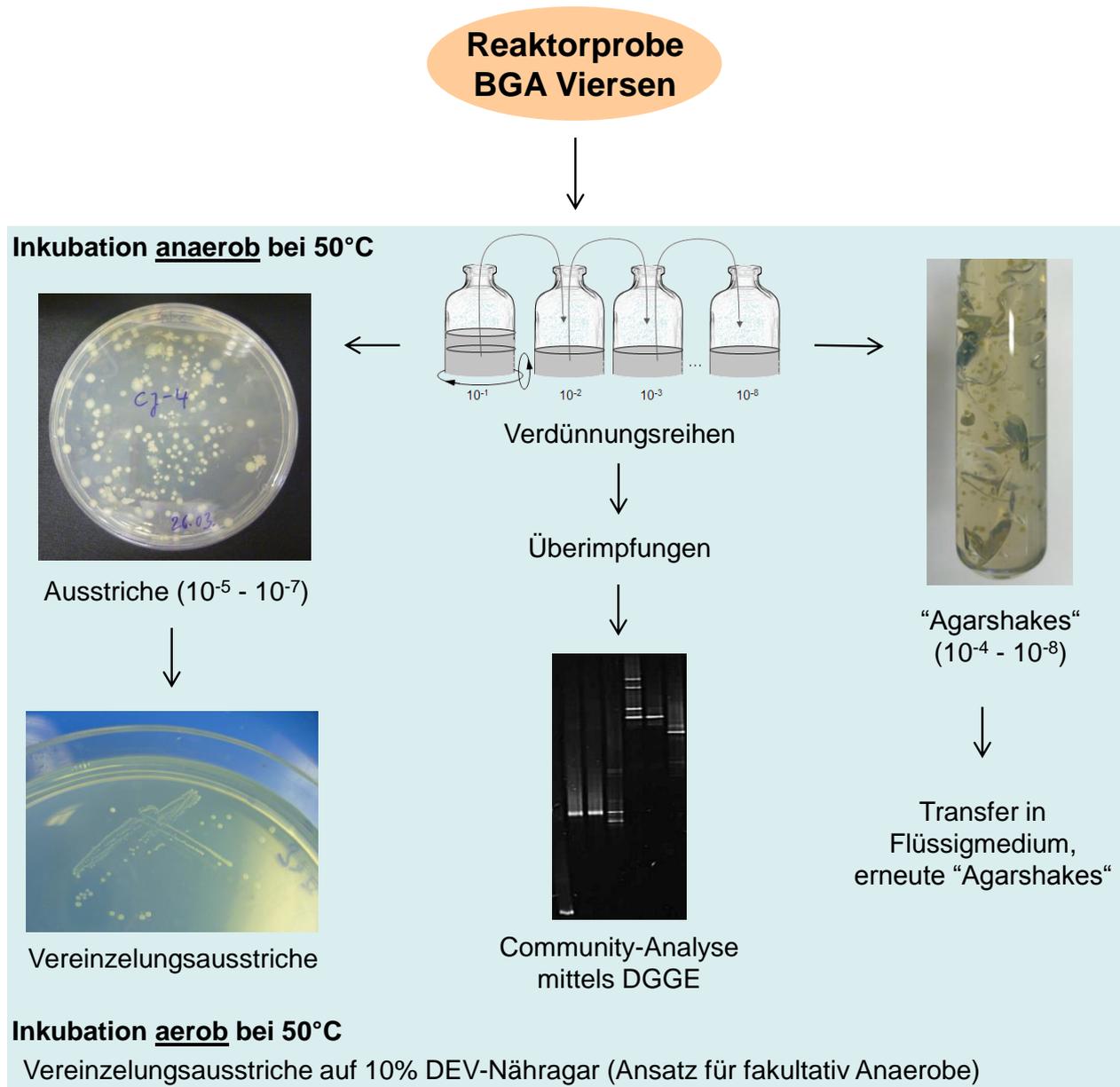
Über mehrere Monate fortgeführte Anreicherungen wurden, sofern Wachstum in den Kulturen detektiert werden konnte, auf Agarplatten ausgestrichen, um durch Vereinzlungsausstriche Isolate zu gewinnen. Von den zu Beginn erstellten Verdünnungsreihen wurde direkt nach dem Beimpfen der Kulturen Material aus den höheren Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium ausplattiert. Aus einigen Verdünnungen wurden zusätzlich Tiefagarverdünnungskulturen („Agarshakes“) hergestellt. Einzelne Kolonien wurden ausgewählt („gepickt“) und auf frischem Medium ausgestrichen bzw. aus den Agarshakes in Flüssigmedium überführt und zur Vereinzlung weiter kultiviert. Ergänzend wurde ein weiterer Isolierungsansatz für fakultative Anaerobier auf 10% DEV-Nähragar (Fa. Merck) durchgeführt.

Die Inkubation unter aeroben Bedingungen sollte Wachstum von strikten Anaerobiern unterdrücken und Wachstum von fakultativ anaeroben Mikroorganismen stimulieren. Es wurden Verdünnungen ausplattiert und dann Kolonien auf Agarplatten vereinzelt. Ein Übersichtsschema der durchgeführten Kultivierungsarbeiten ist in **Abbildung 5** dargestellt. Darüber hinaus wurden die Archaeenanreicherungen (Details siehe Abschnitt II.1.3), in denen einige Bakterien selektiv angereichert wurden, ebenfalls auf Agarplatten mit BBL™ Columbia Agar Medium + 5% Pferdeblut ausplattiert.

**Tabelle 8:** Übersicht über die aus der BGA Viersen gewonnenen bakteriellen Isolate. Boden: Bodenmedium; Basal: Basalmedium; NO<sub>3</sub>: Nitrat Broth; R2A: R2A-Medium; DEV: 10% DEV-Nähragar.

Isolatbezeichnung	Taxonomische Zuordnung* (16S rDNA Sequenzähnlichkeit)	Isolierungsmedium	Anzahl der Isolate
C2A	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (99,6%)	Boden, Basal	5
M1A	<i>Bacillus coagulans</i> (99,4%)	R2A	2
E2C	<i>Bacillus infernus</i> (99,9%)	Basal	3
L2C	<i>Bacillus licheniformis</i> (100%)	NO <sub>3</sub> , R2A, DEV	9
J2B	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (100%)	NO <sub>3</sub> , R2A	2
A6A	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (100%)	DEV	3
YP4-6A	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> (99,9%)	R2A	6
Z2-16	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i> (97,6%)	R2A	1
XP2-13-3	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> (98,7%)	NO <sub>3</sub>	1
BA2-13	<i>Proteiniborus ethanoligenes</i> (96%)	Columbia	2
N3C	<i>Clostridium</i> spp. (94%)	R2A	5
N1F	<i>Clostridium</i> spp. (94%)	NO <sub>3</sub> , R2A	17

\*Nächster beschriebener Verwandter auf Ebene der 16S rRNA Gensequenz (Ähnlichkeit in %)



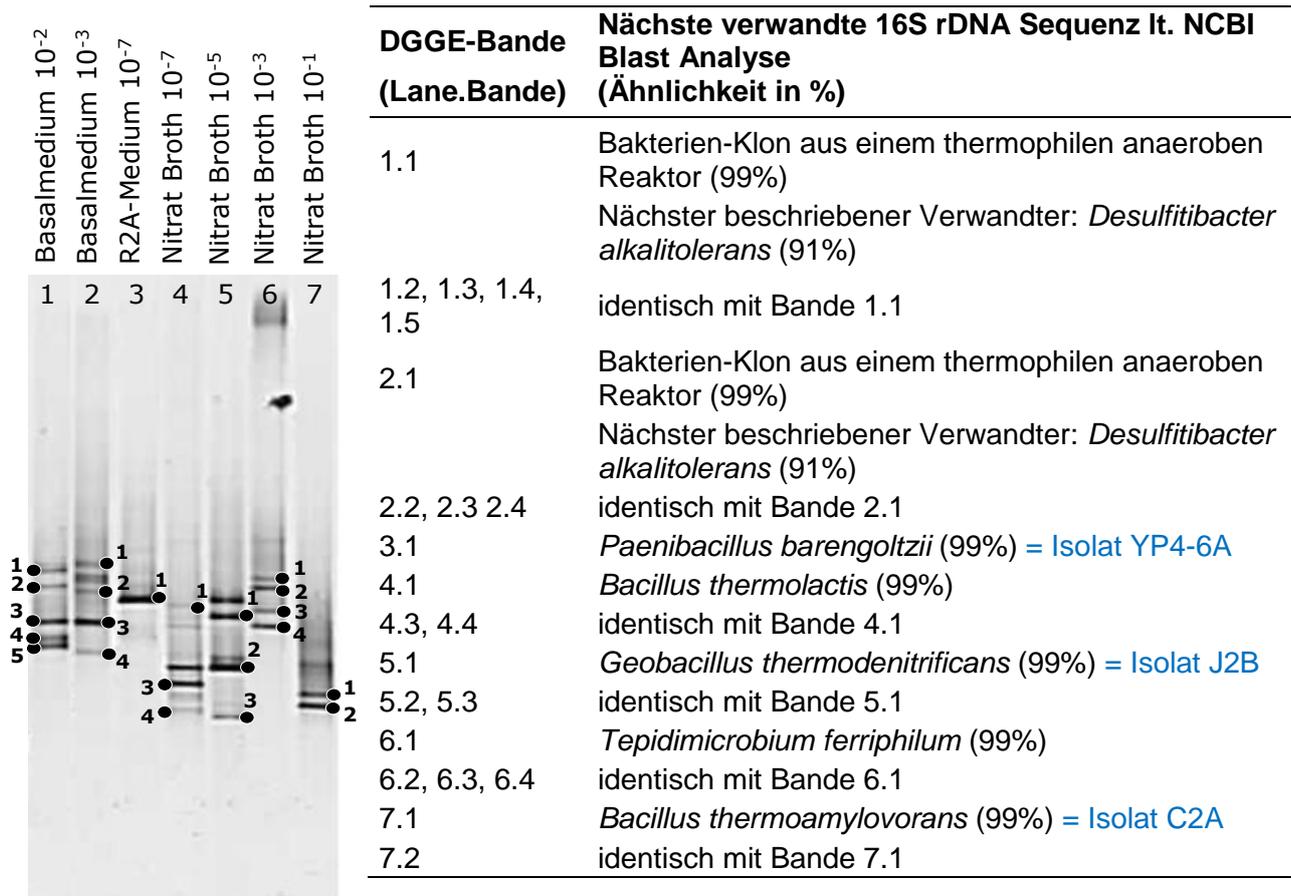
**Abbildung 5:** Übersichtsschema der Kultivierungsansätze zur Isolierung von Bakterien aus der BGA Viersen. Die Ansätze wurden jeweils in Duplikaten mit vier verschiedenen Medien für Denitrifizierer durchgeführt. Die Charakterisierung der Anreicherungen in Flüssigmedium erfolgt mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE).

Mittels der angewendeten Kultivierungstechniken und der verwendeten Medien wurden insgesamt 56 Isolate gewonnen. Die Identifizierung der Isolate erfolgte zunächst über die MALDI-TOF MS-Analyse (RIPAC-LABOR GmbH). Für weitere phylogenetische Analysen wurde das 16S rRNA Gen von jeweils einem Referenzstamm der identifizierten Phylotypen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und universellen Bakterienprimern (Fa. Biomers) vervielfältigt, aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Fa. Qiagen) und anschließend sequenziert (Fa. GATC Biotech). Ebenfalls sequenziert wurden die 16S rRNA Gene von unbekanntem, d. h. durch die MALDI-TOF MS-Analyse nicht identifizierten Isolaten. Durch Abgleich der Gensequenz mit der GenBank Datenbank

des NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurden die Mikroorganismen phylogenetisch eingeordnet. Die Isolate konnten 12 verschiedenen Bakterienstämmen (d. h. auf 16S rDNA Sequenzebene unterschiedliche Bakterien) aus den Klassen *Bacilli* und *Clostridia* zugeordnet werden (**Tabelle 8**).

In und auf dem Boden- und Basalmedium (FALK *et al.* [2010] mit erhöhter Ammoniumnitrat-Konzentration und SU *et al.* [2001] mit Succinat als einzigem Substrat), also Medien, die keine bzw. nur in Spuren komplexe Substrate enthielten, konnte insgesamt kaum Wachstum festgestellt werden. In den Flüssigkulturen mit diesen beiden Medien konnte spätestens nach der sechsten Überimpfung kein Wachstum mehr festgestellt werden. Auf Agarplatten wuchsen nur vereinzelt Kolonien, von denen die meisten nach der vierten Überimpfung kein Wachstum mehr zeigten.

Einige der isolierten Bakterien konnten mittels DGGE-Analysen auch in den Flüssigkulturen detektiert werden (**Abbildung 6**). Hierzu wurden die erhaltenen DGGE-Banden ausgeschnitten, mittels PCR und universellen Bakterienprimern (Fa. Biomers) reamplifiziert, aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Fa. Qiagen) und anschließend sequenziert (Fa. GATC Biotech). Die Analyse der bakteriellen Gemeinschaften in den Anreicherungskulturen zeigte auch das Vorhandensein einiger Organismen, die nicht als Reinkultur gewonnen werden konnten, da diese Organismen auf Agarmedium keine Kolonien bildeten und das Wachstum in den Flüssigkulturen mit zunehmender Überimpfung ebenfalls ausblieb.



**Abbildung 6:** DGGE-Fingerprint Analyse der Bakteriengemeinschaften in Flüssigkulturen. Beispielhafte Darstellung für Anreicherungen verschiedener Verdünnungsstufen in Basalmedium (nach der siebten Überimpfung), in R2A-Medium (nach der sechsten Überimpfung) und in Nitrate Broth (nach der siebten Überimpfung). Die Sequenzen der markierten Banden wurden mit den 16S rDNA Sequenzen aus der GenBank Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen. Die nächsten beschriebenen Verwandten sind jeweils angegeben. Blau gekennzeichnet sind Organismen, die in Reinkultur gewonnen werden konnten

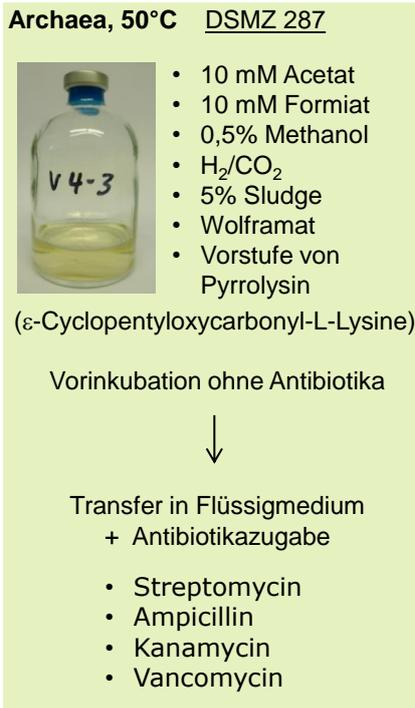
Mittels der verwendeten Medien und Kultivierungstechniken wurden aus der Biogasanlage in Viersen überwiegend bekannte Arten isoliert, d. h. Arten, die >97% 16S rDNA Sequenzähnlichkeit zum nächsten beschriebenen Verwandten aufwiesen. Drei Stämme entsprachen unbekanntem Arten, unter anderem einem Bakterium der Gattung *Proteini-borus*, das 96% 16S rDNA Sequenzähnlichkeit zu dem nächsten Verwandten *P. ethanoligenes* aufwies, sowie zwei Stämmen aus der Gattung *Clostridium*, Isolat N3C und N1F, die mit 99,4% Sequenzähnlichkeit zu einander enge Verwandtschaft zeigten. Da es sich bei diesen beiden Isolaten um Clostridien-Arten handelt, die eine sehr große phylogenetische Distanz zu bisher bekannten Arten aufwiesen und selbst offensichtlich in unterschiedlichen Varianten in Biogasanlagen vorkommen, wurde einer der beiden Vertreter (Isolat N3C) für den Aufbau der Referenzdatenbank für das Mikrobiom von Biogasanlagen ausgewählt und dessen Genom durch das CeBiTec sequenziert.

Da aus der beprobten Biogasanlage mit den verwendeten Medien, die in der Literatur für die Isolierung von Stickstoffverbindungen umsetzender Bakterien aus Böden beschrieben sind, nur relativ wenig verschiedene Bakterienisolate gewonnen werden konnten, wurden für die Bakterienisolierung aus den anderen Laborreaktoren nur Vollmedien verwendet, auf denen erfahrungsgemäß zahlreiche verschiedene Bakterienarten kultiviert werden können. Ziel war es, möglichst viele bisher unbekannte Bakterienarten zu isolieren und deren Genomsequenzen mit in die Referenzdatenbank zur Interpretation von Daten aus der Hochdurchsatz-DNA-Analytik aufzunehmen.

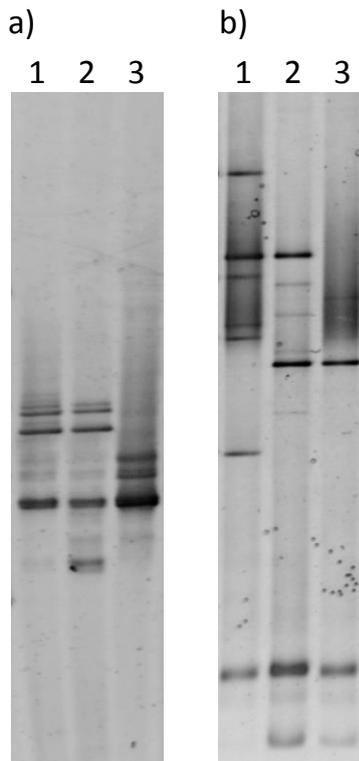
### II.1.3 Kultivierungsarbeiten zur Anreicherung von Archaeen aus der thermophilen Praxisanlage Viersen

Für die Probe aus der thermophilen Praxisanlage mit Standort Viersen wurde neben der Bakterienkultivierung auch ein Ansatz zur Kultivierung von Archaeen durchgeführt. Hierzu wurde ein Archaeen-Standardmedium, das Medium DSMZ 287, basierend auf STANTSCHIEFF *et al.* (2014) verwendet. Zusätzlich wurde Reaktorflüssigkeit (5% v/v Reaktorflüssigkeit) hinzugefügt, was eventuell notwendige, bisher nicht bekannte Wachstumskomponenten bereitstellen sollte. Außerdem wurde zusätzlich Wolfram ( $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{WO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) hinzugefügt, da einige methanogene Archaeen Wolfram-abhängige Enzyme besitzen und bekannt ist, das Wolfram archaeelles Wachstum stimulieren kann (DRIDI *et al.* 2012). Da die Proteine einiger Archaeen die sog. zweiundzwanzigste Aminosäure Pyrrolysin enthalten (HAO *et al.* 2002), wurde außerdem dem Medium  $1 \text{ mg L}^{-1}$   $\epsilon$ -Cyclopentylloxycarbonyl-L-Lysine zugegeben. Diese Verbindung ist eine Vorstufe des Pyrrolysin; Pyrrolysin selbst ist derzeit nicht kommerziell erhältlich. Damit zunächst möglichst viele verschiedene Archaeen anwachsen können, wurden dem Medium des Weiteren verschiedene Kohlenstoff-Quellen zugesetzt: 0,5% Methanol sowie jeweils 10 mM Na-Acetat und Na-Formiat sowie  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (**Abbildung 7**).

Flüssigkulturen wurden jeweils in drei Parallelen mit Probenmaterial beimpft und vier Wochen lang bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Eliminierung von Bakterien wurden die Kulturen nach dieser Vorinkubation sukzessive in Medium mit drei verschiedenen Antibiotikakombinationen überimpft: zunächst in Medium mit  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Vancomycin x HCl und  $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Streptomycin, nach weiterer vierwöchiger Inkubation in Medium mit  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Na-Ampicillin und  $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Kanamycin. Nach erneuter Inkubation erfolgte ein Transfer in frisches Medium mit Vancomycin x HCl und Na-Ampicillin (jeweils  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Danach, d. h. beim nächsten Transfer wurde wieder die erste Antibiotikakombination eingesetzt und so fort.



**Abbildung 7:** Schema des Kultivierungsansatzes zur Kultivierung von Archaeen aus Probenmaterial aus der thermophilen Praxisanlage in Viersen. Es wurden Triplikate mit modifiziertem DSMZ 287 Medium angesetzt, vorinkubiert und dann in Medium mit Antibiotikazusatz weiterüberimpft.



**Abbildung 8:** DGGE-Fingerprint-Analyse der Archaeen- und Bakteriengemeinschaften in den Flüssiganreicherungen aus der thermophilen Biogasanlage in Viersen. Alle drei angesetzten Parallelen (1 - 3) wurden a) mittels universeller Archaeen- und b) mittels universeller Bakterienprimern analysiert. Die unterschiedlichen Bandenmuster zeigen, dass die drei Kulturen unterschiedliche Mischungen angereicherter Archaeen und Bakterien enthielten.

Die molekularbiologische Untersuchung der Anreicherungen mittels DGGE ergab, dass die Kulturen zum Projektende neben einigen wenigen Archaeenarten auch noch Bakterien enthielten, wobei die drei angesetzten Parallelen zum Teil unterschiedliche Organismengemeinschaften aufwiesen (**Abbildung 8**). Aufgrund des Projektendes konnte die Vereinzelung jedoch nicht weiter fortgesetzt werden. Die weitere Vereinzelung der

Archaeen und Bakterien würde weiteren Kultivierungsaufwand mit selektiveren Medien (z. B. Medien mit jeweils nur einer Substratquelle) erfordern.

#### II.1.4 Kultivierungsarbeiten zur Bakterienisolierung aus einem zweistufigen mesophilen Labor-Aufstrom-Reaktor

Im Rahmen des 2012 abgeschlossenen Projektes „Aufbau einer Ex-situ-Sammlung von methanbildenden Archaea aus Biogasanlagen im ländlichen Raum (Methanogenic Archaea Culture Collection, MACC)“, BMEL/FNR 22020308, wurden am ATB bereits eine Vielzahl an Bakterienisolaten aus einem mesophilen Labor-Aufstrom-Reaktor gewonnen und verschiedene Anreicherungskulturen angesetzt. Im BIOGAS-CORE Projekt wurden nun diese Anreicherungskulturen weitergeführt sowie Kryokulturen von den gewonnenen Isolaten für eine längerfristige Lagerung angelegt und der Stammsammlung des ATB zugeführt.

Durch Vereinzelausstriche auf verschiedenen Medien (BBL™ Columbia Agar + 5% Pferdeblut, Sabouraud-4% Glucose Agar mit Chloramphenicol, Anaerobier-Agar nach Brewer, GS2-Medium, LB-Agar, Endo-Agar) wurden insgesamt 100 Bakterienisolate gewonnen. Die Isolate umfassen 34 verschiedene Stämme (d. h. auf Ebene der 16S rRNA Gene unterscheidbare Bakterienstämme) aus sechs phylogenetischen Klassen (**Tabelle 9**).

Laut geltender taxonomischer Richtlinien für Prokaryoten weist ein Unterschied von mehr als 3% in der 16S rRNA Gensequenz zweier Stämme darauf hin, dass es sich um verschiedene Arten handelt (GEVERS *et al.* 2005). Unter Berücksichtigung dieses Kriteriums entsprachen also mindestens drei der erhaltenen Isolate bisher unbekanntem Arten. Dazu gehört insbesondere auch das Isolat M2/40, das im Rahmen dieses Vorhabens als neue Bakterienart beschrieben und als *Clostridium bornimense* benannt wurde (HAHNKE *et al.* 2014a).

Für die Genomsequenzierung zum Aufbau der Referenzdatenbank für das Mikrobiom von Biogasanlagen wurden verschiedene Isolate bisher unbekannter Arten ausgewählt. Das Genom von Stamm *Clostridium bornimense* M2/40 wurde durch den Partner CeBiTec vollständig annotiert. Dazu wurde jedes einzelne Gen mit den in öffentlichen Datenbanken hinterlegten, bereits bekannten Genen abgeglichen. Soweit möglich, konnte dadurch den Genen bzw. deren Genprodukten die entsprechenden Funktionen im Stoffwechsel des Mikroorganismus' zugeordnet werden, wodurch eine erste Charakterisierung des Stoffwechsellpotentials des Organismus' möglich wurde (HAHNKE *et al.* 2014b, TOMAZETTO *et al.* 2015).

Die Isolate M3/3 und M3/9, die ebenfalls bisher unbekanntem Arten entsprechen (>3% 16S rRNA Gensequenzunterschied zur nächsten beschriebenen Art) wurden ebenfalls für die Genomsequenzierung ausgewählt. Das Isolat M3/6 zeigte zwar nur etwas weniger als 3% Unterschied in der 16S rDNA Sequenz zum nächsten bekannten Verwand-

ten, jedoch konnte mittels einer höher auflösenden Methode, der DNA-DNA Hybridisierung, eine Abgrenzung zur nächsten beschriebenen Art ermittelt werden (siehe Kapitel II.1.9). Im Rahmen dieses Projekts wurde das Genom dieses Stamms ebenfalls sequenziert.

**Tabelle 9:** Übersicht über die gewonnenen Isolate aus dem zweistufigen mesophilen Labor-Aufstrom-Verfahren.

Isolatbezeichnung	Taxonomische Einordnung (Klasse)	Nächster Verwandter auf Artebene	Sequenzähnlichkeit (16S rRNA Gen)	Anzahl der Isolate	
M2/5a	<i>Actinobacteria</i>	<i>Leucobacter aridicollis</i>	98%)	2	
M1/2	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	3	
M1/3		<i>Streptococcus infantarius</i>	99%	22	
M1/11		<i>Bacillus subtilis</i>	99%	2	
M1/17		<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	2	
M1/20		<i>Bacillus sporothermodurans</i>	99%	3	
M1/25		<i>Bacillus oleronius</i>	100%	1	
M1/34		<i>Lactobacillus ruminis</i>	99%	1	
M1/41		<i>Enterococcus aquimaris</i>	99%	1	
M1/42		<i>Bacillus circulans</i>	99%	2	
M1/46		<i>Enterococcus hirae</i>	99%	1	
M2/8		<i>Streptococcus henryi</i>	100%	11	
M2/35		<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	1	
M2/36		<i>Bacillus cereus</i>	99%	4	
M3/1		<i>Paenibacillus</i> spp.	99%	5	
M3/6		<i>Bacteroidia</i>	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	97%	3
M1/36		<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	99%	1
M1/43	<i>Clostridium bifermentans</i>		99%	1	
M2/26	<i>Clostridium aurantibutyricum</i>		99%	3	
M2/40*	<i>Clostridium cellulovorans</i>		94%	1	
M3/3	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>		96%	1	
M3/9	<i>Clostridium propionicum</i>		91%	1	
M1/6	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>		<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	97%	2
M2/5b			<i>Hydrogenophaga</i> sp.	97%	1
M2/14			<i>Brachymonas denitrificans</i>	99%	1
M2/15		<i>Comamonas</i> spp.	98%	1	
M2/19		<i>Advenella</i> spp.	98%	1	
M1/5		$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas formosensis</i>	100%	3
M1/12	<i>Proteus mirabilis</i>		99%	5	
M1/37	<i>Escherichia</i> spp.		99%	1	
M2/1	<i>Acinetobacter baumannii</i>		100%	1	
M2/2	<i>Escherichia coli</i>		100%	4	
M2/3	<i>Citrobacter koseri</i>		99%	2	
M2/4	<i>Acinetobacter</i> spp.		99%	6	

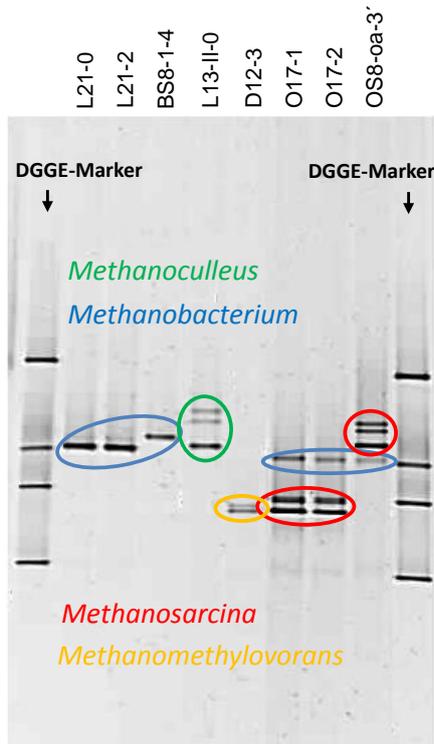
\* Das Isolat wurde bereits als neue Bakterienart charakterisiert, *Clostridium bornimense* (HAHNKE *et al.* 2014a)

### II.1.5 Kultivierungsarbeiten zur Archaeen- und Bakterienisolierung aus einem mesophilen Labor-Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )

Zur Isolierung von Archaeen wurden mit dem Impfmateriale aus dem mesophilen Labor-Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung von  $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) Verdünnungsreihen in zwei verschiedenen Flüssigmedien für Archaeen angesetzt und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Verwendet wurden die Medien DSMZ 120 und DSMZ 287 aus der „List of recommended media for microorganisms“ des Leibniz-Instituts DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, wobei die zugegebenen Substrate zum Teil variiert wurden, um das Wachstum unterschiedlicher Archaeen zu stimulieren. Nach mindestens vierwöchiger Inkubation wurden die Kulturen jeweils in frisches Medium transferiert. Eine längere Inkubation erfolgte in den Fällen, wenn 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.

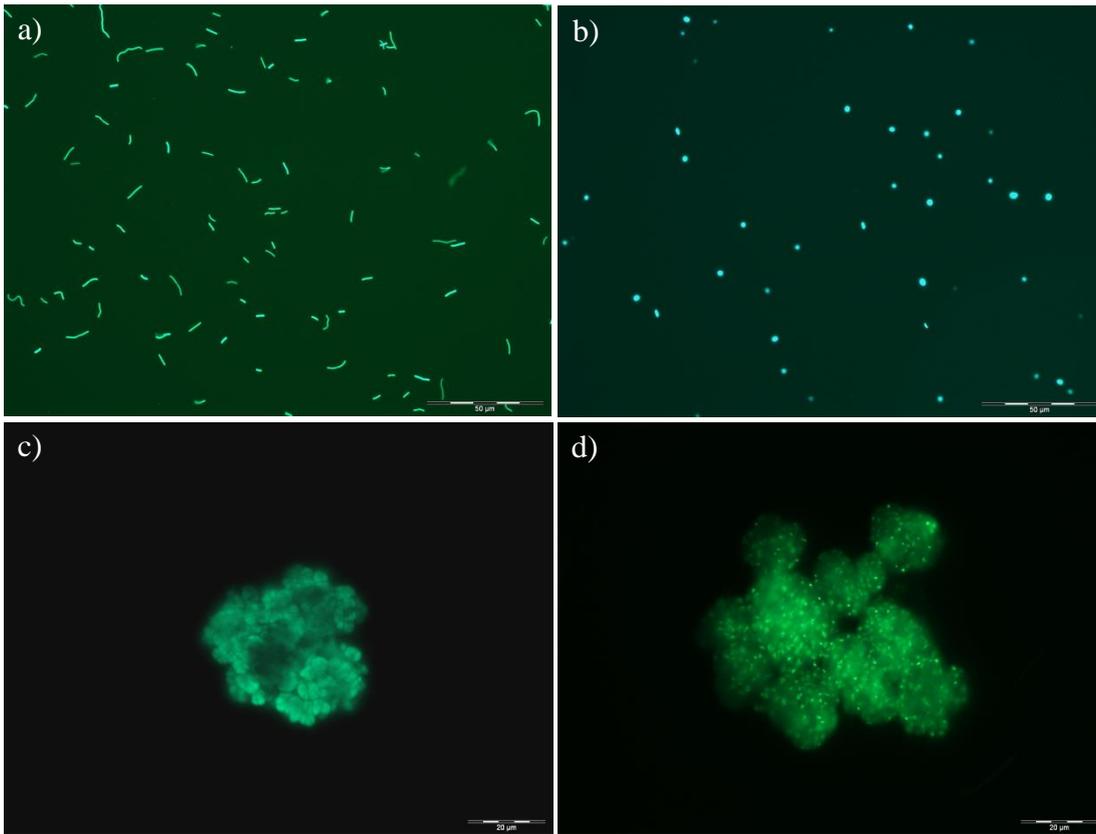
Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften sowie die Reinheitsüberprüfung der Anreicherungen erfolgte mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE). Sofern nur noch wenige unterschiedliche Mikroorganismen in den Kulturen detektiert wurden, wurden „Agarshakes“ mit dem jeweiligen Medium erstellt. Im Agar gewachsene Kolonien wurden gepickt und in frisches Flüssigmedium transferiert. Außerdem wurden einige Archaeen-Anreicherungen auf verschiedene Agarmedien ausplattiert (DSMZ Medium 120 und 287, Nitrat Broth Medium, Brain Heart Infusion Medium, R2A Medium). Gewachsene Kolonien wurden „gepickt“ und durch weitere Vereinzelausstrieche wurden Reinkulturen gewonnen.

In den verschiedenen Variationen der Flüssigmedien wurden unterschiedliche Mischungen von Bakterien und Archaeen gefunden. Insgesamt konnten sechs unterschiedliche Archaeenstämme aus vier verschiedenen Gattungen detektiert werden, die in DGGE-Fingerprint-Analysen unterschiedliche Muster aus ein bis drei Banden bildeten (**Abbildung 9**). In den meisten Anreicherungen wurden neben ein bis drei Archaeenstämmen auch Bakterien gefunden.



**Abbildung 9:** DGGE-Fingerprinting der unterschiedlichen Archaeenstämme in den Flüssiganreicherungen aus dem mesophilen Rührkessel-Reaktor. Die aufgetragenen PCR-Produkte wurden mit archaeen-spezifischen Primern erzeugt, in den Kulturen enthaltene Bakterien wurden nicht detektiert. Die Banden konnten verschiedenen Archaeen aus den Gattungen *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanomethylovorans* zugeordnet werden.

In Reinkultur konnten Archaeen der Arten *Methanobacterium formicum*, *Methanoculleus chikugoensis*, *Methanosarcina mazei* und *Methanosarcina thermophila* gewonnen werden (**Abbildung 10**). Die Isolate zeigten jeweils 99 - 100% 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zu den nächst verwandten Arten. Der zu Beginn der Kultivierung nachgewiesene Mikroorganismus der Gattung *Methanomethylovorans* konnte mit zunehmenden Überimpfungen nicht mehr in den Kulturen detektiert werden. Ebenso wird darauf hingewiesen, dass zum Projektende die überwiegende Mehrzahl der Anreicherungen noch Mischungen aus Archaeen und Bakterien enthielt. Auch in diesem Falle wären weitere Arbeiten zur Gewinnung von Reinkulturen erforderlich.



**Abbildung 10:** Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Isolate von methanogenen Archaea. Sichtbar ist die für methanogene Archaeen typische Autofluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht. a) *Methanobacterium formicum* Isolat L21-2, b) *Methanoculleus chikugoensis* Isolat L21-II-0, c) *Methanosarcina mazei* Isolat GS14-2aM, d) *Methanosarcina thermophila* Isolat OS9-2-13.

**Tabelle 10:** Übersicht über die gewonnenen Bakterienisolate aus dem mesophilen Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung  $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

Isolatbezeichnung	Taxonomische Einordnung (Klasse)	Nächster Verwandter auf Artebene	Sequenzähnlichkeit (16S rRNA Gen)	Anzahl der Isolate
PP17-6a	<i>Clostridia</i>	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	91%	3
BSP7-1-6	<i>Mollicutes</i>	<i>Acholeplasma equifetale</i>	93%	2
MSP8-1-8b	<i>Spirochaetia</i>	<i>Sphaerochaeta globosa</i>	91,4%	1
MP17-1a	<i>Synergistia</i>	<i>Aminobacterium colombiense</i>	99,3%	2
P17-6c		<i>Aminobacterium mobile</i>	99,3%	1

Durch die Vereinzelungsausstriehe auf Agarplatten wurden neben dem Archaeon *Methanobacterium formicum*, das auch aus Flüssigmedium isoliert werden konnte, fünf unterschiedliche Bakterienarten aus vier phylogenetischen Klassen isoliert (**Tabelle 10**). Drei der Isolate, PP17-6a, BSP7-1-6 und MSP8-1-8b, zeigten >3% Sequenzunterschied im 16S rRNA Gen verglichen mit den nächsten beschriebenen Verwandten. Es handelt sich bei diesen Stämmen folglich um neue Arten. Das Isolat PP17-6a wurde aufgrund

seiner Neuartigkeit zur Genomsequenzierung zum Aufbau der Referenzdatenbank für das Mikrobiom von Biogasanlagen ausgewählt. Die beiden ebenfalls als unbekannte Arten einzustufenden Isolate BSP7-1-6 und MSP8-1-8b konnten für die Genomsequenzierung nicht berücksichtigt werden, da aufgrund sehr schlechten Wachstums keine entsprechende Massenanzucht für die DNA-Isolierung erfolgen konnte. Die hierfür erforderlichen experimentellen Arbeiten zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnten aufgrund der begrenzten Projektlaufzeit nicht durchgeführt werden.

### II.1.6 Kultivierungsarbeiten zur Bakterienisolierung aus einem mesophilen Labor-Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung 8,5 g<sub>oS</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)

Der mesophile Rührkessel-Reaktor betrieben mit 10% Maissilage und 90% Rinder-/Schweinegülle (Anteile bezogen auf die organische Trockensubstanz) und einer Raumbelastung von 8,5 g<sub>oS</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> zeichnete sich durch eine erhöhte Propionsäurekonzentration aus, wobei die Prozessparameter inklusive der Biogasausbeute in einem sehr guten Bereich lagen. Zur Bakterienisolierung aus diesem Reaktor wurden Vereinzelungsausstriche auf BBL™ Columbia Agar (Fa. Th. Geyer) mit 5% Pferdeblut (Fa. Oxoid) durchgeführt, da sich dieses Medium bei den unter Punkt II.1.4 beschriebenen Kultivierungsarbeiten als das für die meisten Isolate geeignetste Medium herausgestellt hatte. Dem Medium wurden außerdem 1,7 g L<sup>-1</sup> Na-Propionat zugesetzt, was der im Reaktor gemessenen Konzentration entsprach.

**Tabelle 11:** Übersicht über die gewonnenen Isolate aus dem mesophilen Rührkessel-Reaktor (Raumbelastung 8,5 g<sub>oS</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

Isolatbezeichnung	Taxonomische Einordnung (Klasse)	Nächster Verwandter auf Artebene	Sequenzähnlichkeit (16S rRNA Gen)	Anzahl der Isolate
ING2-E5C	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces</i> spp.	90%	2
ING2-D1F	<i>Bacilli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	99,9%	1
ING2-D5A		<i>Streptococcus</i> spp.	98,5%	5
ING2-E1D		<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	99,5%
ING2-E5A	<i>Clostridia</i>	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	97%	5
ING2-E5B		<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	94,2%	2
ING2-D1D		<i>Peptostreptococcus russellii</i>	99,6%	3
ING2-D1G		<i>Peptoniphilus</i> spp.	92%	1
ING2-E1C		<i>Clostridium bifermentans</i>	99,8%	1
ING2-D1E		<i>Clostridium</i> spp.	99,9%	4
ING2-E5F		<i>Eisenbergiella tayi</i>	97,3%	1
ING2-E1K		<i>Clostridium aminovalericum</i>	91%	3

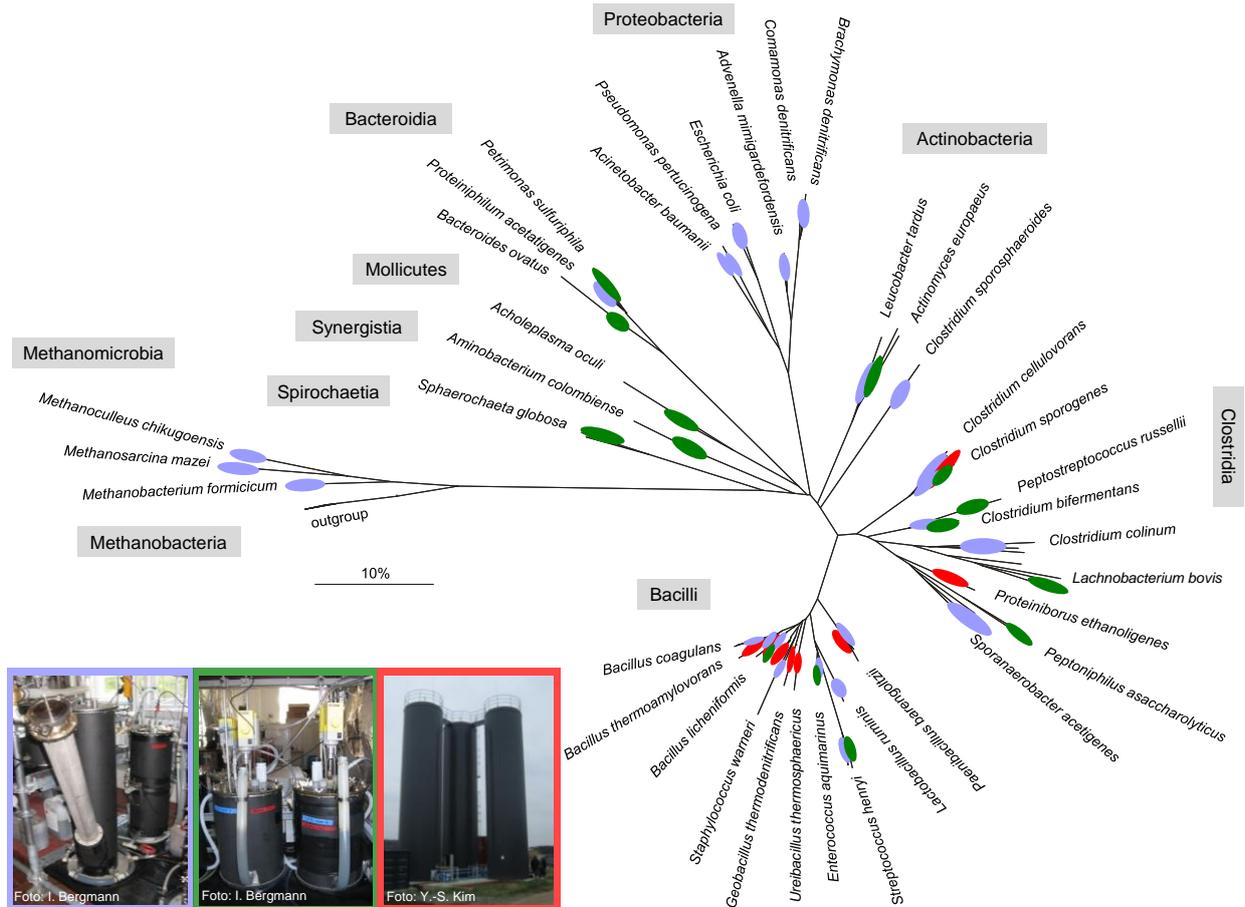
Insgesamt wurden aus diesem Biogasreaktor 29 Isolate von 12 verschiedenen Stämmen gewonnen (**Tabelle 11**). Legt man den Richtwert von >3% Sequenzunterschied im 16S rRNA Gen als Artgrenze zugrunde (GEVERS *et al.* 2005), so repräsentieren davon vier Isolate neue Arten bzw. Gattungen. Für das Isolat ING2-E5A, das zum nächsten Verwandten 97% Sequenzunterschied aufwies, konnte mittels der DNA-DNA Hybridisierung ebenfalls eine Artabgrenzung erfolgen. Dieser Stamm wurde im Rahmen dieses Projekts als neue Art der Gattung *Petrimonas* beschrieben, das Isolat ING2-E5B wurde als neue Art einer neuen Gattung charakterisiert (s. Kapitel II.1.9). Für die Genomsequenzierung wurden die Isolate ING2-D1G, -E5A, -E5B und -E5F ausgewählt.

### II.1.7 Diversität aller gewonnenen Isolate

Mittels anaerober Kultivierung in Flüssigmedium (Hungate-Technik), auf Agarplatten und in Tiefagarverdünnungskulturen und durch die Verwendung diverser Medien und Substratkombinationen wurden aus vier verschiedenen Biogasreaktoren insgesamt 197 Isolate verschiedener Bakterien und Archaeen gewonnen, die insgesamt 64 verschiedenen Arten und Stämmen aus 10 phylogenetischen Klassen zuzuordnen sind (**Abbildung 11**). Davon waren mindestens 15 Isolate repräsentativ für bisher unbekannte Arten.

### II.1.8 Genomsequenzierungen für den Aufbau einer Referenzdatenbank zur Erschließung kultivierungsunabhängig erzeugter Sequenzdaten

Grundsätzlich dienen mikrobielle Genome als Referenzen für kultivierungsunabhängig erzeugte Sequenzdaten (Metagenom- und Metatranskriptomdaten), also solchen Daten, die zur Aufklärung von Struktur, Dynamik und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasreaktoren dienen. Darüber hinaus liefern mikrobielle Genome Informationen über das metabolische Potenzial der einzelnen Mikroorganismen und somit über deren Funktion innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen.



**Abbildung 11:** Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. Die Positionen der gewonnenen Isolate sowie deren Ursprung sind farblich gekennzeichnet. Lila: zweistufiger Aufstrom-Reaktor (Maissilage, Weizenstroh; 37°C); grün: Rührkessel-Reaktor (Rinder- und Schweinegülle, Maissilage; 37°C); rot: thermophile Praxisanlage am Standort Viersen.

Seitens des ATB wurden 11 Isolate zur Sequenzierung des jeweiligen Genoms durch den Projektpartner CeBiTec ausgewählt (**Tabelle 12**). Bei der Auswahl der Isolate wurde darauf geachtet, dass es sich um solche Mikroorganismen handelt, von denen bislang noch keine Genomsequenzen existieren und die möglichst schon mehrfach in Biogasreaktoren oder ähnlichen methanogenen Habitaten gefunden bzw. nachgewiesen wurden. Dazu wurden die 16S rRNA Gensequenzen der Isolate mit den Sequenzen aus der GenBank Datenbank des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen und die nächsten Verwandten und deren Herkunft überprüft.

Die Genomsequenzierung der Isolate *Clostridium bornimense* M2/40, ING2-E5B und ING2-D1G wurde abgeschlossen. In Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec wurden hierzu entsprechende Bekanntmachungen („Genome Announcements“) publiziert (HAHNKE *et al.* 2014b & 2015a, TOMAZETTO *et al.* 2014). Die Sequenzen wurden in der öffentlich zugänglichen EMBL Datenbank des European Molecular Biology Laboratory hinterlegt. Das Genom von *C. bornimense* M2/40 wurde seitens des CeBiTec vollständig annotiert (d. h. jedes einzelne Gen wurde mit den bekannten Genen aus öffentlichen

Datenbanken abgeglichen und soweit möglich entsprechenden Funktionen zugeordnet) und im Hinblick auf das Stoffwechselfpotential des Mikroorganismus‘ ausgewertet (TOMAZETTO *et al.* 2015). Die rekonstruierten Stoffwechselwege in Kombination mit den am ATB experimentell festgestellten physiologischen Eigenschaften, klassifizieren den Stamm M2/40 als Zucker fermentierendes, organische Säuren produzierendes, acidogenes Bakterium.

**Tabelle 12:** Seitens des ATB im Rahmen von Teilprojekt 1 ausgewählte Isolate für die Referenzdatenbank für den Kernbestand an Mikroorganismen in Biogasanlagen.

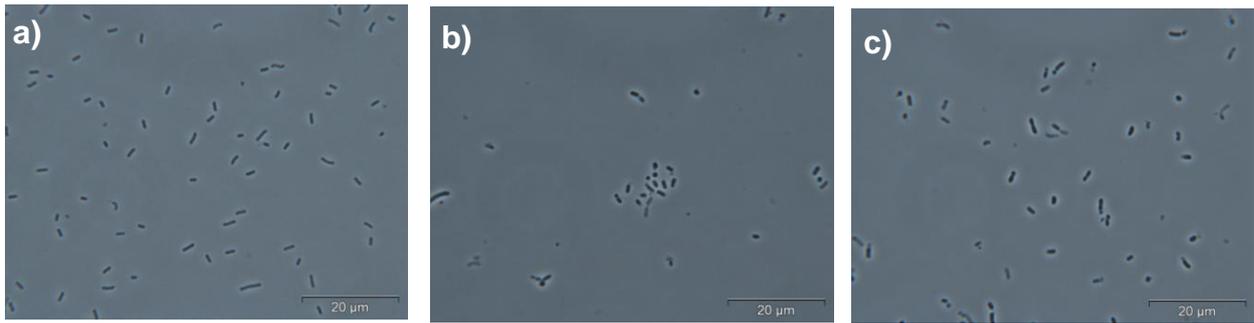
Isolat-bezeichnung	Taxonomische Einordnung (Klasse)	Nächster Verwandter auf Artebene	Sequenzähnlichkeit (16S rRNA Gen)
ING2-E5A	<i>Bacteroidia</i>	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	97%
ING2-E5B	<i>Bacteroidia</i>	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	94,2%
ING2-D1G	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	91%
ING2-E5F	<i>Clostridia</i>	<i>Eisenbergiella tayi</i>	91%
M3/3	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	96%
M3/6	<i>Bacteroidia</i>	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	97,3%
M3/9	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium propionicum</i>	91%
M2/40*	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium cellulovorans</i>	93,8
N3C	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium</i> spp.	94%
PP17-6a	<i>Clostridia</i>	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	91%
L21-II-0	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	99,5%

\*Das Isolat wurde bereits als neue Bakterienart der Gattung *Clostridium* beschrieben (HAHNKE *et al.* 2014a).

Die manuelle Annotation des gesamten Genoms des Isolats ING2-E5B ist am ATB erfolgt, das Isolat ING2-D1G wurde am CeBiTec annotiert. Die Auswertung beider Genome einschließlich unterstützender Experimente zur Bakterien-Physiologie soll über das BIOGAS-CORE Projekt hinaus in Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec erfolgen.

### II.1.9 Charakterisierung neuer *Porphyromonadaceae*-Arten

Aus den mesophilen Rührkessel- und Aufstrom-Reaktoren wurden drei Stämme aus der Familie *Porphyromonadaceae* (Klasse *Bacteroidia*, Phylum *Bacteroidetes*) isoliert, die bislang unbekannte Bakterienarten repräsentierten - Isolat M3/6, ING2-E5A und ING2-E5B (**Abbildung 12**). Im Rahmen des BIOGAS-CORE Projekts wurden diese Stämme als neue Arten der Gattungen *Proteiniphilum* und *Petrimonas* sowie als neue Art einer neuen Gattung beschrieben.



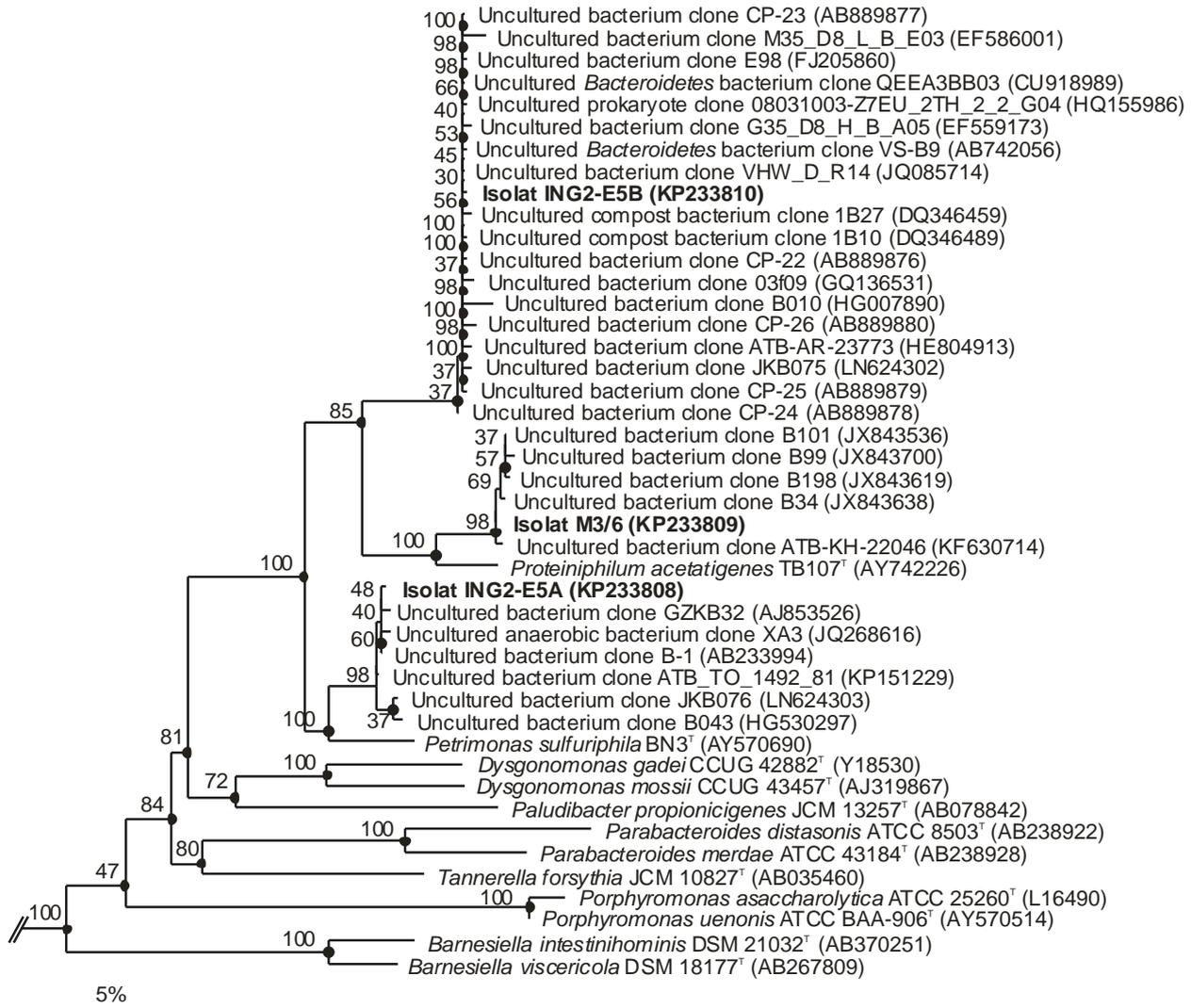
**Abbildung 12:** Mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen von Reinkulturen der *Porphyromonadaceae*-Isolate: a) Isolat M3/6, b) Isolat ING2-E5A und c) Isolat ING2-E5B.

Kultivierungsunabhängige Analysen mikrobieller Gemeinschaften in Biogasreaktoren zeigten, dass Vertreter des Phylums *Bacteroidetes* oft die zweitgrößte Gruppe der gesamten Mikroorganismen ausmachen. In manchen Reaktoren wurden *Bacteroidetes* sogar als vorherrschendes Phylum beschrieben (HANREICH *et al.* 2013, KLANG *et al.* 2015, KRÖBER *et al.* 2009, RADEMACHER *et al.* 2012, SCHLÜTER *et al.* 2008, ST-PIERRE & WRIGHT 2014, THEUERL *et al.* 2015, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012, ZIGANSHIN *et al.* 2013). *Bacteroidetes* repräsentieren eine physiologisch heterogene Gruppe, deren Vertreter diverse physiologische Eigenschaften aufweisen, wie z. B. die Fähigkeit zur Hydrolyse von Polysacchariden und Proteinen, die Fermentation von Zuckern sowie die Produktion von Säuren wie z. B. Essigsäure, Propionsäure, Bernsteinsäure oder Buttersäure (KRIEG *et al.* 2010). Aufgrund dieser bereits bekannten physiologischen Eigenschaften der *Bacteroidetes* scheinen die Vertreter dieser Gruppe in Biogasreaktoren eine bedeutende Rolle während des anaeroben Abbaus von Pflanzenmaterial zu spielen, insbesondere bei der primären Spaltung von langkettigen Polymeren (Hydrolyse) und der anschließenden Produktion flüchtiger Fettsäuren (Acidogenese).

Die Familie *Porphyromonadaceae* innerhalb der *Bacteroidetes* weist viele, überwiegend aber bislang unkultivierte Bakterien auf, die in verschiedenen Biogasreaktoren und anderen methanogenen Habitaten kultivierungsunabhängig detektiert wurden. Diese Nachweise zeigen die größte Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Arten *Proteiniphilum acetatigenes* und *Petrimonas sulfuriphila* (KAMPMANN *et al.* 2012, 2014, KLANG *et al.* 2015, KRAUSE *et al.* 2008, LI *et al.* 2009, LIU *et al.* 2009, THEUERL *et al.* 2015, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012). Einige dieser Bakterien bilden in phylogenetischen Bäumen Cluster mit den in dieser Studie gewonnenen Isolaten M3/6, ING2-E5A und ING2-E5B (**Abbildung 13**), wobei diese Isolate derzeit die einzigen isolierten Vertreter dieser taxonomisch unbekannteren Gruppen sind.

Das häufige Vorkommen der Mikroorganismen weist darauf hin, dass es sich um bedeutende Vertreter der mikrobiellen Gemeinschaften handelt, die an Biomethanisierungsprozessen beteiligt sind. Aufgrund dieser Relevanz wurden die neuen *Porphyromonadaceae*-Isolate detailliert hinsichtlich ihrer physiologischen Leistung untersucht. Ebenfalls wurden ausführliche Artbeschreibungen angefertigt. Ferner wurden die Mikroorganismen in öffentlichen Stammsammlungen hinterlegt, um sie für die wissenschaftli-

che Gemeinschaft verfügbar zu machen. Da Referenzgenome zu diesen Organismen bisher nicht vorlagen, wurden alle drei Isolate vom Projektpartner CeBiTec genomsequenziert.



**Abbildung 13:** Phylogenetischer Neighbour-Joining Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. Der Baum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse einiger Vertreter der Familie *Porphyromonadaceae* und der Isolate M3/6, ING2-E5A und ING2-E5B mit nah verwandten Vertretern aus methanogenen Habitaten. Hierbei sind nur nicht-redundante verwandte Sequenzen >99% aus der NCBI-Datenbank gezeigt, die ein Cluster mit den neuen Isolaten bildeten. Bootstrap-Werte stammen aus der Berechnung von 1.000 Replikaten. Schwarze Kreise markieren Knotenpunkte, die mittels der Maximum-Likelihood Methode reproduziert werden konnten. Die Sequenz von *Escherichia coli* (X80725) wurde als Outgroup verwendet (nicht dargestellt). Maßstab: 5% Sequenzunterschied.

### **Isolierung und routinemäßige Kultivierung der Porphyromonadaceae Stämme**

Das Isolat M3/6 stammt aus dem mesophilen zweistufigen Aufstrom-Reaktor (Kapitel II.1.4, Reaktor 2). Zur Isolierung wurde 10fach verdünnte Reaktorflüssigkeit auf BBL™ Columbia Agar Medium (Becton Dickinson) mit 5% Pferdeblut ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Gebildete Kolonien wurden auf frischem Medium in Vereinzelungsausstichen weiter kultiviert. Nach mehreren Wiederholungen wurde die Reinheit der Kultur mikroskopisch und mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) überprüft. Die Stämme ING2-E5A and ING2-E5B wurden aus einer 10<sup>5</sup>-fachen Verdünnung der Reaktorflüssigkeit aus dem mesophilen Rührkessel-Reaktor mit einer Raumbelastung von 8,5 g<sub>OS</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> isoliert (Kapitel II.1.4, Reaktor 3). Zur Kultivierung bei 37°C wurde BBL™ Columbia Agar Medium mit 5% Pferdeblut und 1,7 g L<sup>-1</sup> Natrium-Propionat verwendet. Alle Agarplatten wurden unter oxischen Bedingungen hergestellt, in die Anaerobierbank transferiert (Whitley MG 500, Meintrup DWS Laborgeräte) und in dem anoxischen Milieu für mindestens 24 Stunden gelagert, bevor sie für Ausstriche verwendet wurden.

Nach der Isolierung der Organismen erfolgte die routinemäßige Kultivierung der Organismen in Basalmedium mit folgender Zusammensetzung (L<sup>-1</sup>): 0,8 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 g NaCl; 0,1 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,1 g KCl; 10 mL Spurenelementlösung (lt. DSMZ Medium 318); 0,5 g Cysteine-HCl x H<sub>2</sub>O und 1 mg Resazurin. Vor dem Autoklavieren wurde der pH Wert mit NaOH auf 7 eingestellt, und das Medium wurde in Hungate-Röhrchen mit N<sub>2</sub>-Atmosphäre abgefüllt. Nach der Sterilisation wurde das Medium mit einer Vitaminlösung (lt. DSMZ Medium 141) und mit Vitamin K1 und Hämin (lt. DSMZ Medium 104) versetzt. Die Konzentrationen der zugegebenen Substrate variierten leicht je nach Kultivierungszweck und sind im Folgenden für die jeweiligen Analysen angegeben.

### **Molekularbiologische Identifizierung der Isolate, DNA-DNA Hybridisierung zur phylogenetischen Abgrenzung der Arten und G+C Gehaltsbestimmung**

Zur Identifizierung der Isolate wurde jeweils das 16S rRNA Gen mittels PCR und den für Bakterien universellen Primern 27F und 1492R amplifiziert. Die Nukleotidsequenz der Amplifikate wurde von der Firma GATC Biotech ermittelt. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen erfolgte mittels Stammbaum- und Ähnlichkeitsberechnungen mit dem Phylogenieprogramm ARB (<http://www.arb-home.de> [LUDWIG *et al.* 2004]). Die Bestimmung des genomischen G+C Gehalts sowie die DNA–DNA Hybridisierung der Isolate M3/6 und ING2-E5A mit ihren jeweils nächsten beschriebenen Verwandten *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> (=DSM 18083<sup>T</sup>) und *Petrimonas sulfuriphila* BN3<sup>T</sup> (=DSM 16547<sup>T</sup>) wurde vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) durchgeführt. Hierzu wurden die Referenzorganismen von der DSMZ bezogen und die Mikroorganismen kultiviert. Anschließend wurde die für die DNA–DNA Hybridisierung benötigte Biomasse dem Identifizierungsservice der DSMZ bereitgestellt.

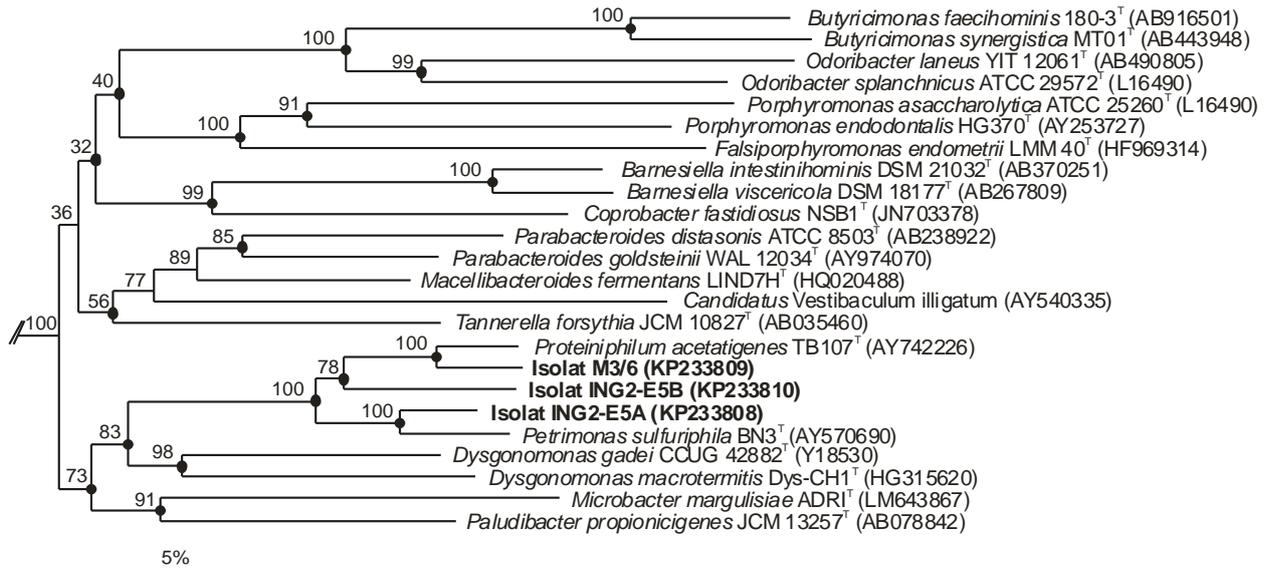
16S rRNA Gensequenzanalysen zeigten, dass der Stamm M3/6 mit 97,3% Sequenzähnlichkeit die engste Verwandtschaft zu *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> aufwies. Die DNA–DNA Hybridisierung ergab 43,3 bis 45,6% Hybridisierung der Genome beider Mikroorganismen.

Der Stamm ING2-E5A zeigte den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *Petrimonas sulfuriphila* BN3<sup>T</sup> mit 97% 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit und DNA–DNA Hybridisierungswerte mit *P. sulfuriphila* von 23,8 bis 25,7%.

In phylogenetischen Bäumen zeigten beide Isolate Clusterbildung mit den jeweiligen nächsten Verwandten (**Abbildung 14**). Laut geltender taxonomischer Richtlinien für Prokaryoten weist ein Unterschied von mehr als 3% in der 16S rRNA Gensequenz zweier Stämme darauf hin, dass es sich um verschiedene Arten handelt (GEVERS *et al.* 2005). Bei 16S rRNA Gensequenzähnlichkeiten von  $\geq 97\%$  müssen zusätzliche Analysen, wie z. B. eine DNA–DNA Hybridisierung, durchgeführt werden, um eine Artabgrenzung oder -zugehörigkeit ermitteln zu können. Da bei der DNA–DNA Hybridisierung komplette Genome miteinander verglichen werden, bietet diese Methode eine entsprechend höhere „Auflösung“ als der Sequenzvergleich eines einzelnen Gens (ROSSELLÓ-MORA & AMANN 2001, TINDALL *et al.* 2010). Ein Hybridisierungswert von  $\geq 70\%$  wurde festgelegt, um zwei Mikroorganismen als Stämme ein und derselben Art zu definieren (BRENNER 1973, JOHNSON 1984, WAYNE *et al.* 1987). Die neuen Isolate M3/6 und ING2-E5A können demnach von den nächst verwandten beschriebenen Arten eindeutig abgegrenzt und als neue Arten beschrieben werden.

Der Stamm ING2-E5B zeigte mit 94,5% die größte 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zu *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> (und 94,1% zu *Petrimonas sulfuriphila*). Mit 5,5% Sequenzunterschied liegt der Wert jenseits der Artgrenze und im Stammbaum bildet das Isolat einen Ast nächst zu der Gattung *Proteiniphilum* (**Abbildung 14**).

Die genomischen G+C Gehalte der Stämme M3/6, ING2-E5A und ING2-E5B lagen bei 45,1, 48,2 bzw. 38,2 mol% (HPLC).



**Abbildung 14:** Phylogenetischer Neighbour-Joining Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. Der Baum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate M3/6, ING2-E5A und ING2-E5B innerhalb der Familie *Porphyromonadaceae*. Bootstrap-Werte stammen aus der Berechnung von 1.000 Replikaten. Schwarze Kreise markieren Knotenpunkte, die mittels der Maximum-Likelihood Methode reproduziert werden konnten. Die Sequenz von *Bacteroides fragilis* (CR626927) wurde als Outgroup verwendet (nicht dargestellt). Maßstab: 5% Sequenzunterschied.

### **Ermittlung von Temperatur-, pH- sowie NaCl-Toleranzbereichen und -Optima und Untersuchung der Substratverwertung**

Die Temperaturprofile der Isolate wurden in Basalmedium mit 0,2% Hefeextrakt und 10 mM Glucose bei 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 und 55°C bestimmt. Die pH-Toleranz wurde in dem Basalmedium mit Zugabe von 10 mM verschiedener Puffer (MES, HEPES, TAPS, und CHES) untersucht. pH-Werte von 3,5, 5,4, 5,7, 6,3, 6,6, 7,1, 7,5, 7,8, 8,6, 9,1 und 9,9 wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Die Untersuchung der NaCl-Toleranz erfolgte ebenfalls in Basalmedium mit Hefeextrakt und Glucose, wobei in dem Medium unterschiedliche NaCl Konzentrationen eingestellt wurden (0, 0,55, 1, 2, 3, 4 and 5%) unter Beibehaltung der anderen im Medium enthaltenen Salze. Die Verwertung verschiedener Substrate wurde in Basalmedium unter Zugabe von 0,2% Hefeextrakt getestet. Einzelne Substrate wurden von sterilen Stammlösungen in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Monosaccharide (20 mM), Disaccharide und Ethanol (10 mM), lösliche Stärke (0,16 g L<sup>-1</sup>), Proteosepepton (Carl Roth) und Trypton (Pepton aus Casein [Merck]) (2 g L<sup>-1</sup>). Wachstum auf Proteosepepton und Trypton wurde auch ohne Zugabe von Hefeextrakt getestet. Wachstum auf Aminosäuren wurde in einem Gemisch aus 20 Aminosäuren untersucht (je Aminosäure 2,5 mM). Die Tests wurden jeweils in Duplikaten angesetzt und mit einer auf Columbia Blutagar gewachsenen Vorkultur beimpft. Zellkulturen mit 0,2% Hefeextrakt dienten als Negativkontrollen. Zellwachstum bei 37°C wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) verfolgt.

Die Substratverwertung wurde als negativ gewertet, wenn das Wachstum geringer oder genauso groß war wie das Wachstum in der Negativkontrolle.

Die Temperaturprofile der Isolate zeigten, dass die Stämme M3/6 und ING2-E5B im Temperaturbereich von 15 bis 45°C wuchsen mit einem Optimum bei 35 bis 40°C bzw. 37 bis 40°C. Der Stamm ING2-E5A zeigte Wachstum bei 20 bis 50°C und ein Optimum bei 45°C. Alle drei Stämme wuchsen bei pH-Werten zwischen 6,3 und 9,1, optimales Wachstum erfolgte bei pH 7,5 bis 7,8 bzw. 7,1 (**Tabelle 8**). Stamm M3/6 wuchs bei NaCl-Konzentrationen von 0 bis 5% mit einem Optimum bei 0,55 bis 1%. Die Stämme ING2-E5A und ING2-E5B wuchsen nur bei geringerem NaCl-Gehalt (0 bis 2% bzw. 0 bis 1%) mit einem Optimum bei 0%. Auf Columbia Blutagar wuchsen alle drei Isolate sowohl strikt anaerob als auch unter Luftsauerstoff, d. h. sie sind als fakultativ anaerob einzuordnen. Alle drei Isolate zeigten sehr ähnliche Substratspektren. Wachstum wurde sowohl durch Mono- und Disaccharide gefördert als auch durch Stärke und komplexe proteinreiche Substrate wie Hefeextrakt und Pepton (**Tabelle 8**). Auf einzelnen Substraten ohne Zugabe von Hefeextrakt zeigten alle Stämme nur schwaches Wachstum.

Für *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> wurde in der Literatur beschrieben, dass dieser Mikroorganismus keine Zucker verwerten kann (CHEN & DONG 2005). In dieser Studie wurde das Wachstum des Bakteriums jedoch durch alle getesteten Mono- und Disaccharide (Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose) stimuliert. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann durch Unterschiede in der Testmethode erklärt werden: Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde die Substratverwertung unter Zugabe von Hefeextrakt getestet, wohingegen CHEN & DONG nur Wachstum auf Einzelsubstraten untersucht haben. Wahrscheinlich können einzelne Zucker nicht als einzige Kohlenstoffquelle dienen, jedoch mit anderen Verbindungen zusammen co-metabolisiert werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass durch das zugegebene Hefeextrakt Wachstumsfaktoren wie Vitamine oder Spurenelemente bereitgestellt werden, die für den Organismus essentiell sind, jedoch nicht im reinen Medium enthalten sind.

### **Extrazelluläre Enzymaktivitäten**

Extrazelluläre Enzymaktivitäten der Stämme wurden von dem Projektpartner TUM mit den dort etablierten Methoden analysiert. Dazu wurden die Isolate bei 37°C in GS2 Medium (KOECK *et al.*, 2014) mit Zugabe von 0,5% Glucose kultiviert und abzentrifugiert (5.000 g, 30 min, 4°C). Die Proteine >10.000 Dalton wurden aus dem Überstand mittels Vivaspin 500 Ultrafiltration Spin Säulen (Sartorius) aufkonzentriert. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bradford Protein Assay Kits (Thermo Scientific) bestimmt. Zur Messung von Enzymaktivitäten wurden die Ansätze wie bei KOECK *et al.* (2014) beschrieben mit 10 µl Proteinlösung (0,1–0,4 µg µl<sup>-1</sup> Protein) in Triplikaten angesetzt und bei 37°C für 24 h inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse der eingesetzten Substrate (s. **Tabelle 8**) wurde anhand der Quantifizierung reduzierender Zucker gemessen, die

durch die Spaltung von Polysacchariden freigesetzt werden. Die Messung der Zucker erfolgte mittels eines DNSA Assays nach MILLER (1959). Enzymatischer Abbau von Cellobiose, Lactose und Stärke wurde anhand freigesetzter D-Glucose mittels des D-Glucose Assay Kits (Megazyme) gemessen.

Alle drei Isolate zeigten schwache extrazelluläre Enzymaktivität beim Abbau von Cellobiose, Stärke, Arabinogalactan, Carboxymethylcellulose (CMC) und von mittels Phosphorsäure aufgequollener Cellulose (PASC). Keiner der Stämme hydrolysierte kristalline Cellulose (Avicel). Stamm M3/6 zeigte leicht erhöhte Hydrolyse von  $\beta$ -Glucan, Stamm ING2-E5A von Lactose und Stamm ING2-E5B von Xylan und Arabinoxylan (**Tabelle 13**).

**Tabelle 13:** Charakteristika der neuen Isolate und ihrer nächsten beschriebenen Verwandten. Soweit nicht anders gekennzeichnet, basieren die Daten für *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> auf CHEN & DONG (2005) und die Daten für *Petrimonas sulfuriphila* BN3<sup>T</sup> auf GRABOWSKI *et al.* (2005). +, positives Resultat bzw. Wachstum; -, negatives Resultat bzw. kein Wachstum; w, schwaches Wachstum (OD<sub>600</sub> ≤ 0,2) oder schwache Reaktion (in Bezug auf die Enzymaktivitäten <0,1 U mg<sup>-1</sup>); nb, nicht bestimmt.

	M3/6	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> TB107 <sup>T</sup>	ING2-E5B	ING2-E5A	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> BN3 <sup>T</sup>
G+C (mol%)	45,1	46,6	38,2	48,2	40,8
Katalase	+	- [+]*	+	+	+
Oxidase	w	-	w	w	+
Temperaturbereich (°C)	25-40	20-45	25-40	25-40	15-40
Temperaturoptimum (°C)	35-40	37	37	40-45	37-40
pH-Bereich	6,3-9,1	6,0-9,7	6,3-9,1	6,3-9,1	nb
pH-Optimum	7,5-7,8	7,5-8,0	7,1	7,5-7,8	nb
NaCl-Bereich (%)	0-5	0-5	0-1	0-2	0-4
NaCl-Optimum (%)	0-3	nb	0	0	0
<b>Wachstum auf:</b>					
Hefeextrakt	+	+	+	+	+
Pepton	w	+	w	w	-
Pepton als Einzelsubstrat	-	+	w	-	nb
Trypton als Einzelsubstrat	-	w	w	-	nb
Pepton + Trypton	w	nb	w	w	nb
Ethanol	-	-	-	-	-
Mix aus 20 Aminosäuren	w	nb	-	-	nb
Arabinose	+	- [+]*	-	-	+
Cellobiose	+	- [+]*	+	+	+
Fructose	+	- [+]*	+	+	+
Galactose	+	- [+]*	+	+	+
Glucose	+	- [+]*	+	+	+
Lactose	+	- [+]*	+	+	+
Maltose	+	- [+]*	+	+	+
Mannose	+	- [+]*	+	+	+
Rhamnose	+	- [+]*	+	+	+
Sucrose	+	- [+]*	+	+	+
Trehalose	+	- [+]*	+	+	nb
Stärke	w	nb	w	w	nb
Fermentationsprodukte†	E, P, v, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	E, P	E, P, CO <sub>2</sub> , (v, H <sub>2</sub> )	E, P, v, CO <sub>2</sub> , (b, H <sub>2</sub> )	E, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<b>Extrazelluläre Enzymaktivität:</b>					
Cellobiose	w	nb	w	w	nb
Lactose	w	nb	w	+	nb
Stärke	w	+	w	w	nb
Arabinogalactan	w	nb	w	w	nb
Arabinoxylan (mittlere Viskosität)	w	nb	+	w	nb
Xylan (aus Laubholz)	w	nb	+	w	nb
Cellulose (Avicel)	-	nb	-	-	nb
Carboxymethylcellulose (CMC)	w	nb	w	w	nb
PASC (mittels Phosphorsäure aufgequollen Cellulose)	w	nb	w	w	nb
β-Glucan	+	nb	w	w	nb

\* Daten aus dieser Studie.

† Kleine Buchstaben geben geringe Konzentrationen an, Produkte in Klammern wurden nur in Spuren detektiert. E, Essigsäure; P, Propionsäure; v, Isovaleriansäure; b, Buttersäure.

### **Messung der bakteriellen Fermentationsprodukte**

Für die Analyse von Fermentationsprodukten wurden die Stämme in Basalmedium mit Hefeextrakt und Proteosepepton (jeweils 0,5%) einmal mit und einmal ohne Zusatz von 20 mM Glucose kultiviert. Die Ansätze erfolgten in Duplikaten, Medium ohne Zellen diente als Negativkontrolle. Wasserstoff und CO<sub>2</sub> in der Gasphase der Kulturen wurden mit einem Shimadzu GC-2014 Gaschromatographen mit den Chromatographiesäulen HayeSep D 80/100 (4 m x 1/8" x 2,1 mm SS; Supelco) und MS-5A 60/80 (2,5 m x 1/8" x 2,1 mm, SS; Supelco) gemessen. Trägergas war Stickstoff bei einer Flussrate von 25 mL min<sup>-1</sup>. Wasserstoff und CO<sub>2</sub> wurden mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) bzw. einem Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert. Methanol, Ethanol und Propanol sowie die Carbonsäuren Propionsäure, Essigsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Isovaleriansäure und Capronsäure wurden nach Abzentrifugation der Zellen im Mediumüberstand mit einem Agilent 7890A Gaschromatographen gemessen. Dazu wurden die Proben mit Phosphorsäure (0,85% final) angesäuert, die Auftrennung und Detektion der Capronsäuren erfolgte durch eine Permabond FFAP Chromatographiesäule (30 m x 0,32 mm, 0,5 µm; Macherey-Nagel) bzw. einen Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 3,4 mL min<sup>-1</sup> verwendet. Messungen von Formiat und Lactat wurden mit einem Dionex UltiMate 3000 Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) mit einer Eurokat H Säule (300 x 8 mm, 10 µm; Knauer) aufgetrennt und anschließend mittels Shodex RI-101 Brechungsindexdetektor erfasst. Schwefelsäure (0,01 M) diente als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,8 mL min<sup>-1</sup>.

Nach Wachstum auf Hefeextrakt und Pepton produzierten die Stämme M3/6 und ING2-E5A Propionsäure, Essigsäure, CO<sub>2</sub> und geringere Konzentrationen an Isovaleriansäure und H<sub>2</sub>, wobei Stamm ING2-E5A lediglich Spuren von H<sub>2</sub> produzierte. Stamm ING2-E5B produzierte Essigsäure, geringere Mengen an Propionsäure und CO<sub>2</sub> sowie Spuren von Isovaleriansäure und H<sub>2</sub>. Nach Zugabe von Glucose produzierte Stamm M3/6 Essigsäure, Propionsäure, CO<sub>2</sub> und Spuren von H<sub>2</sub>. Stamm ING2-E5A hingegen produzierte Essigsäure und geringere Mengen an Propionsäure, Isovaleriansäure und CO<sub>2</sub> sowie Spuren von Buttersäure. Für Stamm ING2-E5B wurden Essigsäure, Propionsäure und CO<sub>2</sub> sowie Spuren von H<sub>2</sub> detektiert.

### **Biochemische Tests und morphologische Untersuchung**

Zur morphologischen Untersuchung der Zellen der Mikroorganismen sowie für die Gramfärbung und Cytochromoxidase- und Katalase-Tests wurden Zellen in Basalmedium mit Hefeextrakt und Proteosepepton (je 0,5%) und 20 mM Glucose angezogen. Die Zellen wurden mit einem Optiphot-2 Mikroskop (Nikon) im Phasenkontrast bei einer 630fachen Vergrößerung vermessen. Die Gramfärbung wurde nach CLAUS (1992) durchgeführt. Die Cytochromoxidase-Reaktion wurde mit 20 µl einer dichten Zellsuspension mittels Oxidase Test Disks (Fluka) getestet. Der Katalase-Test wurde basierend

auf SMIBERT & KRIEG (1994) durchgeführt. Vor der Zugabe von 0,5 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu demselben Volumen Zellkultur wurden die Zellen für 1 h Luftsauerstoff ausgesetzt.

Alle Isolate färbten sich Gram-negativ und wiesen Katalase- und schwache Oxidase-Aktivität auf. Die Zellen waren stäbchenförmig. Die Bildung von Sporen wurde nicht beobachtet. Die Zellgrößen sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

### **Chemotaxonomische Analysen**

Für die Analyse zellulärer Fettsäuren wurden die neuen Isolate und die Referenzorganismen *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> (= DSM 18083<sup>T</sup>) und *Petrimonas sulfuriphila* BN3<sup>T</sup> (= DSM 16547<sup>T</sup>) in anoxischem Basalmedium mit Hefeextrakt und Proteosepepton (je 0,5%) bei 37°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Für die Analyse der zellulären Chinone wurden die Isolate in demselben Basalmedium angezogen. *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> wurde in Caso Bouillon (Merck) mit 0,4% Hefeextrakt kultiviert. Die Analysen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH durchgeführt.

**Tabelle 14:** Zelluläre Fettsäuren der neuen Isolate im Vergleich zu denen der nächsten beschriebenen verwandten Arten. Angegeben sind prozentuale Anteile am Gesamtfettsäuregehalt. Es sind nur Fettsäuren aufgeführt, die in mindestens einem der Stämme >1% ausmachen, Werte >5% sind fett gedruckt. tr, trace = in Spuren detektiert (<0,5%); -, nicht detektiert.

Fettsäuren	M3/6	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> TB107 <sup>T</sup>	ING2-E5B	ING2-E5A	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> BN3 <sup>T</sup>
<b>Geradkettig</b>					
C <sub>14:0</sub>	1,0	Tr	<b>6,3</b>	3,6	1,2
C <sub>15:0</sub>	<b>6,8</b>	<b>9,4</b>	2,5	1,3	2,5
C <sub>16:0</sub>	2,7	3,2	1,7	1,0	1,5
C <sub>17:0</sub>	Tr	2,3	-	tr	tr
<b>Verzweigt</b>					
anteiso-C <sub>11:0</sub>	Tr	Tr	1,9	1,8	tr
iso-C <sub>12:0</sub>	Tr	0,5	2,0	0,6	1,2
iso-C <sub>13:0</sub>	0,6	Tr	<b>6,4</b>	2,0	2,2
anteiso-C <sub>13:0</sub>	2,3	1,6	<b>8,3</b>	<b>5,5</b>	<b>5,7</b>
iso-C <sub>14:0</sub>	4,7	4,0	<b>7,2</b>	<b>9,2</b>	<b>6,4</b>
iso-C <sub>15:0</sub>	<b>9,6</b>	<b>5,5</b>	<b>21,1</b>	<b>18,1</b>	<b>15,0</b>
anteiso-C <sub>15:0</sub>	<b>49,5</b>	<b>46,6</b>	<b>24,5</b>	<b>45,9</b>	<b>47,4</b>
iso-C <sub>16:0</sub>	1,7	1,9	tr	0,6	0,7
iso-C <sub>17:0</sub>	Tr	1,2	tr	tr	1,4
anteiso-C <sub>17:0</sub>	1,2	0,9	-	tr	1,1
<b>Hydroxy</b>					
iso-C <sub>15:0</sub> 3-OH	1,0	1,5	3,7	1,8	2,7
C <sub>15:0</sub> 3-OH	0,9	1,4	1,3	tr	tr
iso-C <sub>16:0</sub> 3-OH	4,3	<b>5,4</b>	1,9	1,8	1,6
C <sub>16:0</sub> 3-OH	1,9	0,8	3,0	1,3	0,8
iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	4,0	4,9	2,1	1,0	2,4
C <sub>17:0</sub> 2-OH	4,6	3,4	0,6	0,5	2,1
Sum In Feature 3*	tr	2,1	0,7	tr	0,6

\* Sum In Feature 3 enthält C<sub>16:1</sub> ω7c und/oder iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH

In den drei Isolaten und in *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> wurde als einziges Chinon Menachinon MK-8 detektiert, welches von GRABOWSKI *et al.* 2005 auch für *Petrimonas sulfuriphila* als vorherrschendes Chinon beschrieben wurde. Die zellulären Fettsäureprofile aller Stämme zeigten eine komplexe Mischung aus geradkettigen, verzweigten (iso- und anteiso-) und Hydroxy-Fettsäuren (**Tabelle 14**). In den neuen Isolaten bildete die Fettsäure anteiso-C<sub>15:0</sub> den größten Anteil. Dies ist ein Charakteristikum, das sie mit Arten aus mehreren Gattungen der Familie *Porphyromonadaceae* teilen, wohingegen Arten anderer Gattungen iso-C<sub>15:0</sub> als vorherrschende Fettsäure aufweisen.

Das Fettsäureprofil von Stamm M3/6 ähnelte dem des nächsten Verwandten *Proteiniphilum acetatigenes* (**Tabelle 9**). Neben der Fettsäure anteiso-C<sub>15:0</sub> (48,1 ± 1,5%) enthalten beide Stämme erhebliche Mengen an iso-C<sub>15:0</sub> (7,6 ± 2%) und C<sub>15:0</sub> (8,1 ± 1,3%), die am stärksten vertretenen Hydroxy-Fettsäuren waren iso-C<sub>16:0</sub> 3-OH (4,9 ± 0,5%) und C<sub>17:0</sub> 2-OH (4 ± 0,6%). Das Fettsäureprofil von Stamm ING2-E5A ähnelte dem des nächsten Verwandten *Petrimonas sulfuriphila*. Die in beiden Stämmen am stärksten vertretenen Fettsäuren waren anteiso-C<sub>15:0</sub> (46,7 ± 0,8%), iso-C<sub>15:0</sub> (16,6 ± 1,6%), iso-C<sub>14:0</sub> (7,8 ± 1,4%) und anteiso-C<sub>13:0</sub> (5,6 ± 0,1%).

Verglichen mit den Isolaten M3/6, ING2-E5B und *Proteiniphilum acetatigenes* enthielten die *Petrimonas* Stämme geringere Mengen an Hydroxy-Fettsäuren. Stamm ING2-E5B wies im Vergleich zu den anderen Isolaten erhebliche Unterschiede im Fettsäuremuster auf. Die Fettsäuren anteiso-C<sub>15:0</sub> und iso-C<sub>15:0</sub> waren zu fast gleichen Anteilen vorhanden (24,5 und 21,1%). Weitere abundante Fettsäuren waren anteiso-C<sub>13:0</sub> (8,3%), iso-C<sub>14:0</sub> (7,2%), iso-C<sub>13:0</sub> (6,4%) und C<sub>14:0</sub> (6,3%). Die hauptsächlichen Hydroxy-Fettsäuren waren iso-C<sub>15:0</sub> 3-OH (3,7%) und C<sub>16:0</sub> 3-OH (3%) (**Tabelle 9**).

### Zusammenfassung

Basierend auf 16S rRNA Gensequenzen ergab sich für die Stämme M3/6 und ING2-E5A eine enge Verwandtschaft zu *Proteiniphilum acetatigenes* bzw. *Petrimonas sulfuriphila* mit 97,3 bzw. 97% Sequenzähnlichkeit. DNA–DNA Hybridisierungen der Isolate mit ihrem jeweils nächsten Verwandten ergaben Hybridisierungswerte von <70%, was die Abgrenzung zweier Arten kennzeichnet (WAYNE *et al.* 1987). In Übereinstimmung mit physiologischen Unterschieden, geringen Abweichungen in den Fettsäureprofilen und im genomischen G+C Gehalt (**Tabelle 8** und **9**) unterstützen die Ergebnisse dieser Studie eine Abgrenzung der beiden Isolate zu ihren nächst verwandten beschriebenen Arten und deren Klassifizierung als neue Arten innerhalb der Gattungen *Proteiniphilum* und *Petrimonas*. Die Isolate M3/6 und ING2-E5A werden dementsprechend als *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov. und *Petrimonas mucosa* sp. nov. benannt und beschrieben.

Das Isolat ING2-E5B zeigte mit 5,5% 16S rRNA Gensequenzunterschied nur entfernte Verwandtschaft zu seinem nächsten Verwandten *Proteiniphilum acetatigenes*. Eine umfangreiche Studie von YARZA *et al.* (2008) zeigt auf, dass eine 16S rRNA Gensequen-

zähnlichkeit von <95% einen sinnvollen Schwellenwert für eine Gattungsabgrenzung bildet. Um einen neuen Mikroorganismus als neue Art einer neuen Gattung beschreiben zu können, müssen neben einem phylogenetischen Anhaltspunkt allerdings auch chemotaxonomische Charakteristika vorhanden sein, die eine eindeutige Abgrenzung zur nächsten beschriebenen Gattung zeigen. Innerhalb der Familie *Porphyromonadaceae* sind wesentliche chemotaxonomische Charakteristika die in den Zellen vorkommenden Chinone, die Zusammensetzung und die Anteile der einzelnen zellulären Fettsäuren sowie das Verhältnis der Fettsäuren anteiso-C<sub>15:0</sub> und iso-C<sub>15:0</sub> zueinander (**Tabelle 15**). Der Stamm ING2-E5B sowie die nächsten verwandten Gattung *Proteiniphilum* und *Petrimonas* weisen anteiso-C<sub>15:0</sub> als vorherrschende Fettsäure auf und Menachinon MK-8 als vorherrschendes Chinon. Das neue Isolat ING2-E5B weist jedoch ein etwas geringeres Verhältnis der Fettsäuren anteiso-C<sub>15:0</sub> zu iso-C<sub>15:0</sub> auf sowie generelle Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung.

**Tabelle 15:** Vergleich von Stamm ING2-E5B und verschiedenen Gattungen der Familie *Porphyromonadaceae* basierend auf gattungsspezifischen Merkmalen. Die Gattung *Proteiniphilum* beinhaltet Isolat M3/6, die Gattung *Petrimonas* beinhaltet Isolat ING2-E5A. Die Daten der verschiedenen Gattungen stammen von CHEN & DONG (2005), GRABOWSKI *et al.* (2005), KODAMA *et al.* (2012), PRAMONO *et al.* (2015), SAKAMOTO *et al.* (2002), SANCHEZ-ANDREA *et al.* (2014), UEKI *et al.* (2006), WAGENER *et al.* (2014), YANG *et al.* (2014); Fettsäuredaten von *Proteiniphilum* und *Petrimonas* basieren auf Analysen dieser Studie. nb, nicht bestimmt; na, nicht anwendbar, da die publizierten Fettsäureprofile innerhalb der Gattung erhebliche Unterschiede zueinander aufweisen, was darauf hinweist, dass die Gattung verschiedene Taxa enthält.

	ING2-E5B	<i>Proteiniphilum</i>	<i>Petrimonas</i>	<i>Dysgonomonas</i>	<i>Microbacter</i>	<i>Paludibacter</i>	<i>Tannerella</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Falsiporphyromonas</i>
G+C Gehalt (mol%)	38,2	45,1-48,9	40,8-48,2	37,5-41,8	39,9	39,3	44-48	40-55	40,7
Vorherrschende Fettsäure	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	anteiso-C <sub>15:0</sub>	iso-C <sub>15:0</sub> *	iso-C <sub>15:0</sub>
Weitere abundante Fettsäuren >5%	iso-C <sub>15:0</sub> , anteiso-C <sub>13:0</sub> , iso-C <sub>14:0</sub> , iso-C <sub>13:0</sub> , C <sub>14:0</sub>	iso-C <sub>15:0</sub> , C <sub>15:0</sub>	iso-C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>14:0</sub> , anteiso-C <sub>13:0</sub>	na	iso-C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH, iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH, anteiso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	C <sub>16:0</sub> 3-OH, C <sub>16:0</sub> , iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	na	anteiso-C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH, C <sub>16:0</sub> , C <sub>14:0</sub> , iso-C <sub>13:0</sub>
Verhältnis von anteiso-C <sub>15:0</sub> zu iso-C <sub>15:0</sub>	1,2	5,2-8,5	2,5-3,2	4,7-17,4	1,04	28	22,8-95,2	<1	<1
Vorherrschende Menachinone	MK-8	MK-8	MK-8	nb	MK-8, MK-9	MK-8	MK-10, MK-11	MK-9, MK-10	MK-8, MK-9

\* *Porphyromonas catoniae* enthält ungefähr gleiche Mengen an iso-C<sub>15:0</sub> und anteiso-C<sub>15:0</sub> und in *Porphyromonas bennonis* wurden iso-C<sub>15:0</sub> und anteiso-C<sub>15:0</sub> nur in Mengen <1% detektiert.

Die Fettsäureprofile der verschiedenen Arten einer Gattung zeigen hingegen sehr hohe Ähnlichkeiten zueinander (**Tabelle 9**). Im Allgemeinen weisen die Fettsäurezusammensetzungen innerhalb taxonomischer Gruppen nur unerhebliche Schwankungen auf (TINDALL *et al.* 2010). Die deutlichen Unterschiede im Fettsäureprofil von Stamm ING2-E5B im Vergleich zu den Arten der nächsten beschriebenen verwandten Gattungen lassen somit eine klare Abgrenzung des Organismus zu den Gattungen *Proteiniphilum* und *Petrimonas* erkennen. Verglichen mit den nächsten Verwandten zeigte der Stamm ING2-E5B außerdem einen geringeren G+C Gehalt. Basierend auf einer Kombination aus phylogenetischen, genotypischen und chemotaxonomischen Unterschieden kann der Stamm ING2-E5B deutlich von verwandten Gattungen abgegrenzt werden. Infolgedessen kann der in dieser Studie isolierte Stamm ING2-E5B als neue Art einer neuen Gattung mit dem Namen *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov. benannt und beschrieben werden.

Alle drei Isolate zeigten in der Laborkultur nur schwache hydrolytische Aktivitäten, so dass sie in Biogasreaktoren vermutlich nicht maßgeblich bei der Hydrolyse von Polymeren beteiligt sind. Die phänotypischen Eigenschaften der Organismen klassifizieren sie vielmehr als zuckerfermentierende, organische Säuren produzierende, acidogene Bakterien. Jedoch muss bei dieser Einschätzung berücksichtigt werden, dass die in einem natürlichen Habitat vorherrschenden Bedingungen sich nicht oder nur sehr schwer in einem Labor simulieren lassen. Das Wachstum bzw. die Stoffwechselaktivität der Isolate könnte daher in Biogasreaktoren gänzlich anders als in Laborkulturen ausfallen und sollte in einer gesonderten Studie untersucht werden. Insbesondere sollte hierbei die Interaktion der Isolate mit anderen Mikroorganismen untersucht werden

### **Beschreibung von *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov.**

*Proteiniphilum saccharofermentans* (sac.cha.ro.fer.men'tans. Gr. n. *skchâr* sugar; L. part. adj. *fermentans* fermentierend; N.L. part. adj. *saccharofermentans* zuckerfermentierend).

Die Zellen sind stäbchenförmig, 1,1 bis 4,4 µm lang und 0,6 bis 0,7 µm breit, vereinzelt kommen filamentöse Zellen bis zu 20 µm Länge vor. Nach zweitägigem anaerobem Wachstum bei 37°C auf Columbia Blutagar bilden die Zellen 0,5 bis 0,8 mm große Kolonien (ältere Kolonien sind bis zu 1,8 mm groß). Die Kolonien sind weiß, undurchsichtig, kreisrund, ganzrandig und konvex. Wachstum erfolgt bei Temperaturen von 15 bis 45°C mit einem Optimum bei 35 bis 40°C und bei pH-Werten von 6,3 bis 9,1 mit dem Optimum bei pH 7,5 bis 7,8. NaCl-Konzentrationen von 0 bis 5% werden toleriert, die optimale NaCl-Konzentration liegt bei 0,55 bis 1%. Gram-negativ, fakultativ anaerob. Katalase-positiv, schwach Oxidase-positiv. Auf Einzelsubstraten erfolgt nur schwaches Wachstum, Hefeextrakt stimuliert Wachstum. Pepton, Glucose, Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose und Stärke stimulieren Wachstum, geringes Wachstum erfolgt auf einer Mischung aus 20 Aminosäu-

ren. Es erfolgt kein Wachstum auf Ethanol. Zeigt leicht erhöhte extrazelluläre Enzymaktivität auf  $\beta$ -Glucan und schwache Aktivität auf Cellobiose, Lactose, Stärke, Arabino-galactan, Arabinoxylan (mittlere Viskosität), Xylan (aus Laubholz), Carboxymethylcellulose (CMC) und auf durch Phosphorsäure aufgequollene Cellulose (PASC). Kristalline Cellulose (Avicel) wird nicht abgebaut. Nach Wachstum auf Hefeextrakt und Pepton bilden die Zellen Essigsäure, Propionsäure, geringe Mengen Isovaleriansäure,  $\text{CO}_2$  und geringe Mengen an  $\text{H}_2$ . Die vorherrschenden Fettsäuren sind anteiso- $\text{C}_{15:0}$  (ca. 50%), iso- $\text{C}_{15:0}$  und  $\text{C}_{15:0}$ , die hauptsächlich Hydroxy-Fettsäuren sind  $\text{C}_{17:0}$  2-OH, iso- $\text{C}_{16:0}$  3-OH und iso- $\text{C}_{17:0}$  3-OH. Das einzige detektierte Chinon ist Menachinon MK-8. Der genomische G+C Gehalt des Typenstamms ist 45,1 mol% (HPLC). Der Typenstamm M3/6<sup>T</sup> wurde in drei öffentlichen Stammsammlungen hinterlegt (= DSM 28694<sup>T</sup> = CECT 8610<sup>T</sup> = LMG 28299<sup>T</sup>).

### **Beschreibung von *Petrimonas mucosa* sp. nov.**

*Petrimonas mucosa* (mu.co'sa. L. fem. adj. *mucosa* Schleim, schleimig, eine Eigenschaft der Zellkolonien).

Die Zellen bilden unregelmäßige Stäbchen mit einer Größe von 0,9 bis 3,4 x 0,7 bis 1,2  $\mu\text{m}$ , vereinzelt kommen filamentöse Zellen bis zu 19,5  $\mu\text{m}$  vor. Nach zweitägigem anaerobem Wachstum bei 37°C auf Columbia Blutagar bilden die Zellen punktförmige (ca. 0,1 mm im Durchmesser) creme-farbene, undurchsichtige, kreisrunde, ganzrandige, konvexe und glänzende Kolonien. Nach drei Wochen sind die Kolonien weiß, schleimig und 0,5 bis 1,0 mm groß. Wachstum erfolgt bei Temperaturen von 20 bis 50°C mit einem Optimum bei 45°C und bei pH-Werten von 6,3 bis 9,1 mit dem Optimum bei 7,5 bis 7,8. NaCl-Konzentrationen von 0 bis 2% werden toleriert, die optimale NaCl-Konzentration liegt bei 0%. Gram-negativ, fakultativ anaerob. Katalase-positiv, schwach Oxidase-positiv. Auf Einzelsubstraten erfolgt nur schwaches Wachstum, Hefeextrakt stimuliert Wachstum. Pepton, Glucose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose und Stärke stimulieren Wachstum. Es erfolgt kein Wachstum auf Arabinose, Aminosäuren und Ethanol. Zeigt leicht erhöhte extrazelluläre Enzymaktivität auf Lactose und schwache Aktivität auf Cellobiose, Stärke, Arabino-galactan, Arabinoxylan (mittlere Viskosität), Xylan (aus Laubholz), Carboxymethylcellulose (CMC), auf durch Phosphorsäure aufgequollene Cellulose (PASC) und auf  $\beta$ -Glucan. Kristalline Cellulose (Avicel) wird nicht abgebaut. Nach Wachstum auf Hefeextrakt und Pepton bilden die Zellen Essigsäure, Propionsäure, geringe Mengen Isovaleriansäure und  $\text{CO}_2$  und Spuren von  $\text{H}_2$ ; durch Zugabe von Glucose wird Buttersäure in Spuren gebildet. Die vorherrschenden Fettsäuren sind anteiso- $\text{C}_{15:0}$  (ca. 50%), iso- $\text{C}_{15:0}$ , iso- $\text{C}_{14:0}$  and anteiso- $\text{C}_{13:0}$ . Das einzige detektierte Chinon ist Menachinon MK-8. Der genomische G+C Gehalt des Typenstamms ist 48,2 mol% (HPLC). Der Typenstamm ING2-E5A<sup>T</sup> wurde in zwei öffentlichen Stammsammlungen hinterlegt (= DSM 28695<sup>T</sup> = CECT 8611<sup>T</sup>).

**Beschreibung von *Fermentimonas gen. nov.***

*Fermentimonas* (Fer.men.ti.mo'nas. L. v. *fermenti* fermentieren; L. fem. n. *monas* Zelle; N.L. fem. n. *Fermentimonas* fermentierende Zelle).

Gerade, Gram-negative Stäbchen. Fakultativ anaerob. Zucker und komplexe proteinreiche Substrate werden fermentiert. Enthält Menachinone MK-8. Die zellulären Fettsäuren enthalten sowohl geradkettige als auch verzweigte Fettsäuren sowie 2-OH und 3-OH Hydroxy-Fettsäuren. Die vorherrschenden Fettsäuren sind anteiso-C<sub>15:0</sub> und iso-C<sub>15:0</sub> (beide zu etwa gleichen Anteilen), anteiso-C<sub>13:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub>, iso-C<sub>13:0</sub> und C<sub>14:0</sub>. Die hauptsächlichsten Hydroxy-Fettsäuren sind iso-C<sub>15:0</sub> 3-OH und C<sub>16:0</sub> 3-OH. Basierend auf 16S rRNA Genesequenzvergleichen ist die Gattung *Fermentimonas* am engsten mit der Gattung *Proteiniphilum* verwandt (Phylum *Bacteroidetes*). Der Typenstamm ist *Fermentimonas caenicola*.

**Beschreibung von *Fermentimonas caenicola sp. nov.***

*Fermentimonas caenicola* (cae.ni'.co.la. L. n. *caenum* Schlamm; L. suff. *-cola* (von L. n. *incola*) Bewohner; N.L. n. *caenicola* Schlammbewohner).

Die Zellen bilden Stäbchen mit einer Größe von 0,9 bis 8,8 x 0,7 bis 1,0 µm, vereinzelt kommen filamentöse Zellen bis zu 15,5 µm vor. Nach zweitägigem anaerobem Wachstum bei 37°C auf Columbia Blutagar bilden die Zellen ca. 0,8 mm große, leicht gremefarbene, schwach durchscheinende, runde, ganzrandige, konvexe und glänzende Kolonien. Nach drei Wochen sind die Kolonien weiß und ca. 1 mm im Durchmesser. Wachstum erfolgt bei Temperaturen von 15 bis 45°C mit einem Optimum bei 37 bis 40°C und bei pH-Werten von 6,3 bis 9,1 mit dem Optimum bei 7,1. NaCl-Konzentrationen von 0 bis 1% werden toleriert, die optimale NaCl-Konzentration liegt bei 0%. Katalase-positiv, schwach Oxidase-positiv. Auf Einzelsubstraten erfolgt nur schwaches Wachstum, Hefeextrakt stimuliert Wachstum. Peptone, Glucose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose und Stärke stimulieren Wachstum. Es erfolgt kein Wachstum auf Arabinose, Aminosäuren und Ethanol. Zeigt leicht erhöhte extrazelluläre Enzymaktivität auf Arabinoxylan (mittlere Viskosität) und Xylan (aus Laubholz) und schwache Aktivität auf Cellobiose, Lactose, Stärke, Arabino-galactan, Carboxymethylcellulose (CMC), auf durch Phosphorsäure aufgequollene Cellulose (PASC) und auf β-Glucan. Kristalline Cellulose (Avicel) wird nicht abgebaut. Nach Wachstum auf Hefeextrakt und Pepton bilden die Zellen Essigsäure, Propionsäure, CO<sub>2</sub>, Spuren von Isovaleriansäure und Spuren von H<sub>2</sub>. Der genomische G+C Gehalt des Typenstamms ist 38,2 mol% (HPLC). Der Typenstamm ING2-E5B<sup>T</sup> wurde in drei öffentlichen Stammsammlungen hinterlegt (= DSM 28696<sup>T</sup> = CECT 8609<sup>T</sup> = LMG 28429<sup>T</sup>).

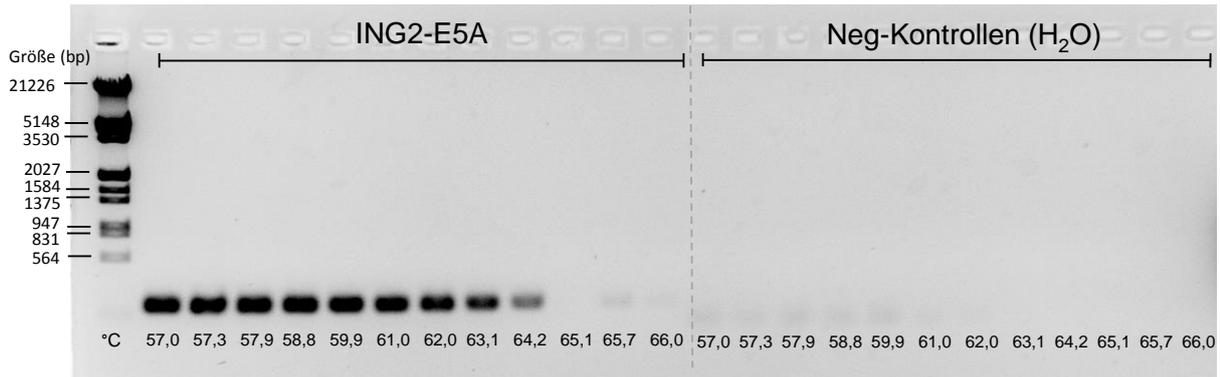
## II.1.10 Entwicklung eines qPCR-Systems zur quantitativen Bestimmung von *Petrimonas mucosa* in Biogasanlagen

Da der Mikroorganismus *Petrimonas mucosa* mittels kultivierungsunabhängiger, DNA-basierter Verfahren häufig in Biogasanlagen nachgewiesen wird, sollte für diese Bakterienart ein molekulares Markersystem zur verbesserten kultivierungsunabhängigen Quantifizierung entwickelt werden. Dieses Markersystem sollte insbesondere die Grundlage eines speziesspezifischen Schnellnachweises auf Basis der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) bilden. Es wird beabsichtigt, dieses Markersystem zukünftig bei der Untersuchung von Praxisanlagen einzusetzen, um Korrelationen zwischen den Abundanzen dieses Phylotyps und dem Reaktorzustand zu ermöglichen.

Artspezifische Primer für das phylogenetische Markergen (16S rRNA Gen) wurden mit Hilfe des *probe design* tools des Phylogenieprogramms ARB entwickelt (<http://www.arb-home.de> [LUDWIG *et al.* 2004]). Die erhaltenen Primersequenzen wurden anschließend durch einen Abgleich mit der RDP Datenbank (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu>) auf ihre Spezifität hin überprüft. Für folgendes Primerpaar, das einen Genabschnitt der Größe 183 bp amplifiziert, wurde *in silico* eine Spezifität für die Art *Petrimonas mucosa* ermittelt: Forward-Primer 472f (TAC CGT TTT GCA TGT ACC C), Reverse-Primer 635r (TCA AGG AAA CCA GTA TCG AAG). Als *non-target* Mikroorganismus mit den wenigsten Mismatches zu der Zielsequenz wurde der Bakterienklon ATB-KH-29163 (NCBI Acc.-Nr. KF630721) gefunden, der einer bisher unbekannten Art innerhalb der *Porphyromonadaceae* zuzuordnen ist und 95,5% 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zu *P. mucosa* aufweist. Der Bakterienklon ATB-KH-29163 wies zwei Mismatches im Forward-Primer und ein Mismatch im Reverse-Primer auf:

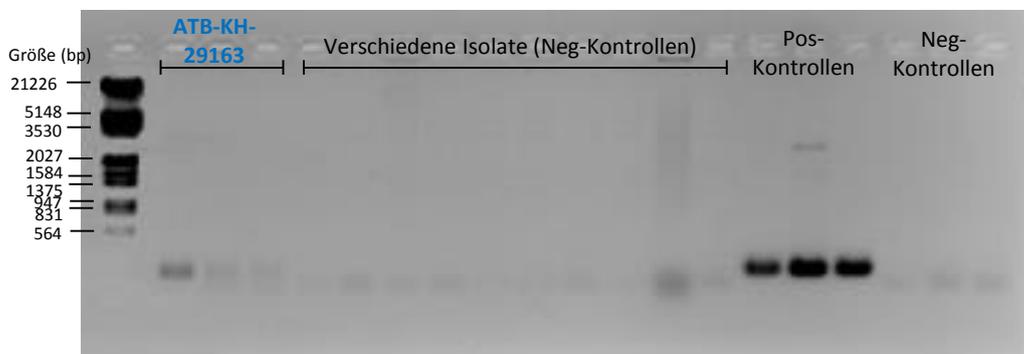
Zielsequenz Primer 472f:	TAC	CGT	TTT	GCA	TGT	ACC	C
Klon ATB-KH-29163:	TAC	TGT	TTT	GCA	TGT	ACC	T
Zielsequenz Primer 635r:	TCA	AGG	AAA	CCA	GTA	TCG	AAG
Klon ATB-KH-29163:	TCA	AGG	AAA	CCA	GTA	TCG	ATG

Um die optimale Bindungstemperatur für die Primer zu ermitteln, wurde zunächst ein Standard-PCR-Protokoll mit einem Temperatur-Gradienten angewendet. Dabei wurden Primer-Bindungstemperaturen von 57 bis 66°C eingestellt. Als Zielorganismus wurde das Isolat *P. mucosa* ING2-E5A verwendet, in die Negativkontrollen wurde kein DNA-Template eingesetzt. Durch das Primersystem konnte das 16S rRNA Genfragment des Zielorganismus amplifiziert werden, wobei sich eine Bindungstemperatur von 62°C als höchstmögliche Temperatur herausstellte, um ein optimales Produkt zu erhalten (**Abbildung 15**). In den Negativkontrollen wurden keine PCR-Produkte festgestellt.

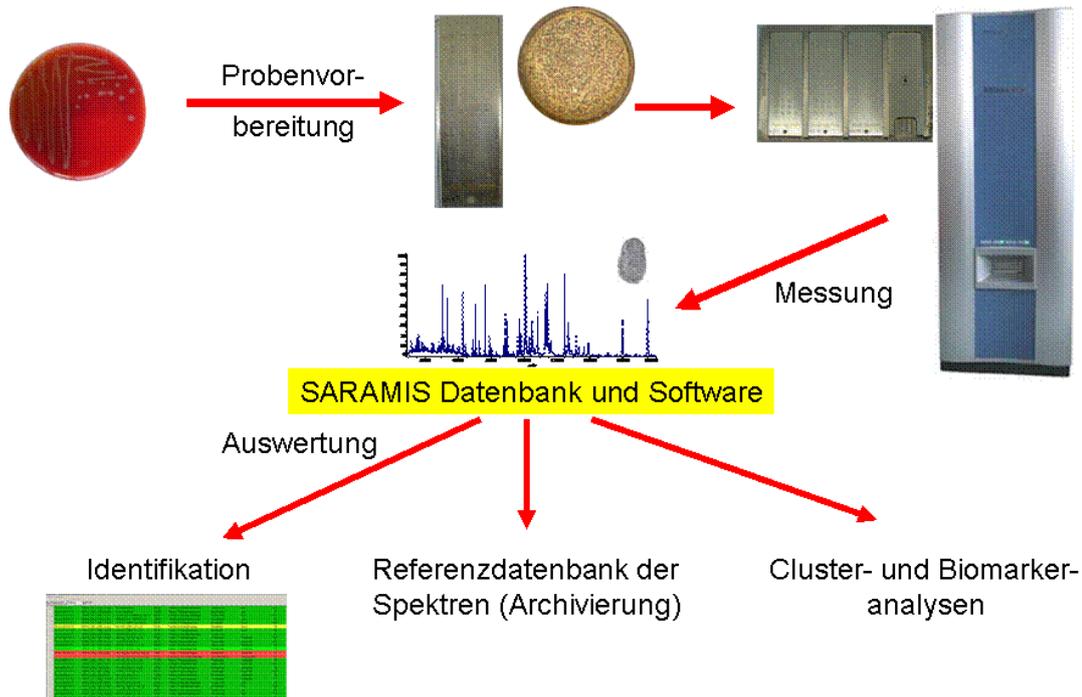


**Abbildung 15:** Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Produkten aus der Gradienten-PCR. Der Zielorganismus, Isolat ING2-E5A, wurde bis zu einer Annealingtemperatur von 62°C optimal amplifiziert (links), die Negativkontrollen wiesen keine PCR-Produkte auf (rechts).

Um die Spezifität der Primer zu testen wurde die PCR außerdem mit verschiedenen Isolaten durchgeführt, die aus Biogasanlagen gewonnen wurden und die nicht in die phylogenetische Zielgruppe fallen. Ebenso wurde das klonierte 16S rRNA Gen des Bakterienklons ATB-KH-29163 eingesetzt, der als Nicht-Zielorganismus die wenigsten Mismatches zu den entwickelten Primern aufwies. Als Annealingtemperatur wurden 62°C verwendet. Die eingesetzten Isolate wurden mit dem PCR-System nicht amplifiziert, für den Klon ATB-KH-29163 wurde jedoch eine schwache Amplifizierung festgestellt (**Abbildung 16**). Da in der qualitativen PCR also auch „falsch-positive“ Organismen detektiert werden, würde das Vorkommen solcher Organismen auch die Quantifizierung von *P. mucosa* in einem qPCR-Ansatz entsprechend beeinflussen. Um ein spezifisches Markersystem zu erhalten, ist es notwendig *in silico* andere mögliche Primer und/oder sog. TaqMan-Sonden zu designen, die dann erneut getestet werden müssen. Da die hier vorgestellten Arbeiten den Stand zum Projektende darstellen, kann die Weiterentwicklung des qPCR-Systems nicht mehr im Rahmen des BIOGAS-CORE Projekts erfolgen.



**Abbildung 16:** Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Produkten. Die PCR wurde mit den entwickelten *P. mucosa* Primern 472f und 635r und einer Annealingtemperatur von 62°C durchgeführt. Der Nicht-Zielorganismus Klon ATB-KH-29163 bildete schwache Banden, diverse nicht zu den Zielorganismen gehörende Isolat wurden nicht amplifiziert. Zusätzliche Negativkontrollen waren Ansätze ohne DNA-Template. Als Positivkontrolle wurde das Isolat ING2-E5A eingesetzt.



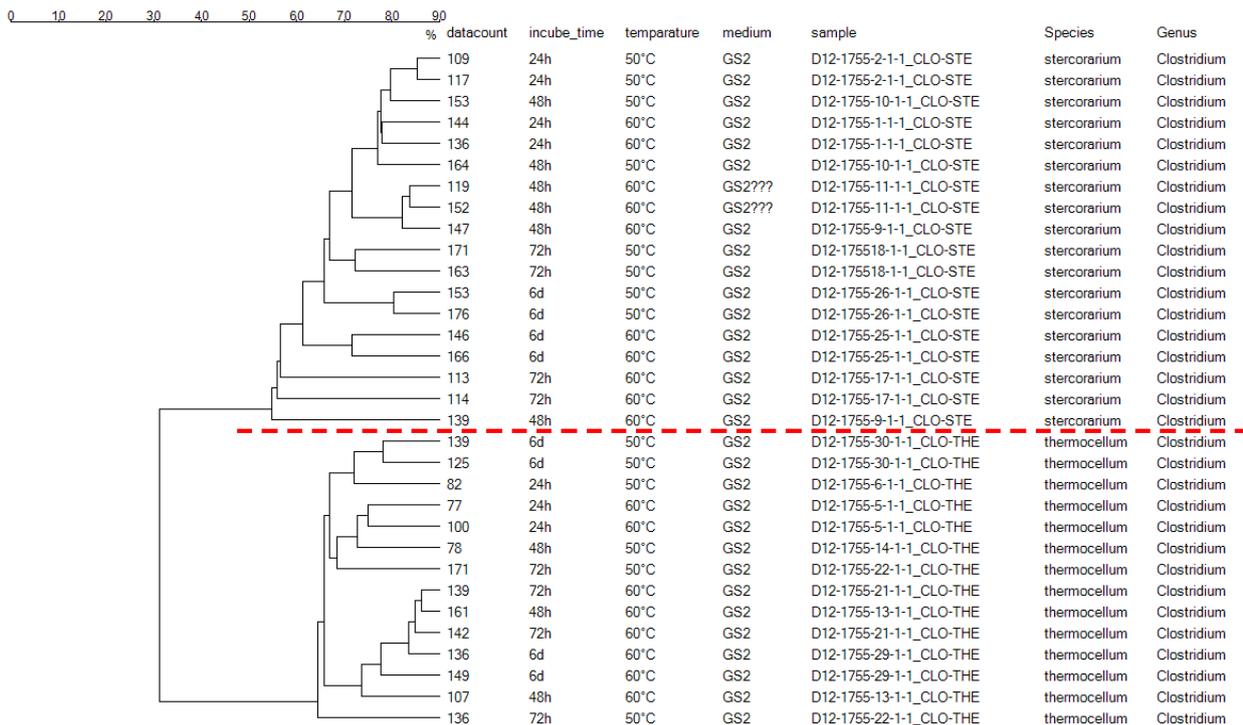
**Abbildung 17:** Schema zum Arbeitsablauf der MALDI-TOF MS Analysen. Erhaltene Massenspektren wurden mit der SARAMIS Datenbank abgeglichen, wobei bekannte Spektren zu einer Identifizierung der Isolate führten. Unbekannte Spektren wurden zum Aufbau der Datenbank gespeichert.

### II.1.11 Etablierung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS

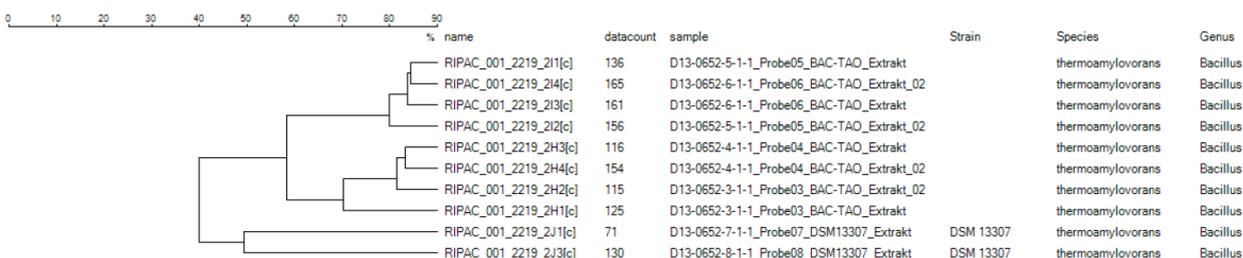
Zur Etablierung einer zeitnahen mikrobiologischen Diagnostik des Reaktorzustands entsprechend der Vorhabensbeschreibung wurde von dem Teilprojektpartner RIPAC-LABOR GmbH eine Datenbank für die MALDI-TOF Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) als Grundlage zur Schnellidentifizierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren aufgebaut. Die Identifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS basiert auf der Erzeugung stammspezifischer Zellproteinprofile, die durch einen Abgleich mit Referenzspektren identifiziert werden können. Um die Datenbank der Referenzspektren zu erweitern, wurden vom RIPAC-LABOR Isolierungen von Bakterien und Pilzen durchgeführt. Von den Isolaten (Eigenisolate sowie Isolate aller Projektpartner) wurden MALDI-TOF MS Analysen nach einem Standard-Protokoll für Kolonien von Agar-Platten (**Abbildung 17**) und nach einem in dieser Studie entwickelten Protokoll zum Transport von inaktivierten Proben vorgenommen (siehe Anlage 2).

Um zunächst zu untersuchen, ob unterschiedliche Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Massenspektrenmuster und damit auf die phylogenetische Zuordnung von Mikroorganismen haben, wurden von dem Verbundpartner TUM zwei Clostridien-Stämme unterschiedlicher Arten (*Clostridium stercoarium* DSM 8532 und *Clostridium thermocellum* DSM 2360) jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen und Inkubations-

zeiten kultiviert, die dann mittels MALDI-TOF MS analysiert wurden. Die Variationen in den Wachstumsbedingungen ergaben die „normalen“ erwarteten Schwankungen in den Spektren, was eine taxonomische Zuordnung dieser Mikroorganismen jedoch nicht beeinflusste. In der phylogenetischen Analyse konnten beide Arten eindeutig voneinander getrennt werden (**Abbildung 18**). Die artspezifischen Proteinprofile und somit die Identifizierung von mikrobiellen Isolaten werden durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen also nicht beeinflusst. Unterschiedliche Stämme ein und derselben Art konnten über eine Clusteranalyse der Massenspektren ebenfalls unterschieden werden (**Abbildung 19**), was eine hohe Auflösung der Identifizierung auf Stammebene zeigt.



**Abbildung 18:** Dendrogramm basierend auf Unterschieden in MALDI-TOF Massenspektren. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen (Inkubationszeit, Temperatur) zeigten die „normalen“ erwarteten Schwankungen innerhalb eines Clusters; die beiden Clostridienarten *C. stercorarium* und *C. thermocellum* zeigten eine eindeutige Trennung voneinander. Alle Stämme wurden jeweils in Duplikaten analysiert.



**Abbildung 19:** Dendrogramm basierend auf Unterschieden in MALDI-TOF Massenspektren. Unterschiedliche Isolate der Art *Bacillus thermoamylovorans* bildeten drei verschiedene Subcluster und sind somit eindeutig als drei Stämme derselben Art voneinander zu trennen. Alle Stämme wurden jeweils in Duplikaten analysiert.

Da eine Schnellidentifizierung bisher unbekannter Isolate (d. h. Mikroorganismen, zu denen kein Spektrum in der Datenbank hinterlegt ist) nicht über die MALDI-TOF MS möglich ist, wurde die Datenbank entsprechend der in den Biogasreaktoren nachgewiesenen unbekannt Mikroorganismen entsprechend erweitert. Hierzu wurden die Mikroorganismen auf Basis der Nukleotidsequenz für das 16S rRNA Gen taxonomisch eingeordnet. Die gewonnene Information zur taxonomischen Zuordnung wurde entsprechend in die Datenbank eingespeist, wodurch zukünftig eine Schnellidentifizierung dieser Stämme erfolgen kann.

Neben den Isolaten, die durch alle Projektpartner bereitgestellt wurden, wurden auch Eigenisolate analysiert. Hierzu sowie zur Durchführung einer generellen Reaktordiagnostik wurden vom Partner RIPAC-LABOR Kultivierungsansätze für zwei Praxisanlagen durchgeführt. Es wurden die thermophile Biogasanlage in Viersen ausgewählt, zu der vom Kooperationspartner CeBiTec bereits umfassende kultivierungs-unabhängige taxonomische Profile vorlagen, sowie die mesophile Biogasanlage der Stadtwerke Bielefeld.

### **Durchführung von Anreicherungskultivierungen**

Von jeder Biogasreaktorprobe wurde eine Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahl einschließlich Hefen, Schimmelpilze und Clostridien vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das Untersuchungsmaterial in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden vier Columbia-Agarplatten mit 7,5% Schafblutzusatz (Oxoid) mit je 0,2 ml beimpft und je zwei Platten 48 Stunden bei 30 und 37°C (für die thermophile Anlage in Viersen zusätzlich bei 50°C) für die aerobe Gesamtkeimzahlbestimmung bzw. 96 Stunden bei 37 und 50°C für die anaerobe Gesamtkeimzahlbestimmung bebrütet. Zudem wurde von jeder Verdünnungsstufe zum direkten Nachweis von Enterobakterien (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*, Salmonellen u. a.) eine Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agarplatte nach Gassner (Oxoid) und eine Brilliantgrün-Phenolrotagarplatte (Oxoid) sowie zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen eine Sabouraud-Dextroseagarplatte mit Zusatz von Chloramphenicol beimpft, 48 h bei 37 und 50°C bzw. 96 h bei 30 und 50°C bebrütet. Da Clostridien- und *Clostridium perfringens*-Sporen nicht bzw. nur selten auf Agarplatten wachsen, wurde von jeder Verdünnungsstufe zusätzlich 1 mL in eine Leberbouillon (Oxoid) anaerob verimpft und nach 24 h (37 und 50°C) auf Columbia-Schafblutagarplatten mit Neomycin- und Gentamycin-Zusatz ausgestrichen (anaerob, 48 h, 37 und 50°C). Außerdem wurde von jeder Verdünnungsstufe 1 mL in verflüssigten Hochschicht-Eisensulfitar nach Angelotti gegeben und 48 h bei 37 und 50°C bebrütet, wobei gasbildende, sulfitreduzierende *Clostridium* spp. eine Schwarzfärbung sowie Gasblasen verursachten. Zum Nachweis von Salmonellen wurden 25 mL Untersuchungsmaterial im Verhältnis von 1:10 in ein Voranreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser) gegeben, über Nacht 18 bis 24 h bei 37°C angereichert und danach 3x fraktioniert 1:10 in Tetrathionat-

Bouillon (Oxoid) überimpft (18 bis 24 h, 37°C) und ausschließlich auf Brillantgrün-phenolrotagar (BGP-Agar) und XLD/Brilliance-Salmonella-Agar (Oxoid) ausgestrichen.

### ***Ablesen der Platten und Isolierung relevanter Keime***

Entsprechend den bei Keimzahlbestimmungen üblichen Untersuchungsmethoden erfolgte die Auszählung der Kolonien nur von den Platten, auf denen der Keimgehalt  $\geq 20$  bzw.  $\leq 200$  KBE/Platte betrug (KBE = koloniebildende Einheiten). Da von jeder Verdünnungsstufe zwei Platten beimpft wurden, ist von beiden Platten der Mittelwert für den Keimgehalt gebildet worden. Zum Zweck des Ablesens wurden die Morphologien der gewachsenen Bakterienkolonien mit dem Auflichtmikroskop (Motic) bei 3 bis 15facher Vergrößerung begutachtet. Die verschiedenen Kolonietypen wurden gezählt, so dass sie auch quantitativ bewertet werden konnten. Von den vorherrschenden typischen Kolonien der Umweltmikroflora, von Kolonien bekannter, hygienisch relevanter Indikatorkeime (z. B. Enterokokken, *E. coli* u. a.), von Kolonien verdächtiger pathogener Erreger sowie neuartiger unbekannter Keime wurden Reinkulturen auf Columbia-Schafblutagar abgeimpft. Die Bebrütung der Subkulturen erfolgte 24 bis 48 h bei 37 bzw. 50°C unter anaeroben bzw. mikroaerophilen Bedingungen je nach Anzuchtbedingungen der Primärplatten.

### ***Differenzierung der isolierten Kulturen***

Die Differenzierung der isolierten Stämme erfolgte auf der Grundlage phänotypischer und morphologischer Eigenschaften (Färbung nach Gram), konventioneller Verfahren zur Prüfung des biochemischen Leistungsvermögens und mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie. Für die Durchführung der Differenzierung mittels MALDI-TOF-Verfahren stand ein SHIMADZU-AXIMA-Confidence-Gerät zur Verfügung. Von jeder Probe wurden zwischen 5 bis 42 Stämme je nach Keimspektrum mittels MALDI-Verfahren differenziert, wobei auch ausgewählte Stämme von bereits mittels konventioneller Verfahren identifizierter Kulturen einer Überprüfung mit dem MALDI-Verfahren unterzogen worden sind.

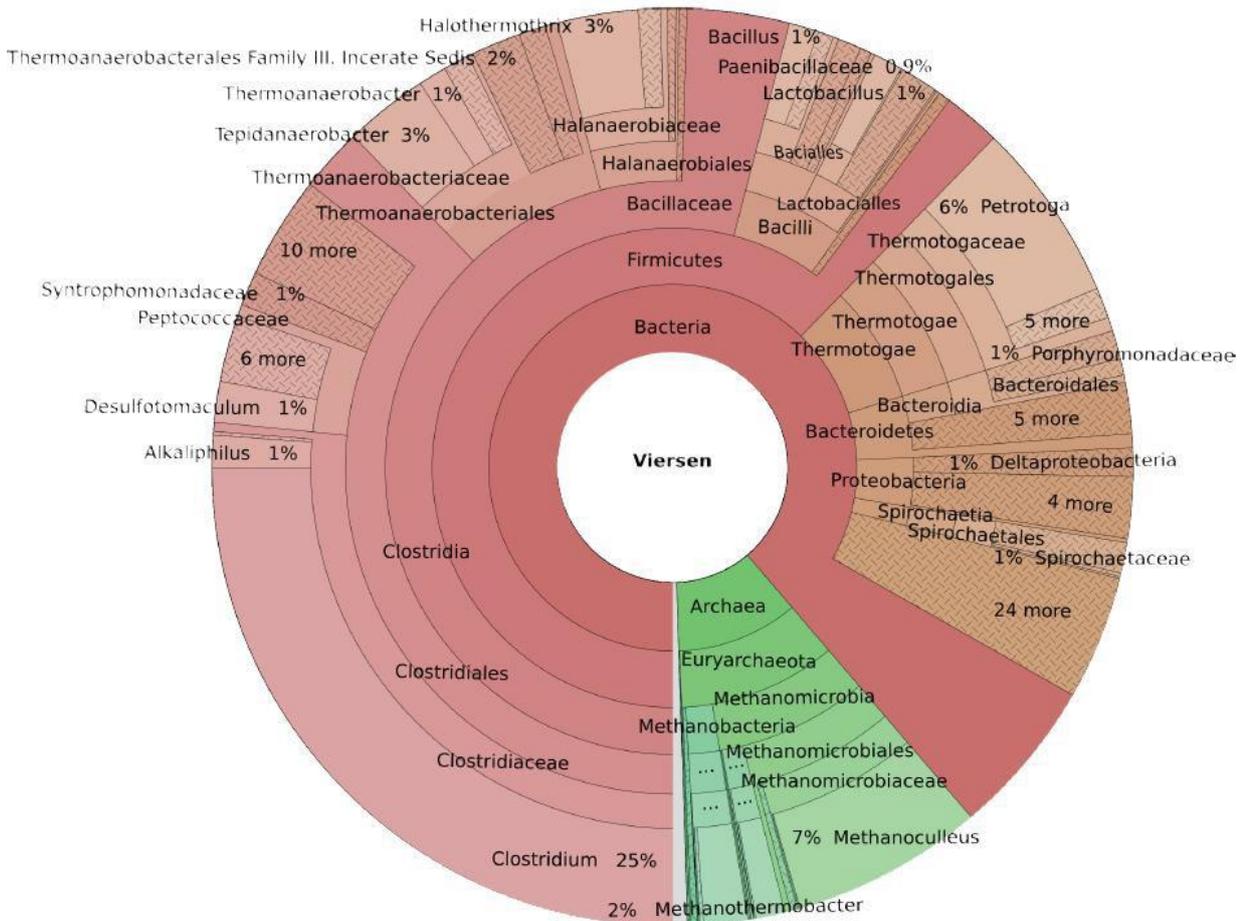
### ***Aufbau der MALDI-TOF MS-Referenzdatenbank***

Insgesamt wurden von der RIPAC-LABOR GmbH ~4.000 unterschiedliche Bakterien-, Archaeen- und Pilzisolat mittels MALDI-TOF Massenspektren analysiert und in der SARAMIS Datenbank ausgewertet. Bei den untersuchten Isolaten handelte es sich um ~3.000 selbst isolierte und ~1.000 durch die Projektpartner bereitgestellte Mikroorganismen. Dabei wurden neben den klassischen Keimen auch methanogene Archaeen und Cellulose-Abbauer untersucht. Bei den ~3.000 selbst untersuchten Stämmen konnten größtenteils die bekannten Leitkeime wie *Clostridien* spp., *Streptococcus bovis/equinus*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Bacteroides* spp.,

*Streptomyces* spp., Hefen und Schimmelpilze identifiziert werden. Alle Spektren von unbekanntem und seltenen Spezies wurden in der SARAMIS Datenbank gespeichert. Liegen Referenzidentifizierungen in Form von Sequenzierungsergebnissen des 16S Gens durch die Projektpartner vor, wurden die Speziesnamen in die SARAMIS Datenbank übernommen. Dieser Teil der Datenbank (Replikation) kann anderen Partnern zur Verfügung gestellt und in andere SARAMIS Systeme importiert werden. Alle Spektren von bereits bekannten, identifizierten und typischen Stämmen wurden nicht in der SARAMIS Datenbank gespeichert.

### **Ergebnisse der Reaktoruntersuchungen**

Mittels verschiedener Kultivierungsverfahren und anschließender MALDI-TOF MS Identifizierung wurden in der thermophilen Biogasanlage (BGA) in Viersen bzw. in der mesophilen Anlage der Stadtwerke Bielefeld eine Reihe unterschiedlicher Bakterien und Pilze identifiziert (**Tabelle 16** und **17**). Die Ergebnisse der Analysen beider Biogasanlagen zeigten, dass keine Anreicherung *Cl. botulinum*-Neurotoxin-bildender Stämme in den Biogasproben nachgewiesen werden konnten. In beiden Anlagen gelang der Nachweis von *Cl. sporogenes*, der eine mit *Cl. botulinum* eng verwandte Art darstellt, jedoch über kein Botulinum-Neurotoxinbildungsvermögen verfügt. Die bakteriologische Untersuchung der BGA Viersen bei einer dem Gärprozeß nachempfundenen Kultivierungstemperatur von 50°C zeigte eine Verringerung der Diversität und Konzentration der bakteriellen Mikroflora zugunsten aerober sowie anaerober Sporenbildner an. Im Allgemeinen entsprachen die festgestellten Konzentrationen der bakteriellen und mykologischen Mikroflora der in Biogasanlagen typischerweise vorkommenden Keimzahlen (**Tabelle 16** und **17**).



**Abbildung 20:** Taxonomisches Profil der prokaryotischen Gemeinschaft der BGA Viereisen. Die zugrundeliegenden Metagenomdaten beruhen auf fünf Datensätzen, die auf Grundlage von fünf DNA-Extrakten erstellt wurden. Mittels der unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden, die durch die unterschiedlichen Projektpartner durchgeführt wurden, sollte ein möglicher *Bias* durch verschiedene DNA-Extraktionsprotokolle oder verschiedenen lange Transportzeiten der Probe bis zur Lagerung ausgleichen.



Tabelle 16 (Forts.)

Unsere Nr. D14_0848 (Ihre Angaben)	Bakteriologische Untersuchung			Zusatzuntersuchung				
	Keim- gehalt	Erreger	Typ	APEC	EHEC	ESBL	Salmo- nellen	Parasito- logie
50°C	1,0 x 10 <sup>7</sup> 1,0 x 10 <sup>7</sup> >10 <sup>4</sup> <10 <sup>5</sup> >10 <sup>2</sup> <10 <sup>3</sup> >10 <sup>2</sup> <10 <sup>3</sup> >10 <sup>1</sup> <10 <sup>2</sup>	<i>Bacillus oleronius</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus thermoamylovorans</i> <sup>1)</sup> <b><i>Clostridium perfringens</i></b> <i>Aneurinibacillus spp.</i> <sup>1)</sup> <i>Clostridium D11-0088-1-1-16</i> <sup>4)</sup> <i>Enterococcus faecium</i> <sup>1)</sup>						
-3 Biogasprobe (Gärrest/Endla- ger) 37°C	1,0 x 10 <sup>2</sup> 1,0 x 10 <sup>3</sup> 1,0 x 10 <sup>3</sup> 1,2 x 10 <sup>3</sup> 4,0 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>4</sup> <10 <sup>5</sup> 1,0 x 10 <sup>6</sup> >10 <sup>1</sup> <10 <sup>2</sup> 1,0 x 10 <sup>7</sup> >10 <sup>5</sup> <10 <sup>6</sup> 2,0 x 10 <sup>6</sup> 2,0 x 10 <sup>6</sup> >10 <sup>4</sup> <10 <sup>5</sup> 5,0 x 10 <sup>5</sup> 1,0 x 10 <sup>6</sup> 7,0 x 10 <sup>5</sup> >10 <sup>2</sup> <10 <sup>3</sup>	<b><i>Salmonella enterica subsp. enterica</i></b> <sup>1)</sup> <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> <sup>1)</sup> unbekannter Schimmelpilz <sup>1)</sup> <b><i>Escherichia coli</i></b> <sup>1)</sup> <i>Morganella morganii</i> <sup>1)</sup> <b><i>Clostridium perfringens</i></b> unbekannter Keim <sup>1)</sup> <b><i>Clostridium sordellii</i></b> <sup>1)</sup> <i>Lactobacillus amylovorus/kitasatonis</i> <sup>1)</sup> <i>Lactobacillus reuteri</i> <sup>1)</sup> <i>Bacteroides coprosuis</i> <sup>1)</sup> <i>Paenibacillus macerans</i> <sup>1)</sup> <i>Clostridium D13-0312-1-1-9</i> <sup>4)</sup> <i>Hydrogenophaga spp.</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus licheniformis</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus oleronius</i> <sup>1)</sup> <i>Proteus penneri/vulgaris</i> <sup>1)</sup>	<b>Typhimurium</b> <sup>5)</sup>          <b>A, ≤4 NE, β2 positiv</b>					
50°C	>10 <sup>5</sup> <10 <sup>6</sup> >10 <sup>4</sup> <10 <sup>5</sup> >10 <sup>3</sup> <10 <sup>4</sup> 2,0 x 10 <sup>6</sup> >10 <sup>4</sup> <10 <sup>5</sup> >10 <sup>3</sup> <10 <sup>4</sup>	<i>Lactobacillus reuteri</i> <sup>1)</sup> <i>Bacteroides coprosuis</i> <sup>1)</sup> <i>Paenibacillus macerans</i> <sup>1)</sup> <i>Clostridium D13-0312-1-1-9</i> <sup>4)</sup> <i>Hydrogenophaga spp.</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus licheniformis</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus oleronius</i> <sup>1)</sup> <i>Proteus penneri/vulgaris</i> <sup>1)</sup> unbekannter Keim <sup>1)</sup> <b><i>Clostridium perfringens</i></b> <i>Clostridium cochlearium</i> <sup>1)</sup> <i>Brevibacillus borstelensis</i> <sup>1)</sup> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <sup>1)</sup>		negativ <sup>2)</sup>	<b>positiv</b> <sup>2)</sup>	negativ <sup>3)</sup> negativ <sup>3)</sup>          negativ <sup>3)</sup>	positiv	<b>Wurmeier positiv</b>  <b>Kokzidien negativ</b>

**Tabelle 17:** Ergebnisse der RIPAC-LABOR Diagnostik der mesophilen Biogasanlage Stadtwerke Bielefeld.

Unsere Nr. D14_0885 (Ihre Angaben)	Bakteriologische Untersuchung			Zusatzuntersuchung				
	Keim- gehalt	Erreger	Typ	APEC	EHEC	ESBL	Salmo- nellen	Parasito- logie
-1 Biogasprobe	1,0 x 10 <sup>2</sup>	<i>Pseudomonas citronellolis/ delhiensis</i> <sup>1)</sup>	<b>A, ≤4 NE, β2 positiv</b>	nicht	nicht	nicht	negativ	<b>Wurmeier: positiv</b>
	2,6 x 10 <sup>4</sup>	unbekannter Schimmelpilz <sup>1)</sup>						
	>10 <sup>3</sup> <10 <sup>4</sup>	<b><i>Clostridium perfringens</i></b>						
	>10 <sup>1</sup> <10 <sup>2</sup>	<i>unknown 16S Sequence D11-1410-6-1-5</i> <sup>4)</sup>						
	1,8 x 10 <sup>7</sup>	<i>Streptococcus bovis/equinus</i> <sup>1)</sup>						
	2,0 x 10 <sup>7</sup>	<b><i>Enterococcus cecorum</i></b> <sup>1)</sup>						
	1,0 x 10 <sup>6</sup>	<i>Aneurinibacillus spp.</i> <sup>1)</sup>						
	1,0 x 10 <sup>6</sup>	<i>Staphylococcus capitis</i> <sup>1)</sup>						
	5,0 x 10 <sup>6</sup>	<i>Bacillus spp.</i>						
	>10 <sup>3</sup> <10 <sup>4</sup>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> <sup>1)</sup>						
	>10 <sup>2</sup> <10 <sup>3</sup>	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>1)</sup>						
A	<b><i>Clostridium sporogenes</i></b> <sup>1)</sup>		nach- weisbar	nach- weisbar	nach- weisbar		<b>Kokzidien: positiv</b>	

+++	hochgradiger Keimgehalt: >100 Kolonien pro Platte	5)	Ergebnisse eines externen Labors
++	mittelgradiger Keimgehalt: 20-100 Kolonien pro Platte	NE	α-Toxinquantifizierung in Naglereinheiten pro ml Rohtoxin
+	niedriger Keimgehalt: <20 Kolonien pro Platte	□2	beta 2-Toxingen
(+)	vereinzelt Kolonien pro Platte	*	Angaben in mäuseletale Dosen pro ml Medium
1 K	eine Kolonie pro Platte	**	>2 mäuseletale Dosen pro ml Medium
-	negativ	***	< 2 mäuseletale Dosen pro ml Medium
A	Anreicherung	spp.	Spezies/Art nicht bestimmt
1)	Ergebnisse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	üb	überschwärmender Keim
2)	Ergebnisse mittels PCR	n.d.	nicht differenziert
3)	Ergebnisse mittels <i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar (OXOID)	n.a.	nicht abimpfbar
4)	MALDI-TOF Massenspektrometrie einer unbekanntem Spezies		
5)	Ergebnisse eines externen Labors		

Im Gegensatz zur kultivierungsbasierten Reaktoruntersuchung wurde vom Projektpartner CeBiTec eine kultivierungsunabhängige DNA-basierte Metagenomanalyse des gesamten Geninventars der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA Viersen durchgeführt. Die taxonomische Auswertung des Metagenoms ergab ein diverses Spektrum unterschiedlicher Bakterien und Archaeen (**Abbildung 20**). Ein Großteil der gefundenen Gruppen von Mikroorganismen war mit dem kulturbasierten und DNA-basierten Nachweis identisch. Die Archaeen konnten mittels Standardverfahren nicht kultiviert werden. Andererseits wurden Pilze nicht in den DNA-basierten Analysen erfasst. Damit ergänzten sich beide Methoden und bestätigten die jeweils anderen Analyseergebnisse.

Insgesamt ist die von der RIPAC-LABOR GmbH etablierte kultivierungsbasierte Untersuchung des Reaktorzustandes also eine Methode, die durch die Schnellidentifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS eine zeitnahe Diagnostik des Reaktors

erlaubt. Umfangreiche kultivierungsunabhängige Analysen liefern zusätzliche Informationen, sind jedoch auch deutlich aufwendiger.

### II.1.12 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

Im Rahmen des am ATB bearbeiteten Teilprojekts wurden aus vier Biogas-Reaktorproben insgesamt 197 Isolate gewonnen, die 64 verschiedenen Stämmen bzw. Arten von Bakterien und Archaeen aus 10 phylogenetischen Klassen zuzuordnen waren. Mindestens 15 der erhaltenen mikrobiellen Isolate entsprachen bislang unbekanntem Bakterienarten. Drei Bakterien aus dem Phylum *Bacteroidetes*, die häufig in Biogasanlagen gefunden wurden, wurden umfangreich charakterisiert und als neue Arten bzw. als neue Art einer neuen Gattung beschrieben. Für eine dieser Arten, *Petrimonas mucosa*, wurde mit der Entwicklung eines quantitativen PCR-Systems begonnen. Dieses molekulare Markersystem soll zukünftig bei der Untersuchung von Praxisanlagen eingesetzt werden, um Korrelationen zwischen den Abundanzen dieses Phylotyps und dem Reaktorzustand zu erfassen.

Für die Erstellung von Referenzgenomen zur Interpretation von Genomdaten aus der Hochdurchsatz-DNA-Analytik wurden 11 Isolate ausgewählt und deren Genome durch den Projektpartner CeBiTec sequenziert. Innerhalb des gesamten Verbundes wurden für den Aufbau der Referenzdatenbank 34 Genome sequenziert. Das Genom der am ATB isolierten und beschriebenen neuen Bakterienart *Clostridium bornimense* wurde im Rahmen des Projekts in Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec ausgewertet und publiziert. Das Genom eines weiteren Bakterienisolats aus dem Phylum *Bacteroidetes* wurde als Grundlage zur umfassenden Auswertung vollständig manuell annotiert.

Alle im Rahmen des Verbundes gewonnenen Isolate wurden von dem Partner RIPAC-LABOR GmbH mittels MALDI-TOF MS analysiert. Proteinprofile neuer Bakterienisolate wurden in die MALDI-TOF MS-Datenbank zur Schnellidentifizierung von Mikroorganismen eingespeist und trugen so zu dem Ausbau der Datenbank für die Schnelldiagnostik von Biogasanlagen bei. Es erfolgte die Etablierung einer zeitnahen kultivierungsbasierenden mikrobiologischen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS durch den Partner RIPAC-LABOR GmbH. Ein Abgleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen aus einer kultivierungsunabhängigen DNA-basierten Analyse durch das CeBiTec hat ergeben, dass ein Großteil der nachgewiesenen Gruppen von Mikroorganismen identisch waren. Obwohl die Auflösung beider der methodischen Ansätze unterschiedlich ist, ergänzen sich jedoch die beiden Methoden und bestätigten in dieser Studie die jeweils anderen Ergebnisse.

## II.2 Verwertung

### II.2.1 Verwertung der wissenschaftlichen Erkenntnisse

Primär resultierten aus dieser Studie

- (1) wissenschaftliche Fachpublikationen,
- (2) Beiträge zu internationalen Sammlungen von DNA-Sequenzen,
- (3) mikrobielle Isolate bzw. Anreicherungskulturen für die mikrobiologische und biotechnologische Forschung bzw. Anwendung und eine
- (4) Datenbank mit einem (ausbaufähigen) Core-Metabiom für Biogasfermentationen.

Letzteres bezieht sich in diesem Teilprojekt 1 auf die kultivierungsbasierte Identifizierung von Mikroorganismen mittel MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Die erlangten wissenschaftlichen Erkenntnisse werden in Form von wissenschaftlichen Fachartikeln publiziert und somit öffentlich zugänglich gemacht (Übersicht siehe Kap. II.4). Bereits eingereicht oder in Planung sind Fachartikel über die Charakterisierung der drei neuen *Bacteroidetes*-Arten, Genom-Bekanntmachungen („Genome Announcements“) zu den im Rahmen dieser Studie generierten Genomsequenzen sowie umfassende Genomauswertungen einzelner Stämme. Ebenfalls in Vorbereitung befindet sich eine Gemeinschaftspublikation über die polyphasische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in der thermophilen Biogasanlage mit Standort Viersen.

Im Rahmen dieser Studie wurde eine Reihe von DNA-Sequenzen ermittelt. Diese Sequenzen sind in der Datenbank GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt und via Internet unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> öffentlich verfügbar.

Die in dieser Studie charakterisierten und die genomsequenzierten Bakterienisolate wurden in mehreren öffentlichen Stammsammlungen wie dem Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH hinterlegt und stehen somit der internationalen wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung.

Im Rahmen dieses Teilprojekts wurden in Zusammenarbeit mit dem Unterauftragnehmer RIPAC-LABOR GmbH Potsdam MALDI-TOF Massenspektren von ca. 4.000 unterschiedlichen Bakterien-, Archaeen- und Pilzisolaten aus Biogasreaktoren erzeugt und in eine Datenbank eingespeist. Bei unbekanntem Spektren erfolgte eine Identifizierung der Ursprungsorganismen mittels Analyse der 16S rRNA Gensequenz. Diese Datenbank kann jederzeit zur Schnellidentifizierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren sowie zur Schnellidentifizierung der Prozessmikrobiologie von Biogasanlagen in Form einer Dienstleistung durch RIPAC-LABOR GmbH genutzt werden.

## II.2.2 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die im Rahmen dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse bilden die Grundlage für eine Reihe von Anschlussarbeiten. Hierzu zählen insbesondere Arbeiten

- (1) zur Nutzung des Datenmaterials zur Modellierung der Biogasfermentation (z. B. Erweiterung des ADM1-Modells),
- (2) zur Entwicklung von molekularen Markern für prozessbeeinflussende Mikroorganismen und Validierung der Marker in Labormodellen,
- (3) zur Prüfung der Eignung von Isolaten als Hilfskulturen für Biogasfermentationen zur Steigerung des Biogasertrags bzw. der Abbaurate pflanzlicher Biomasse, darauf aufbauend
- (4) zur Entwicklung von Produktionsverfahren für prozessfördernde Mikroorganismen sowie
- (5) zur Verfeinerung der Draft-Genome und Erweiterung der Referenzdatenbank.

Die Nutzung des erarbeiteten Datenmaterials fließt bereits jetzt in Forschungsvorhaben zur Modellierung der Biogasfermentation ein, z. B. in das durch die DFG geförderte Vorhaben „Bio-MetModell - Analyse und Modellierung der Biomethanisierung von pflanzlicher Biomasse“ (GZ KL 2069/3-1) in enger Kooperation mit der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und Umwelttechnik. Weitere Projekte hierzu befinden sich in Vorbereitung, u. a. mit der Leibniz-Universität Hannover, Institut für Elektrische Energiespeicher, Fachgebiet Elektrische Energiespeichersysteme.

Arbeiten zur Entwicklung von molekularen Markern für speziesspezifische Schnellnachweisverfahren wurden im Rahmen dieses Teilvorhabens bereits begonnen (s. Kap. II.1.10). Diese Arbeiten konnten jedoch aus Kapazitätsgründen bislang nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Es ist jedoch beabsichtigt, diese Arbeiten zeitnah als Grundlage für ein Folgeprojekt zu der 2015 abgeschlossenen Wirtschaftskooperation „META-GENE - Entwicklung eines PCR-basierten Analyse-Kits für Faulungsanlagen“ (FKZ 16KN017629, Förderung durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie im Rahmen des Förderprogramms Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand) zu nutzen. Gegenstand dieses Folgevorhabens könnte z. B. die Entwicklung von molekularen Markern zum Nachweis und zur Quantifizierung der im Rahmen dieses Vorhabens isolierten und charakterisierten *Bacteroidetes*-Stämme in Biogasreaktoren sein als Basis für ein analytisches Tool zur Analyse und Überwachung von Biogasreaktoren. In diesem Zusammen sollte insbesondere die in diesem Projekt begonnene Entwicklung eines qPCR-Systems zur Quantifizierung der neuen Bakterienart *Petrimonas mucosa* fortgeführt werden und zukünftig bei der Untersuchung von Praxisanlagen eingesetzt werden, um Korrelationen zwischen der Abundanz dieses Phylotyps und dem Reaktorzustand zu erfassen.

Im Rahmen des Projekts wurde eine Reihe bislang unbekannter Bakterienarten isoliert, deren vollständige Charakterisierungen die Projektlaufzeit bei weitem überschritten hätte. Die Untersuchung und Beschreibung dieser bisher unbekanntenen Mikroorganismen

würde jedoch einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der „black box“ der Biogas-Mikrobiologie leisten. Die gewonnenen mikrobiellen Isolate sowie vorhandene Anreicherungen können daher als Grundlage für weitere Projekte dienen, beispielsweise für ein etwaiges Anschlussprojekt. Bevor jedoch die Entwicklung großtechnischer Produktionsverfahren in Angriff genommen werden kann, ist eine ausführlichere Beschreibung der gewonnenen Isolate sowie der Anreicherungskulturen dringend erforderlich. Hierzu zählen insbesondere die Aufklärung des Stoffwechsels der Isolate, die Erfassung der metabolischen Aktivität unter den Bedingungen im Biogasreaktor sowie die Betrachtung der Interaktion mit anderen im Biogasreaktor auftretenden Mikroorganismen. Im Falle der Anreicherungskulturen ist darüber hinaus die Identifizierung der beteiligten mikrobiellen Arten essentiell. Neben den Leistungen beim Abbau von Stickstoffverbindungen ist bei den im Rahmen dieser Studie isolierten neuen Arten von Mikroorganismen bzw. der gewonnenen Anreicherungskulturen insbesondere deren Fähigkeit zum Abbau von prozesstechnisch „schwierigen“ organischen Säuren wie Propionsäure biotechnologisch und wirtschaftlich hoch interessant.

Eine Sequenzierung der Genome von neuartigen Arten konnte im Rahmen dieses Verbundvorhabens bereits für 34 Genome durchgeführt werden. Wie zuvor beschrieben konnten jedoch wesentlich mehr potentiell biotechnologisch geeignete Isolate und Anreicherungskulturen gewonnen werden, für die aus Kosten- und Kapazitätsgründen bislang keine weiteren Charakterisierungsarbeiten, insbesondere Genomsequenzierungen, durchgeführt werden konnten. Diese Arbeiten sollten unbedingt in einem Folgevorhaben fortgeführt werden.

Ebenso ist eine wesentlich umfassendere bioinformatische Auswertung der vorhandenen Genomdaten dringend erforderlich. Hierzu wurde dem Projektträger FNR am 8.12.14 eine Ideenskizze für ein entsprechendes Forschungsvorhaben zum Thema „BIOGAS-GeneMining - Metaanalyse des Biogas-Mikrobioms – Charakterisierung von ökologischen Zusammenhängen, Identifizierung des genetischen und enzymatischen Potentials und Ableitung von Biomarkern („gene mining“) auf Basis einer bioinformatischen Metaanalyse vorliegender Genom- und Metagenomdatensätze“ zur Prüfung vorgelegt.

Des Weiteren müsste die Referenzdatenbank für externe Nutzer besser und leichter verfügbar gestaltet werden. Hierzu besteht ggf. Potential zur Verknüpfung mit „de.NBI - German Network for Bioinformatics Infrastructure (<https://www.denbi.de/>, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung).

Die Ergebnisse dieses Vorhabens haben deutlich gezeigt, dass nach wie vor viel mikrobiologische Grundlagenarbeit notwendig ist, um das System „Biogasreaktor“ zu verstehen. Viele der an der Biomethanisierung beteiligten Mikroorganismen sind auf Artebene unbekannt oder auf genetischer und physiologischer Ebene unzureichend charakterisiert. Teilweise zählen die Mikroorganismen eines Biogasreaktors sogar zu bislang unbekannt Familien wenn nicht sogar (wesentlich) höheren unbekannt taxonomischen Einheiten. Aus Sicht der Autoren ist daher die Fortsetzung der mikrobiologischen

und molekularbiologischen Arbeiten essentiell um eine Grundlage für mögliche biotechnologische Anwendung. Hierbei sollte idealerweise die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) als Partner mit einbezogen werden.

### II.3 Ergebnisse von Seiten Dritter

Am 07.12.2015 erfolgte eine Abfrage der Literaturlatenbank Web-of-Knowledge der Fa. Thompson-Reuters für die Stichwörter „core AND microbiome“ und „biogas AND genome“ in der Rubrik „Topic“ für die Jahre 2013 bis 2015. Die Abfrage des ersten Suchbegriffs ergab 218 Publikationen, keine dieser Publikationen bezog sich jedoch auf die Untersuchung von Biogasreaktoren. Die Abfrage des zweiten Suchbegriffs ergab 47 Publikationen, darunter elf Veröffentlichungen von mikrobiellen Genomen aus Biogasanlagen. Zehn dieser Publikationen sind im Rahmen des BIOGAS-CORE-Projekts entstanden. In der einzigen Publikation ohne BIOGAS-CORE Beteiligung von RUAN *et al.* (2014) wurde die Genomsequenz eines Bakteriums der Klasse *Bacilli* aus „Biogas-Schlamm“ veröffentlicht.

### II.4 Veröffentlichungen

Im Rahmen bzw. unter Beteiligung von Teilprojekt 1 wurden folgende Fachartikel veröffentlicht oder sind derzeit bei renommierten Fachzeitschriften eingereicht:

- (1) MAUS I., BREMGES A., STOLZE Y., **HAHNKE S.**, CIBIS K.G., KOECK D.E., KIM Y.S., KREUBEL J., HASSA J., WIBBERG D., WEIMANN A., OFF S., STANTSCHIEFF R., ZWERLOV V.V., SCHWARZ W.H., KÖNIG H., LIEBL W., SCHERER P., MCHARDY A.C., SCZYRBA A., **KLOCKE M.**, PÜHLER A., SCHLÜTER A. (eingereicht zur Begutachtung): Genome characteristics of bacterial and archaeal isolates from anaerobic digestion microbiomes and their prevalence in industrial biogas plants.
- (2) TOMAZETTO G., **HAHNKE S.**, LANGER T., WIBBERG D., BLOM J., MAUS I., PÜHLER A., **KLOCKE M.**, SCHLÜTER A. (eingereicht zur Begutachtung): The completely annotated genome, comparative genomics and description of *Peptoniphilus elegans* sp. nov., a novel acidogenic bacterium isolated from a mesophilic biogas reactor.
- (3) **HAHNKE S.**, LANGER T., KOECK D.E., **KLOCKE M.** (2016): Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov. isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66: 1466-1475. DOI: 10.1099/ijsem.0.000902
- (4) KOECK D.E., **HAHNKE S.**, ZVERLOV V.V. (2016): *Herbinix luporum* sp. nov.; a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, im Druck. DOI: 10.1099/ijsem.0.001324
- (5) MAUS I., KOECK D.E., CIBIS K.G., **HAHNKE S.**, KIM Y.S., LANGER T., KREUBEL J., ERHARD M., BREMGES A., OFF S., STOLZE Y., JAENICKE S., GOESMANN A., SCZYRBA A., SCHERER P., KÖNIG H., SCHWARZ W.H., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHLÜTER A., **KLOCKE M.** (2016): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and

- metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels* 9:171. DOI: 10.1186/s13068-016-0581-3
- (6) TOMAZETTO G., **HAHNKE S.**, KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., PÜHLER A., **KLOCKE M.**, SCHLÜTER A. (2016): Complete genome analysis of *Clostridium bornimense* strain M2/40T: a new acidogenic *Clostridium* species isolated from a mesophilic two-phase laboratory-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 232: 38-49. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.001
- (7) **HAHNKE S.**, MAUS I., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., **KLOCKE M.**, SCHLÜTER A. (2015): Complete genome sequence of the novel *Porphyromonadaceae* bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 193: 34-36. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.010
- (8) **HAHNKE S.**, STRIESOW J., ELVERT M., MOLLAR X.P., **KLOCKE M.** (2014): *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2792-2797. DOI: 10.1099/ij.s.0.059691-0
- (9) **HAHNKE S.**, WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., **KLOCKE M.**, SCHLÜTER A. (2014): Whole genome sequence of *Clostridium bornimense* strain M2/40 isolated from a lab-scale mesophilic two-phase bio-gas reactor digesting maize silage and wheat straw. *Journal of Biotechnology* 184: 199-200. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.026
- (10) TOMAZETTO G., **HAHNKE S.**, MAUS I., WIBBERG D., PÜHLER A., SCHLÜTER A., **KLOCKE M.** (2014): Complete genome sequence of *Peptoniphilus* sp. strain ING2-D1G isolated from a mesophilic lab-scale completely stirred tank reactor utilizing maize silage in co-digestion with pig and cattle manure for biomethanation. *Journal of Biotechnology* 192: 59-61. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.011

### Zitierte Literatur

- BRENNER D.J. (1973):** Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 23: 298-307.
- CHEN S., DONG X. (2005):** *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2257-2261.
- CLAUS D. (1992):** A standardized Gram staining procedure. *World J Microbiol Biotechnol* 8, 451-452.
- DRIDI B., KHELALFIA S., FARDEAU M.L., OLLIVIER B., DRANCOURT M. (2012):** Tungsten-enhanced growth of *Methanospaera stadtmannae*. *BMC Res Notes* 5: 238.
- FALK S., LIU B., BRAKER G. (2010):** Isolation, genetic and functional characterization of novel soil nirK-type denitrifiers. *Syst Appl Microbiol* 33: 337-347.
- 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.
- GRABOWSKI A., TINDALL B.J., BARDIN V., BLANCHET D., JEANTHON C. (2005):** *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1113-1121.
- HAHNKE S., STRIESOW J., ELVERT M., MOLLAR X.P., KLOCKE M. (2014A):** *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 2792-2797.
- HAHNKE S., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2014B):** Whole genome sequence of *Clostridium bornimense* strain M2/40 isolated from a lab-scale meso-

philic two-phase biogas reactor digesting maize silage and wheat straw. *J Biotechnol* 184: 199-200.

- HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2015A):** Complete genome sequence of the novel *Porphyromonadaceae* bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *J Biotechnol* 193: 34-36.
- HAHNKE S., LANGER T., KOECK D.E., KLOCKE M. (2015):** Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentomonas caenicola* gen. nov., sp. nov. isolated from mesophilic lab-scale biogas reactors and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *Int J Syst Evol Microbiol*, eingereicht.
- HANREICH A., SCHIMPF U., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., BENNDORF D., HEYER R., RAPP E., PÜHLER A., REICHL U., KLOCKE M. (2013):** Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol* 36: 330-338.
- HAO B., GONG W., FERGUSON T.K., JAMES C.M., KRZYCKI J.A., CHAN M.K. (2002):** A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296: 1462-1466.
- JOHNSON J.L. (1984):** Nucleic acids in bacterial classification. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. N. R. Krieg & J. G. Holt, (ed). pp. 8-11. Williams & Wilkins, Baltimore.
- KAMPMANN K., RATERING S., KRAMER I., SCHMIDT M., ZERR W., SCHNELLA S. (2012):** Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Appl Environ Microbiol* 78: 2106-2119.
- KAMPMANN K., RATERING S., GEIBLER-PLAUM R., SCHMIDT M., ZERR W., SCHNELL S. (2014):** Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresour Technol* 174: 108-117.
- KLANG J., THEUERL S., SZEZYK U., HUTH M., TÖLLE R., KLOCKE M. (2015):** Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbiol Biotechnol* 8: 764-775.
- KODAMA Y., SHIMOYAMA T., WATANABE K. (2012):** *Dysgonomonas oryzaevi* sp. nov., isolated from a microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 3055-3059.
- KOECK D.E., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2014):** Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Syst Appl Microbiol* 37: 311-319.
- KOECK D.E., HAHNKE S., ZVERLOV V. (2015):** *Herbinix treslupi* sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol*, eingereicht.
- 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.
- KRIEG N.R., LUDWIG W., EUZÉBY J., WHITMAN W.B. (2010):** Phylum XIV. *Bacteroidetes* phyl. nov. In: Krieg N.R., Parte A., Ludwig W., Whitman W.B., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Ward N., Brown D. (Editors): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. 2nd edn, pp. 25-469. Springer, New York.
- KRÖBER M., BEKEL T., DIAZ N.N., GOESMANN A., JAENICKE S., KRAUSE L., MILLER D., RUNTE K.J., VIEHÖVER P., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2009):** Phylogenetic characterization of a bio-

- gas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol* 142: 38-49.
- LI T., MAZÉAS L., SGHIR A., LEBLON G., BOUCHEZ T. (2009):** Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions. *Environ Microbiol* 11: 889-904.
- LIU F.H., WANG S.B., ZHANG J.S., ZHANG J., YAN X., ZHOU H.K., ZHAO G.P., ZHOU Z.H. (2009):** The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *J Appl Microbiol* 106: 952-966.
- 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.
- MERLIN CHRISTY P., GOPINATH L.R., DIVYA D. (2014):** A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev* 34: 167-173.
- MILLER G.I. (1959):** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- PATUREAU D., ZUMSTEIN E., DELGENES J.P., MOLETTA R. (2000):** Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microbiol Ecol* 39: 145-152.
- PRAMONO A.K., SAKAMOTO M., IINO T., HONGOH Y., OHKUMA M. (2015):** *Dysgonomonas termitidis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 681-685.
- 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.
- ROSSELLÓ-MORA R., AMANN R. (2001):** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67.
- RUAN Z., WANG Y., SONG J., ZHAI Y., ZHANG C., CHEN C., LI Y., ZHAO B., ZHAO B. (2014):** Draft genome sequence of *Kurthia huakuii* LAM0618<sup>T</sup>, an organic-pollutant-degrading strain isolated from biogas slurry. *Genome Announc* 2: e01158-13.
- SAKAMOTO M., SUZUKI M., UMEDA M., ISHIKAWA I., BENNO Y. (2002):** Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 841-849.
- SÁNCHEZ-ANDREA I., SANZ J.L., STAMS A.J. (2014):** *Microbacter margulisiae* gen. nov., sp. nov., a propionigenic bacterium isolated from sediments of an acid rock drainage pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 3936-3942.
- SMIBERT R.M., KRIEG N.R. (1994):** Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood & N.R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- KIM M., OH H.-S., PARK S.-C., CHUN J. (2014):** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 346-351.
- SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N. N., DONDRUP M., EICHENLAUB R., GARTEMANN K. H., KRAHN I., KRAUSE L., KROMEKE H., KRUSE O., MUSSGNUG J. H., NEUWEGER H., NIEHAUS K., PÜHLER A., RUNTE K. J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., TILKER A., VIEHOVER P., GOESMANN A. (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136: 77-90.

- STACKEBRANDT E., GOEBEL B.M. (1994):** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
- STANTSCHIEFF R., KUEVER J., RABENSTEIN A., SEYFARTH K., DRÖGE S., KÖNIG H. (2014):** Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 5719-5735.
- ST-PIERRE B., WRIGHT A.D. (2014):** Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2709-2717.
- SU J.J., LIU B.Y., LIN J., YANG C.P. (2001):** Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere. *J Appl Microbiol* 91: 853-860.
- THEUERL S., KOHRS F., BENNDORF D., MAUS I., WIBBERG D., SCHLÜTER A., KAUSMANN R., HEIERMANN M., RAPP E., REICHL U., PÜHLER A., KLOCKE M. (2015):** Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 7791-7803.
- 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.
- TOMAZETTO G., HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., PÜHLER A., SCHLÜTER A., KLOCKE M. (2014):** Complete genome sequence of *Peptoniphilus* sp. strain ING2-D1G isolated from a mesophilic lab-scale completely stirred tank reactor utilizing maize silage in co-digestion with pig and cattle manure for biomethanation. *J Biotechnol* 192: 59-61.
- TOMAZETTO G., HAHNKE S., KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., PÜHLER A., LIEBL W., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2015):** Complete genome analysis of *Clostridium bornimense* strain M2/40<sup>T</sup>: a new acidogenic *Clostridium* species isolated from a mesophilic two-phase lab-scale biogas reactor. *J Biotechnol*, doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.001, in Druck.
- UEKI A., AKASAKA H., SUZUKI D., UEKI K. (2006):** *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 39-44.
- WAGENER K., DRILLICH M., BAUMGARDT S., KÄMPFER P., BUSSE H.J., EHLING-SCHULZ M. (2014):** *Falsiporphyrmonas endometrii* gen. nov., sp. nov., isolated from the post-partum bovine uterus, and emended description of the genus *Porphyromonas* Shah and Collins 1988. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 642-649.
- WAYNE L.G., BRENNER D.J., COLWELL R.R., GRIMONT P.A.D., KANDLER O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE L.H., MOORE W.E.C., MURRAY R.G.E. & OTHER AUTHORS (1987):** Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463-464.
- WEILAND P. (2010):** Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 849-860.
- YANG Y.J., ZHANG N., JI S.Q., LAN X., ZHANG K.D., SHEN Y.L., LI F.L., NI, J.F. (2014):** *Dysgonomonas macrotermis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 2956-2961.
- YARZA P., RICHTER M., PEPLIES J., EUZEBY J., AMANN R., SCHLEIFER K.H., LUDWIG W., GLÖCKNER F.O., ROSSELLÓ-MÓRA R. (2008):** The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* 31: 241-250.

- ZAKRZEWSKI M., GOESMANN A., JAENICKE S., JÜNEMANN S., EIKMEYER F., SZCZEPANOWSKI R., AL-SOUD W.A., SØRENSEN S., PÜHLER A., SCHLÜTER, A. (2012):** Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J Biotechnol* 158: 248-258.
- ZIGANSHIN A.M., LIEBETRAU J., PRÖTER J., KLEINSTEUBER S. (2013):** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 5161-5174.



# Schlussbericht

## zum Verbundvorhaben

Thema: **Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen**  
**Teilvorhaben 2: Genom-Sequenzierung bisher unbekannter Spezies aus Fermentationsproben ausgewählter Biogasanlagen**

Förderkennzeichen: 22006712

Zuwendungsempfänger: Universität Bielefeld  
Centrum für Biotechnologie - CeBiTec  
Universitätsstraße 27  
D-33615 Bielefeld

Berichtverfasser: M.Sc. Irena Maus  
Dr. Andreas Schlüter  
Prof. Dr. Alfred Pühler

Kontakt: Dr. Andreas Schlüter  
Tel.: 0521/106-8757  
aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de



## Inhaltverzeichnis

<b>1</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>95</b>
<b>1.1</b>	<b>Aufgabe des Centrums für Biotechnologie (CeBiTec)</b> .....	<b>95</b>
<b>2</b>	<b>Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde</b> .....	<b>95</b>
<b>2.1</b>	<b>Planung und Ablauf des Vorhabens</b> .....	<b>95</b>
2.1.1	Genom-Sequenzierung und Assemblierung unbekannter Spezies aus Fermentationsproben.....	95
2.1.2	Herstellung und Sequenzierung von <i>Whole</i> -Metagenom-Sequenzierbibliothek und bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten .....	98
<b>2.2</b>	<b>Wissenschaftlicher und technischer Stand</b> .....	<b>100</b>
<b>2.3</b>	<b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b> .....	<b>100</b>
<b>3</b>	<b>Eingehende Darstellung der Projektergebnisse</b> .....	<b>101</b>
<b>3.1</b>	<b>Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen</b> .....	<b>101</b>
3.1.1	Sequenzierung des <i>Clostridium thermocellum</i> BC1 Isolats aus einer Biogas-Produktionsanlage .....	103
3.1.2	Sequenzierung des <i>Ruminoclostridium cellulosi</i> DG5 Isolats aus einer Biogas-Produktionsanlage .....	104
3.1.3	Sequenzierung der <i>Lachnospiraceae</i> Vertreter, <i>Herbinix</i> sp. SD1D und <i>Herbinix hemicellulosilytica</i> T3/55 <sup>T</sup> aus der thermophilen Biogasanlage Viersen .....	106
3.1.4	Sequenzierung der <i>Bacteroidetes</i> Vertreter <i>Porphyromonas</i> sp. ING-E5A und <i>Proteiniphilum</i> sp. ING-E5B aus einem Biogas-Laborfermenter .....	108
3.1.5	Genomsequenz des Isolats <i>Propionispora</i> sp. 2/2 37 aus einem mesophilen, einphasigen Biogasreaktor .....	111
3.1.6	Genomsequenz des Isolats <i>Bacillus thermoamylovorans</i> 1A1 aus einer thermophilen Biogasanlage .....	113
3.1.7	Genomsequenz des Isolats <i>Clostridium bornimense</i> M2/40 <sup>T</sup> .....	114
3.1.8	Sequenzierung und Analyse von <i>Defluviitoga tunisiensis</i> L3 aus einer thermophilen Biogas-Produktionsanlage .....	123
3.1.9	Sequenzierung von <i>Peptoniphilus</i> sp. ING2-D1G ( <i>Firmicutes</i> ) aus einem Biogas-Laborfermenter .....	131
3.1.10	Sequenzierung und Analyse des <i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup> Genoms .....	137
3.1.11	Comparative Analysen für Isolate aus dem Genus <i>Methanobacterium</i> unter besonderer Berücksichtigung des Isolates <i>Methanobacterium formicicum</i> Mb9 .....	142
<b>3.2</b>	<b>Taxonomische und funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft der thermophilen Biogasanlage Viersen</b> .....	<b>147</b>

---

3.2.1	Taxonomische Charakterisierung der thermophilen mikrobiellen Biogasgemeinschaft auf Basis der metagenomischen 16S rDNA Sequenzen .....	147
3.2.2	Funktionelle Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der Biogasanlage Viersen basierend auf Metagenom-Sequenzdaten .....	148
3.2.3	Beurteilung der Abundanz von Isolaten aus der thermophilen BGA Viersen auf Basis von Metagenom-Sequenzdaten.....	152
3.2.4	Phylogenetische Einordnung bakterieller und archaealer Isolate unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme .....	154
<b>4</b>	<b>Fazit zu Teilvorhaben 2 .....</b>	<b>157</b>
4.1	Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	158
4.2	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	158
4.3	Nutzen und Verfügbarkeit des Ergebnisses .....	158
4.4	Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	159
4.5	Geplante Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse.....	159
4.6	Präsentation der Ergebnisse in der Öffentlichkeit.....	162
<b>I</b>	<b>Referenzen: .....</b>	<b>163</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
ATB	Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e. V.
BGA	Biogasanlage
Bp	Basenpaare
Ca.	Circa
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC-Nummern	Numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
HAW	Hochschule für angewandte Wissenschaft Hamburg
JGU	Johannes-Guttenberg Universität Mainz
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RIPAC	RIPAC-Labor GmbH, Potsdam-Golm
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
TUM	Technische Universität München
z. B.	Zum Beispiel

## 1 Aufgabenstellung

### 1.1 Aufgabe des Centrums für Biotechnologie (CeBiTec)

Das CeBiTec arbeitet im Rahmen des Verbundvorhabens 'Etablierung eines Core-Mikrobioms für Biogasanlagen – (BIOGAS-CORE)' im Arbeitspaket 2 (AP2) an der Ermittlung der Struktur und Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft einer thermophilen Biogas-Produktionsanlage sowie an der Genom-Sequenzierung bisher unbekannter Spezies aus Biogasproben ausgewählter Fermenter. Komparative Betrachtungen der gewonnenen Isolate mit taxonomisch nah verwandten und bereits sequenzierten Vertretern schließen sich an. Ein weiteres Ziel ist die Bestimmung der Abundanz der gewonnenen Isolate mittels *Fragment Recruitments* von korrespondierenden Metagenom-Datensätzen auf die Genomsequenzen der jeweiligen Stämme. Erkenntnisse aus diesem Projekt sollen als Basis für die Entwicklung von rationalen Strategien zur Optimierung der Biogas-Produktion genutzt werden. Im Folgenden werden die Projektergebnisse des Arbeitspakets 2 dargestellt.

## 2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die taxonomische Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften einer thermophilen Praxisbiogasanlage sowie die Genom-Sequenzierung bisher unbekannter Spezies aus Fermentationsproben ausgewählter Biogasanlagen sollte am CeBiTec der Universität Bielefeld durchgeführt werden. Die Verfügbarkeit der Plattform für die Hochdurchsatz-Sequenzierung von Genomen und Metagenomen auf dem Illumina MiSeq System war eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung des Projekts. Des Weiteren wurden Software-Lösungen für die Analyse und Interpretation von Genom- und Metagenom-Sequenzdaten genutzt, die in der Technologie-Plattform Bioinformatik am CeBiTec zuvor entwickelt wurden.

### 2.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

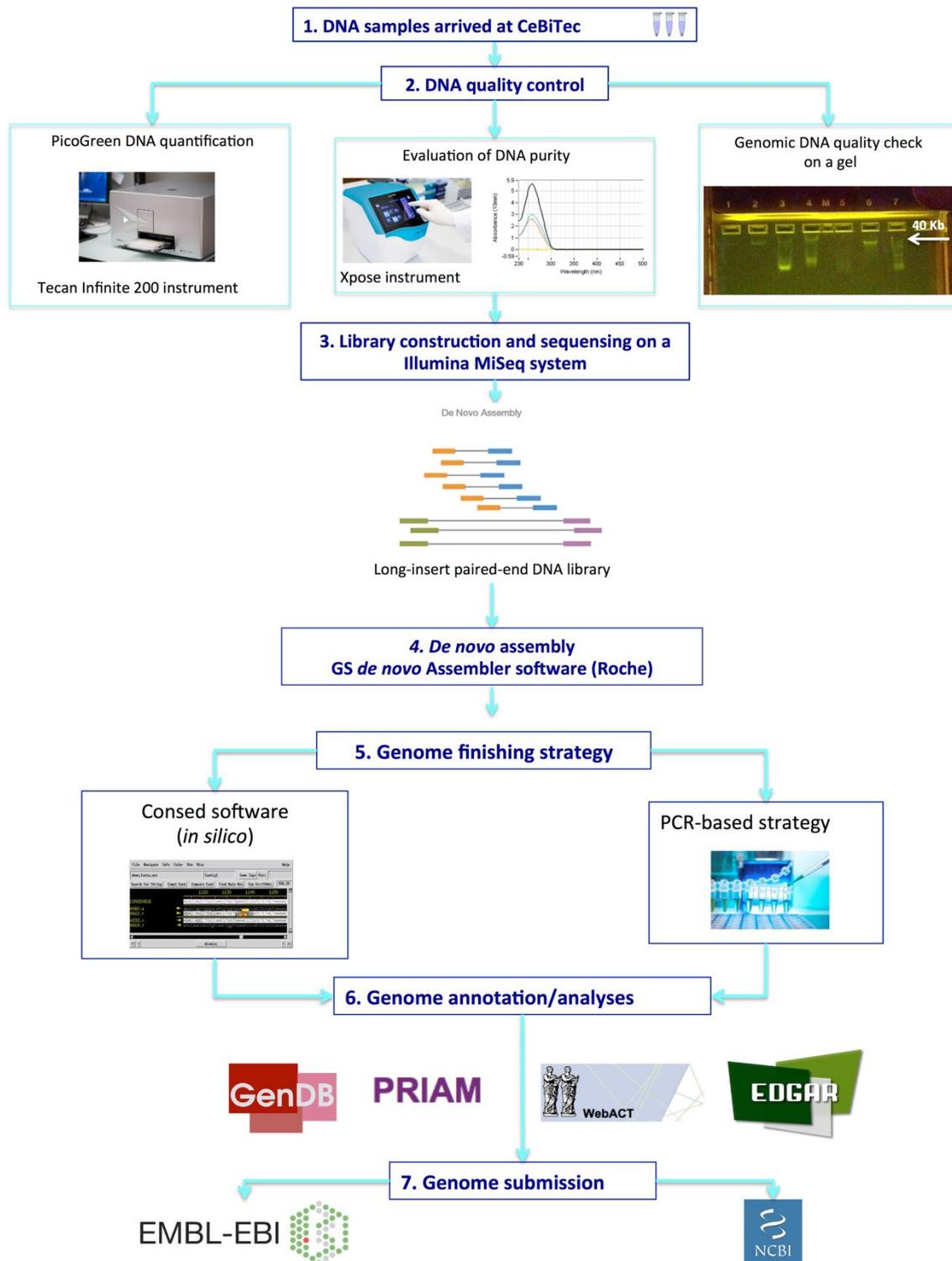
#### 2.1.1 Genom-Sequenzierung und Assemblierung unbekannter Spezies aus Fermentationsproben

Im Rahmen des 'BIOGAS-CORE' Projektes wurden von den Partnern HAW, TUM, JGU, RIPAC und ATB Anreicherungen und Isolate für hydrolytische, cellulolytische und säurebildende Bakterien und methanogene *Archaea* gewonnen. Nach der Auswahl geeigneter Isolate durch die Partner wurde das Genom interessanter Stämme am CeBiTec vollständig sequenziert.

Nach der Präparation der Gesamt-DNA der Isolate bei den Partnern, sind am CeBiTec Sequenzierbibliotheken erstellt und die Genome der ausgewählten Stämme sequenziert worden. Zunächst wurden die DNA-Extrakte verschiedenen Qualitäts- und Quantitätskontrollen unterzogen. Die Bestimmung der DNA Konzentration fand unter Verwendung

eines *Tecan Infinity Instruments* (Tecan, USA) statt. Gleichzeitig wurden die Proben auf ihren RNA-Gehalt mit dem *Xpose* Gerät (Trinean) untersucht. Das Vorhandensein von RNA ist unerwünscht, da sie bei der Herstellung von Sequenzierbibliotheken stört. Außerdem führt ihre Anwesenheit in einem DNA-Extrakt zu einer fehlerhaften Bestimmung der DNA-Konzentration. Im letzten Schritt fand die Überprüfung der mittleren Größe der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese statt. Wurden 4 µg einer hochmolekularen (Fragmentlängen > 40 kb), RNA-freien DNA-Probe geliefert, konnte eine *Nextera Mate Pair Library* hergestellt werden. Hierfür wurde der *Nextera Mate Pair Library Preparation Kit* (Illumina, USA) verwendet. Das besondere Merkmal dieser Art von Bibliothek ist die Generierung von langen *Mate-Pair* Fragmenten, die die spätere Assemblierung der Sequenzen erleichtern. Im Falle einer fragmentierten DNA wurde eine PCR-freie Sequenzierbibliothek hergestellt und im *paired-end* Modus sequenziert.

Die nach der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen. Im nächsten Schritt wurde das Programm *GS de novo Assembler 2.8* (Roche) angewandt, um die Sequenzen automatisch zu assemblieren. Ein *in silico Finishing*-Prozess schließt sich an, um Lücken im Genom zu schließen. Im Falle eines nicht vollständig geschlossenen Genomes wurde eine PCR basierte Strategie für den Lückenschluss angewandt. Des Weiteren wurde die Genomsequenz mit dem Programm *GenDB* (MEYER *et al.* 2003) annotiert, analysiert und visualisiert. Eine vergleichende Analysen der sequenzierten Stämme wurde mit dem Programm *EDGAR* (BLOM *et al.* 2009) durchgeführt. Die Hinterlegung der Genomsequenzen in einer öffentlichen Datenbank wie EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) oder NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) stellte den letzten Arbeitsschritt dar. Die **Abbildung 1** skizziert das Vorgehen der Erstellung einer *Whole-Genome-Sequenzierbibliothek* für die Hochdurchsatz-Sequenzierung nach Lieferung der DNA-Probe.



**Abbildung 1:** Arbeitsschritte zur Erstellung einer *Whole-Genome*-Sequenzierbibliothek für die Hochdurchsatz-Sequenzierung am CeBiTec und bioinformatische Analyse der Genomsequenzen für ausgewählte Biogas-Isolate (nähere Erklärungen im Text).

In der **Tabelle 1** sind Sequenz-Datenbanken und bioinformatische *Tools*, die für Genom-Sequenzanalysen eingesetzt wurden, aufgelistet.

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten bioinformatischen *Tools* und Datenbanken im 'BIOGAS-CORE' Projekt.

Programm	Beschreibung	Referenz
ACT	Analyse von Sequenzhomologien zwischen Genomen	CARVER <i>et al.</i> 2008
ARB	Erstellung von phylogenetischen Bäumen	LUDWIG <i>et al.</i> 2004
Consed 27.0	Genom <i>Finishing-Tool</i>	GORDON <i>et al.</i> 1998
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes database</i>	YIN <i>et al.</i> 2012
EDGAR 2.0	Komparative Genomanalysen	BLOM <i>et al.</i> 2009
GenDB 2.4	Annotationsplattform für Bakterien	MEYER <i>et al.</i> 2003
GS Mapper	Mapping von Sequenzen	Roche Inc.
MGX	Analyse-Plattform für metagenomische Sequenzen	JAENICKE <i>et al.</i> in Vorbereitung
PHAST	Detektion von integrierten Phagen	ZHOU <i>et al.</i> 2011
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>	COLE <i>et al.</i> 2005
SINA	Berechnung eines multiplen Sequenzalignments	PRUESSE <i>et al.</i> 2012
SILVA	<i>SILVA ribosomal RNA gene database project</i>	QUAST <i>et al.</i> 2013

### 2.1.2 Herstellung und Sequenzierung von *Whole*-Metagenom-Sequenzierbibliothek und bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten

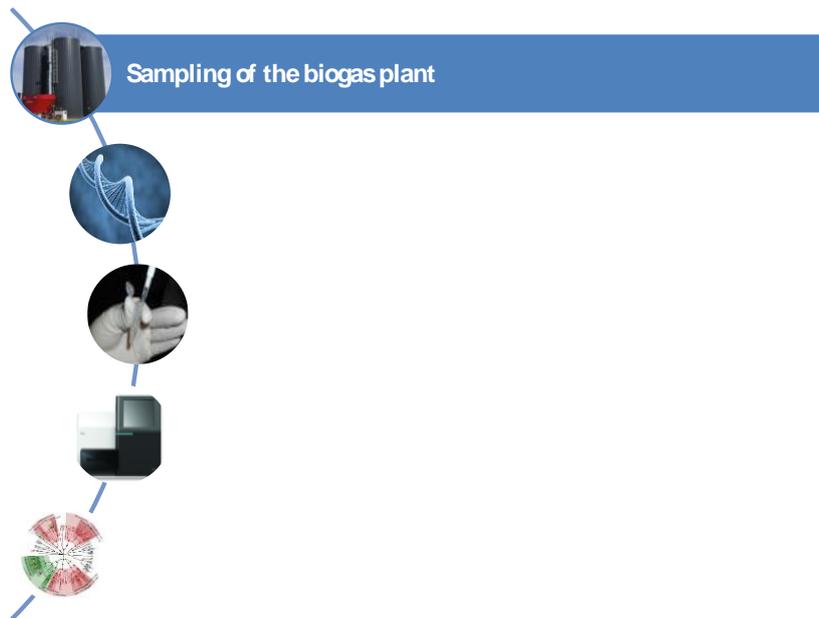
Die thermophile Biogas-Produktionsanlage (BGA) Viersen (NRW, Deutschland) wurde vom 'BIOGAS-CORE' Konsortium zur gemeinsamen Beprobung und Charakterisierung ausgewählt. Die BGA Viersen wurde am 19.12.2013 vom CeBiTec beprobt und die Fermentationsprobe wurde anschließend zur Aufarbeitung und DNA-Extraktion ins Labor (Bielefeld) transportiert. Die zu analysierende Probe stammte aus dem ersten Hauptfermenter, dessen Grundeigenschaften zusammenfassend im Schlussbericht des Teilvorhabens 4 (HAW) dargestellt sind.

Im ersten Schritt wurde die Gesamt-DNA der mikrobiellen Gemeinschaft isoliert. Um den Zellaufschluss effektiv zu gestalten und die DNA von möglichst vielen verschiedenen Bakterien zu gewinnen, sind fünf verschiedene DNA-Extraktionsprotokolle angewandt worden. Vier kommerzielle Kits mit einem mechanischen Zellaufschluss und ein Hausprotokoll mit einer enzymatische Lyse kamen zur Anwendung: (A) *Fast DNA spin kit for Soil* (MP Biomedicals, Frankreich); (B) *NucleoSpin Soil* (Macherey und Nagel, Deutschland); (C) *PowerLyzer DNA isolation kit* (MoBio, USA); (D) *PowerSoil DNA isolations kit* (MoBio, USA); (E) CTAB-Methode der DNA Extraktion (u.a. beschrieben in Schlüter *et al.* 2008). Für die Herstellung einer *Whole*-Metagenom Sequenzierbibliothek wurde je Probe 1 µg Gesamt-DNA eingesetzt.

Zunächst wurde die genomische DNA mittels *GS Rapid Library Nebulizer* (Roche) und unter Verwendung von mechanischen Scherkräften zu ca. 550 bp kurzen Stücken fragmentiert. Mittels eines *Illumina TruSeq DNA PCR-free sample preparation Kits* (Il-

lumina, USA) wurden glatte Enden an den DNA-Fragmenten geschaffen und anschließend adenyliert. Im letzten Schritt wurden über den A-Überhang am Fragmentende Sequenzier-Adaptoren sowie *Rapid-Library-Multiplex-Identifizier* (MIDs) mit den ca. 550 bp langen DNA-Stücken verknüpft. Die zehn Nukleotide langen MIDs erlauben die spätere Proben-spezifische Trennung der erhaltenen Sequenzen. Die Befreiung der gewonnenen Sequenzierbibliotheken von nicht ligierten MIDs und Sequenzier-Adaptoren erfolgte anschließend mit dem *Agencourt AMPure XP Kit* (Beckman Coulter). Eine Konzentrations- und Qualitätskontrolle für die anstehende Sequenzierung auf dem Illumina MiSeq System schloss sich an. Die Illumina V3 Chemie mit 600 Cyclen (2 x 300 bp) im *paired-end* Modus kam zur Anwendung.

Die nach der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen und entsprechend ihrer MID-Sequenzen in fünf verschiedene Metagenomdatensätze getrennt. Als nächstes sind überlappende *paired-end* Sequenzen mittels des *Tools Flash* (MAGOČ *et al.* 2011) zusammengefügt worden. Des Weiteren sind je Datensatz 1,3 Millionen Sequenzen zufällig extrahiert worden und zu einem kombinierten Datensatz, bestehend aus insgesamt 6,5 Millionen Sequenzen, vereinigt worden. Die Metagenom Annotationsplattform MGX (JAENICKE *et al.* in Vorbereitung) kam zur Anwendung, um diesen kombinierten Metagenomdatensatz taxonomisch und funktionell zu analysieren. In diesem Kontext sind metagenomische 16S rDNA Sequenzen taxonomisch klassifiziert worden. Dies geschah durch Abgleich mit der *Ribosomal Database Project* (RDP) Datenbank (<http://rdp.cme.msu.edu/taxomatic/main.spr>). Die '16S-Pipeline' in MGX wurde hierfür verwendet. Die funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgte mittels Anwendung der sog. 'COG-Pipeline' in MGX, die die metagenomischen Sequenzen mit der COG (*Cluster of Orthologous Groups of proteins*) Datenbank (TATUSOV *et al.* 2000, TATUSOV *et al.* 2001) abgleicht. Die **Abbildung 2** gibt eine schematische Übersicht der grundlegenden Schritte zur Erstellung einer *Whole-Metagenome-Sequenzierbibliothek*.



**Abbildung 2:** Schematische Übersicht zur Erstellung einer *Whole*-Metagenome-Sequenzierbibliothek für die Hochdurchsatz Sequenzierung (nähere Erklärungen im Text).

## 2.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Aus verschiedenen Forschungsvorhaben unserer Arbeitsgruppe sowie aus der wissenschaftlichen Literatur ist die grundsätzliche Struktur der mikrobiellen Biogasegemeinschaften bestehend aus den Hauptgruppen *Firmicutes*, *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* usw. (auf der taxonomischen Ebene Phylum) bekannt (KRAUSE *et al.* 2008, SCHLÜTER *et al.* 2008, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012, STOLZE *et al.* 2015). Im Gegensatz zu mesophilen Fermentern ist die mikrobielle Zusammensetzung einer thermophile Biogasanlage bislang nur unzureichend untersucht worden (RITARI *et al.* 2012, LEBUHN *et al.* 2014). Des Weiteren sind die meisten beteiligten Mikroorganismen aus Praxisanlagen bislang unbekannt. Ebenso sind ihre Stoffwechselleistungen wenig charakterisiert worden. Die Kenntnis der Biogas-Mikrobiologie wird jedoch als Schlüssel für die weitere technologische Optimierung der Biogasproduktion angesehen.

## 2.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die direkte Zusammenarbeit umfasste alle Mitglieder des 'BIOGAS-CORE'-Konsortiums. Gemeinsam wurden Biogasisolate für die Sequenzierung ausgewählt und Protokolle für die Isolierung geeigneter Gesamt-DNAs erarbeitet. Schließlich erfolgte die gemeinsame Analyse der Sequenzierergebnisse. In Kooperation mit Prof. Dr. Helmut König, Dr. Robbin Stantscheff und Katharina Cibis (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, AP3) wurden die Genome der Isolate *Methanoculleus bourgensis* MS2<sup>T</sup>, *Defluviitoga tunisiensis* L3 und von mehreren Stämmen der Gattung *Methanobacterium* sequenziert, manuell annotiert und analysiert. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Klocke

und Dr. Sarah Hahnke vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (AP1) wurden u.a. die Genome der Stämme *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> und *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G sequenziert, manuell annotiert und im Detail ausgewertet. Die Kollegen von der Technischen Universität München (Prof. Dr. Wolfgang Schwarz, Dr. Vladimir Zverlov und Daniela Köck von der technischen Universität München, AP5) lieferten zahlreiche Isolate des Phylums *Firmicutes* zur Genomsequenzierung. Die Kooperation mit Prof. Dr. Scherer, Dr. Sandra Off und Young Sung Kim von der HAW Hamburg (AP4) mündete in der Sequenzierung von drei methanogenen *Archaea*, deren Sequenzdaten zurzeit in Bearbeitung sind.

### 3 Eingehende Darstellung der Projektergebnisse

#### 3.1 Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen

In Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern ATB, JGU, HAW und TUM wurden am CeBiTec die Genome von 18 bakteriellen Organismen und 7 methanogenen *Archaea* sequenziert. Die entsprechenden Isolate stammen aus unterschiedlichen Biogasanlagen, die in der **Tabelle 2** aufgeführt werden. Nach der Sequenzierung wurden die gewonnenen Sequenzdaten assembliert und die Genome automatisch und in einigen Fällen manuell annotiert. Vergleichende Genomanalysen mit nah verwandten Stämmen schlossen sich an und wurden mit dem Programm EDGAR (BLOM *et al.* 2009) durchgeführt. Die Genomsequenzen von 11 der 25 Stämme wurden bereits in Form eines *Genome Announcements* publiziert (**Tabelle 2**). Die *Genome Announcements* für zwei weitere Isolate, nämlich *Herbinix* sp. SD1D und *Propionispora* sp. 2/2 37 sind zurzeit in Vorbereitung. Im Weiteren werden die Ergebnisse der Genomsequenzierungen für 13 Biogas-Isolate im Detail vorgestellt.

**Tabelle 2:** Isolate aus Biogas-Produktionsanlagen, deren Genome im Rahmen des Projekts sequenziert wurden.

Nr.	Specification	Species name	Strain	Taxonomy (family level)	Origin	Genome structure	Genome size [Mb]	EBI accession no.	Reference
1	Hydrolytic	<i>Ruminiclostridium cellulosi</i>	DG5	Clostridiaceae	BGP Pellmayer, Munich	Single chromosome	2.2	ERP006074	KOECK et al. 2014
2	Hydrolytic	<i>Propionispora</i> sp.	2/2-37	Veillonellaceae	BGP, Munich	Draft genome	4.1	CYSP01000001- CYSP01000043	KOECK et al. in preparation
3	Hydrolytic	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	PP17-6a	Clostridiales incertae sedis	Lab-scale BGP, Potsdam	Draft genome	3.5	-	-
4	Hydrolytic	<i>Proteiniphilum</i> sp.	M3/6	Porphyromonadaceae	Lab-scale BGP, Potsdam	Draft genome	4.6	-	-
5	Hydrolytic	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	TUM3/55 <sup>†</sup>	Clostridiaceae	BGP, Munich	Draft genome	3.0	CVTD02000001- CVTD02000035	KOECK et al. 2015
6	Hydrolytic	<i>Herbinix</i> sp.	SD1D	Clostridiaceae	BGP, Munich	Draft genome	2.6	LN879430	-
7	Hydrolytic/syntroph	<i>Clostridium</i> sp.	DW1	Clostridiaceae	BGP Obere Blies, Mainz	Single chromosome	3.1	-	-
8	Hydrolytic/cellulolytic	<i>Clostridium herbivorans</i> *	37.3 h6	Clostridiaceae	BGP, Munich	Draft genome	-	-	-
9	Hydrolytic/cellulolytic	<i>Clostridium</i> sp.	N3C	Clostridiaceae	BGP, Viersen	Draft genome	3.4	-	-
10	Hydrolytic/syntroph	<i>Deffluviatoga tunisiensis</i>	L3	Thermotogaceae	BGP, Viersen	Single chromosome	2.0	LN824141	MAUS et al. 2015
11	Hydrolytic/acidogenic	<i>Selenomonas bovis</i> *	Gly Wagner 3.4	Veillonellaceae	BGP, Mainz	-	-	-	-
12	Cellulolytic	<i>Clostridium barnimense</i>	M2/40 <sup>†</sup>	Clostridiaceae	Lab-scale BGP, Potsdam	Replicor 1 Replicor 2	2.9 0.6	HG917868 HG917869	HAHNKE et al. 2014
13	Cellulolytic	<i>Clostridium thermocellum</i>	BC1	Clostridiaceae	Compost, Munich	Single chromosome	3.4	CBQ0010000001- CBQ0010000139	KOECK et al. 2014
14	Secondary fermenter	Porphyromonadaceae	ING2_E5B	Porphyromonadaceae	Lab-scale BGP, Potsdam	Single chromosome	2.8	LN515532	HAHNKE et al. 2014
15	Acetogenic	<i>Porphyromonas sulfuriphila</i>	ING2_E5A	Porphyromonadaceae	Lab-scale BGP, Potsdam	Draft genome	3.8	-	-
16	Acetogenic	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	1A1	Bacillaceae	BGP, Munich	Draft genome	3.7	CCRF01000001- CCRF01000106	KOECK et al. 2014
17	Acetogenic	<i>Peptoniphilus</i> sp.	ING2-D1G	Clostridiales incertae sedis	Lab-scale BGP, Potsdam	Single chromosome	1.6	LM997412	TOMAZETTO et al. 2014
18	Acetogenic	Peptoniphilaceae sp.*	Glahn 1.4	Peptoniphilaceae	BGP, Mainz	-	-	-	-
19	Methanogenic	<i>Methanobacterium formicicum</i>	MF <sup>†</sup>	Methanobacteriaceae	DSMZ, Braunschweig	Single chromosome	2.4	LN515531	MAUS et al. 2014
20	Methanogenic	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Mb9	Methanobacteriaceae	BGP Kaschenbach, Mainz	Single chromosome	2.4	-	-
21	Methanogenic	<i>Methanobacterium</i> sp.	Mb1	Methanobacteriaceae	BGP Obere Blies, Mainz	Single chromosome	2.0	HG425166	MAUS et al. 2013
22	Methanogenic	<i>Methanobacterium corvum</i>	-	Methanobacteriaceae	BGP, Pützberg, Hamburg	Single chromosome	2.4	-	-
23	Methanogenic	<i>Methanoculleus bourgenis</i>	MS2 <sup>†</sup>	Methanobacteriaceae	DSMZ, Braunschweig	Single chromosome	2.7	HE964772	MAUS et al. 2012
24	Methanogenic	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	L21-II-0	Methanobacteriaceae	Lab-scale BGP, Potsdam	Draft genome	2.9	-	-
25	Methanogenic	<i>Methanoculleus bourgenis</i>	HAW	Methanobacteriaceae	BGP, Pützberg, Hamburg	Draft genome	2.7	-	-

\* Nach der Sequenzierung stellte sich heraus, dass die Kultur stark kontaminiert war. Die Auswertung dieser Genomdaten war daher nicht möglich.

### 3.1.1 Sequenzierung des *Clostridium thermocellum* BC1 Isolats aus einer Biogas-Produktionsanlage

Das Isolat *Clostridium thermocellum* BC1 wurde in der Gruppe von Dr. W.H. Schwarz (Technische Universität München, AP5) gewonnen und am CeBiTec auf dem Illumina MiSeq System nach dem *Paired-end* Verfahren sequenziert. Die anschließende Assemblierung erfolgte mit dem GS Assembler (Version 2.6.). Die erzielten Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in der **Tabelle 3** dargestellt.

**Tabelle 3:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *C. thermocellum* BC1 Draft-Genoms.

Feature	<i>C. thermocellum</i> BC1
Number of reads	3,150,495
Number of sequenced bases	787.62 Mb
Number of assembled reads	3,014,770 (96.65%)
Number of assembled bases	710.28 Mb (96.45%)
<i>Paired-end</i> distance	361 – 1150 bp
Average distance	722.9 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	80
Number of <i>Scaffold</i> -bases	3,528,172 bp
Average <i>Scaffold</i> size	44,102 bp
Largest <i>Scaffold</i>	402,730 bp
Number of contigs	568
Number of bases within contigs	3,617,295 bp
Genome coverage	225x
Largest contig	180,222 bp

Die erwartete *C. thermocellum* Genomgröße von ca. 3,6 Mb wurde erreicht. Für die Sortierung und Anordnung der *Scaffolds* konnten zwei bereits fertige *C. thermocellum* Genome herangezogen werden. Beide Referenzen zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu dem neu sequenzierten Stamm. Insgesamt konnten an dem *C. thermocellum* ATCC27405 Genom 72 von 80 *Scaffolds* orientiert werden. Ein Vergleich des neu sequenzierten Stamms mit den Referenzsequenzen bestätigt die enge Verwandtschaft dieser Stämme. Das neue Isolat kann folglich zwanglos der Spezies *C. thermocellum* zugeordnet werden. Das Vorliegen von vielen repetitiven Elementen erschwert ein *in silico* *Finishing* des Genoms. Dennoch wird angestrebt, die Lücken im *C. thermocellum* BC1 Genom zu schließen, damit die Genomarchitektur mit den Referenzsequenzen verglichen werden kann. Eine weitergehende Analyse der Genomsequenz erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Annotationsplattform GenDB. Die Genomgröße beträgt 3.451.682 bp mit einem GC-Gehalt von 39,10%. In dem *C. thermocellum* BC1 *Draft*-Genom konnten 3.096 Gene,

52 tRNA Gene und vier *rrn* Operons vorhergesagt werden (**Tabelle 4**). Die Genomsequenz wurde als *Genome Announcement* veröffentlicht (KOECK *et al.* 2013).

**Tabelle 4:** Eigenschaften des *Clostridium thermocellum* BC1 Genoms.

Feature	<i>C. thermocellum</i> BC1
Genome size	3,454,918 bp
DNA coding	80%
GC content	39.10%
Replicons	1
Plasmids	0
Total genes	3,159
rRNA operons	4
tRNAs	52
Protein coding genes	3,095
Genes with predicted function	2,044

Analyse und Interpretation der *C. thermocellum* BC1 Genomsequenz führte zur Identifizierung aller bekannten Gene, die für das Wachstum des Stammes BC1 auf Cellulose und Cellodextrin notwendig sind. Des Weiteren sind Gene gefunden worden, die für den Abbau von kristalliner Cellulose verantwortlich sind. Die Suche nach Genen, die für Kohlenhydrat-aktive Enzyme (CAZymes) kodieren lieferte 358 Treffer. Des Weiteren sind im Genom von *C. thermocellum* BC1 Gene gefunden worden, die für Restriktionsenzyme und verschiedene Antibiotika-Resistenz-Determinanten kodieren. Diese Gene fehlen z.T. in anderen *C. thermocellum* Stämmen repräsentieren damit spezifische Eigenschaften des Stammes BC1.

### 3.1.2 Sequenzierung des *Ruminoclostridium cellulosi* DG5 Isolats aus einer Biogas-Produktionsanlage

Das Isolat *Ruminoclostridium cellulosi* DG5 wurde in der Gruppe von Dr. W.H. Schwarz (TUM, AP5) isoliert. Das Genom wurde auf dem Illumina MiSeq System unter Verwendung des *Mate-Pair*-Verfahrens am CeBiTec sequenziert (KOECK *et al.* 2014). Die Assemblierung der Sequenzdaten erfolgte mit dem GS Assembler (Version 2.8). Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Ruminoclostridium cellulosi* DG5 Genoms.

Feature	<i>R. cellulosi</i> DG5
Number of reads	2,513,979
Number of sequenced bases	576,818,571 bp
Number of assembled reads	2,503,395 (99.58%)
Number of assembled bases	573,911,338 bp (99.50%)
Paired-end distance	3,032 – 9,096 bp
Average distance	9,9060.3 bp
Number of Scaffolds	1
Number of Scaffold-bases	2,215,402 bp
Largest Scaffold	2,206,713 bp
Number of contigs	14
Number of bases within contigs	2,215.,83 bp
Largest contig	468,812 bp

Nach dem Schließen der Lücken in der Genomsequenz ergab sich für das Isolat DG5 eine Chromosomgröße von 2.229.578 Basen und ein durchschnittlicher GC-Gehalt von 44,15%. Auf dem *R. cellulosi* DG5 Chromosom konnten mittels GenDB 2.017 Kodierregionen vorhergesagt werden. Ferner konnten 59 tRNA Gene und vier *rrn* Operons identifiziert werden (**Tabelle 6**). Die Erstellung des *R. cellulosi* DG5 Genoms ist letztes Jahr in Form eines *Genome Announcements* veröffentlicht worden (KOECK *et al.* 2014).

**Tabelle 6:** Eigenschaften des *Ruminoclostridium cellulosi* DG5 Genoms.

Feature	<i>R. cellulosi</i> DG5
Genome size	2,229,578 bp
GC content	44.15%
Replicons	1
Plasmids	0
Total genes	2,088
rRNA operons	4
tRNAs	59
Protein coding genes	2,017
Genes with predicted function	1,069

Die Analyse und Interpretation der *R. cellulosi* DG5 Genomsequenz mit dem Programm GenDB sowie mittels des *Carbohydrate-active-enzyme Annotation Web-Servers* dbCAN führte zur Identifizierung von 136 Genen, die für Kohlenhydrat-aktive Enzyme kodieren. Diese gehören verschiedenen Familien von Glycosid-Hydrolase an, die die Hydrolyse

von glycosidischen Bindungen katalysieren. Des Weiteren wurden im DG5 Genom alle Gene gefunden, die für das Wachstum des Stammes auf Cellulose erforderlich sind. Im Vergleich zu *C. thermocellum* BC1 (KOECK *et al.* 2013) besitzt *R. cellulosi* DG5 keine Gene, die Cellulosom-Komponenten kodieren. Wie bei dem Stamm *R. cellulosi* CS 4-4 (ZHANG *et al.* 2014) wurden auch im *R. cellulosi* DG5 Genom Gene gefunden, die für Endoglucanasen und Xylanasen kodieren. Darüber hinaus lieferte der Vergleich von *R. cellulosi* CS 4-4 und *R. cellulosi* DG5 mit dem Programm EDGAR Core-Gene, die im Durchschnitt 99% Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen. Weitere Analysen zeigten große Übereinstimmungen in den Genomen der Stämme *R. cellulosi* DG5 und CS 4-4. Dies deutet darauf hin, dass beide Stämme sehr ähnlich sind und sich nur geringfügig in ihren charakteristischen Eigenschaften unterscheiden.

### 3.1.3 Sequenzierung der *Lachnospiraceae* Vertreter, *Herbinix* sp. SD1D und *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> aus der thermophilen Biogasanlage Viersen

Aus der thermophilen Biogasanlage Viersen wurden von der Gruppe von Dr. W. H. Schwarz zwei neue Cellulose-abbauende bakterielle Organismen, nämlich die Stämme T3/55 und SD1D, isoliert. Phylogenetische Analysen auf Basis von 16S rRNA Gensequenzen haben gezeigt, dass beide Stämme einer neuen Gattung innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* (Klasse *Clostridia*) zugeordnet werden können. Für das Isolat T3/55 wurde eine 93,9%ige Sequenzähnlichkeit zu *Mobilitalea sibirica* P3M-3<sup>T</sup> festgestellt, wohingegen der Stamm SD1D eine Ähnlichkeit von 92% zu dem Stamm *Lachnoclostridium phytofermentans* ISDg zeigte. Basierend auf diesen Befunden konnte der Stamm T3/55 als eine neue Spezies innerhalb der Gattung *Herbinix*, nämlich *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup>, beschrieben werden (KOECK *et al.* 2015). Die 16S rRNA-Gensequenz des Isolates SD1D zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 96,4% zu *H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup>. Daher repräsentiert der Stamm eine neue Art (*Herbinix* sp. SD1D). *Lachnospiraceae* Bakterien wurden bisher als Teil der mikrobiellen Gemeinschaften des Gastrointestinaltraktes von Menschen und Wiederkäuern beschrieben (MEEHAN & BEIKO 2014 und GOSALBES *et al.* 2011) und sind dort für den Abbau von komplexen Polysacchariden verantwortlich.

Die Genome der beiden *Herbinix* Stämme wurden auf dem Illumina MiSeq System sequenziert. Zur Anwendung kam das *Mate-Pair* Verfahren. Die Assemblierung der Sequenzdaten wurde mit dem GS *de novo* Assembler (Version 2.6.) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in den **Tabellen 7** und **8** zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> Genoms.

Feature	<i>H. hemicellulosilytica</i> T3/55 <sup>T</sup>
Number of reads	3,683,015
Number of sequenced bases	829,162,008 bp
Number of assembled reads	3,665,340 (99.52%)
Number of assembled bases	824,815,644 bp (99.48%)
<i>Paired-end</i> distance	3,485 – 10,445 bp
Average distance	6,970.3 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	10
Number of <i>Scaffold</i> -bases	3,088,458 bp
Largest <i>Scaffold</i>	2,543,764 bp
Number of contigs	113
Number of bases within contigs	2,976,987 bp
Largest contig	292,615 bp

**Tabelle 8:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Herbinix* sp. SD1D Genoms.

Feature	<i>Herbinix</i> sp. SD1D
Number of reads	1,766,358
Number of sequenced bases	357,174,077 bp
Number of assembled reads	1,738,081 (98.40%)
Number of assembled bases	351,355,881 bp (98.37%)
<i>Paired-end</i> distance	3,804 – 11,413 bp
Average distance	7,609.3 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	1
Number of <i>Scaffold</i> -bases	2,586,895 bp
Largest <i>Scaffold</i>	2,586,895 bp
Number of contigs	19
Number of bases within contigs	2,632,804 bp
Largest contig	802,815 bp

Die anschließende Assemblierung der Genomsequenzen von *H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> und *Herbinix* sp. SD1D führte zur Etablierung von zwei *Draft*-Genomen. Das *Draft*-Genom des Bakteriums T3/55<sup>T</sup> hat die Größe von 3.037.031 Basen und einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 36,69%. Mittels des *Softwar-Tools* GenDB wurden im T3/55<sup>T</sup> Genom 2.681 Protein-kodierende Sequenzen, sowie 35 tRNA Gene und vier *rrn* Operons identifiziert (**Tabelle 9**). Die Erstellung des *H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> *Draft*-Genoms ist kürzlich in Form eines *Genome Announcements* veröffentlicht worden (KOECK *et al.* 2015). Im Vergleich hierzu besitzt das *Draft*-Genom von *Herbinix* sp. SD1D eine Größe von 2.609.352 Basen und einen durchschnittlichen GC-Gehalt von

35,25%. Hier wurden 2.362 Protein-kodierende Sequenzen, 53 tRNA Gene und vier *rrn* Operons detektiert (**Tabelle 9**). Es ist beabsichtigt die *Draft*-Genomsequenz des Stammes *Herbinix* sp. SD1D in Kürze beim *Journal of Biotechnology* zu veröffentlichen (KOECK *et al.* in Vorbereitung).

*H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> und *Herbinix* sp. SD1D besitzen 155 bzw. 174 Gene für Kohlenhydrat-abbauende Enzyme. Diese konnten verschiedenen Glycosid-Hydrolase Familien zugeordnet werden. Darüber hinaus führte diese Analyse zur Identifizierung von denjenigen Genen, die dem Isolat T3/55<sup>T</sup> das Wachstum auf Cellulose erlauben. Das cellulolytische System von *H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> besteht aus drei Cellulasen, einer Endoglucanase (Glycosid-Hydrolase Familie 9 - GH9) und zwei Cellobiohydrolasen (GH5 und GH48), die vermutlich in den Cellulose-Abbau involviert sind. Für den Stamm SD1D wurde vorhergesagt, dass er fünf potentielle Endoglucanasen (GH9) und fünf Cellulasen (GH5) im Genom kodiert. Darüber hinaus wurden Gene für zwei putative Exoglucanasen (GH48) gefunden. Des Weiteren sind im SD1D Genom vier Gene identifiziert worden (2x GH9, GH48, GH11), die Teil eines *Cellulosoms* bilden könnten. Die entsprechenden Proteinsequenzen verfügen über eine *Dockerin* 1 Domäne. Ein *Scaffoldin* Protein bestehend aus fünf Typ 1 Cohesinen und vier Kohlenhydrat-bindenden Motiven CBM\_X2 wird ebenfalls im Genom kodiert. Die fünf *Cohesin*-Module vermitteln den Kontakt zu den Dockerinen der Glycosid-Hydrolasen. Mit Ausnahme eines Endoglucanase Gens, sind alle anderen *Cellulosom*-Gene in einem Cluster zusammengefasst. Einfache *Cellulosom*-Systeme wurden auch in anderen Bakterien, wie *Clostridium bornimense* (TOMAZETTO *et al.* 2015) oder *Clostridium cellulovorans* (TAMARU *et al.* 2000) gefunden und beschrieben.

**Tabelle 9:** Eigenschaften der *H. hemicellulosilytica* T3/55<sup>T</sup> und *Herbinix* sp. SD1D *Draft*-Genome.

Feature	Chromosome of <i>H. hemicellulosilytica</i> T3/55 <sup>T</sup>	Chromosome of <i>Herbinix</i> sp. SD1D
Genome size (bp)	3,037,031	2,609,352
GC content (%)	36.69	35.25
No. of protein-coding sequences	2,681	2,362
No. of functional protein-coding sequences	1,187	555
<i>rrn</i> operons	4	4
No. of tRNAs	35	53

### 3.1.4 Sequenzierung der *Bacteroidetes* Vertreter *Porphyromonas* sp. ING-E5A und *Proteiniphilum* sp. ING-E5B aus einem Biogas-Laborfermenter

Bei den Isolaten *Porphyromonas* sp. ING-E5A und *Proteiniphilum* sp. ING-E5B handelt es sich um Vertreter des Phylums *Bacteroidetes*, die aus einem Biogas-Laborfermenter

der Gruppe ATB (Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., AP1) gewonnen wurden. Beide Genome wurden auf dem Illumina MiSeq System sequenziert. Zur Anwendung kam das *Mate-Pair* Verfahren. Die Assemblierung der Sequenzdaten wurde mit dem GS *de novo* Assembler (Version 2.6.) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in den **Tabellen 10** und **11** zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Porphyromonas* sp. ING-E5A Genoms.

Feature	<i>Porphyromonas</i> sp. ING-E5A
Number of reads	1,080,978
Number of sequenced bases	235,989,691 bp
Number of assembled reads	1,075,647 (99.51%)
Number of assembled bases	234,584,016 bp (99.40%)
<i>Paired-end</i> distance	3,715 – 11,145 bp
Average distance	7,430.2 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	9
Number of <i>Scaffold</i> -bases	3,646,281 bp
Largest <i>Scaffold</i>	1,722,768 bp
Number of contigs	157
Number of bases within contigs	3,360,433 bp
Largest contig	148,790 bp

**Tabelle 11:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Proteiniphilum* sp. ING-E5B Genoms.

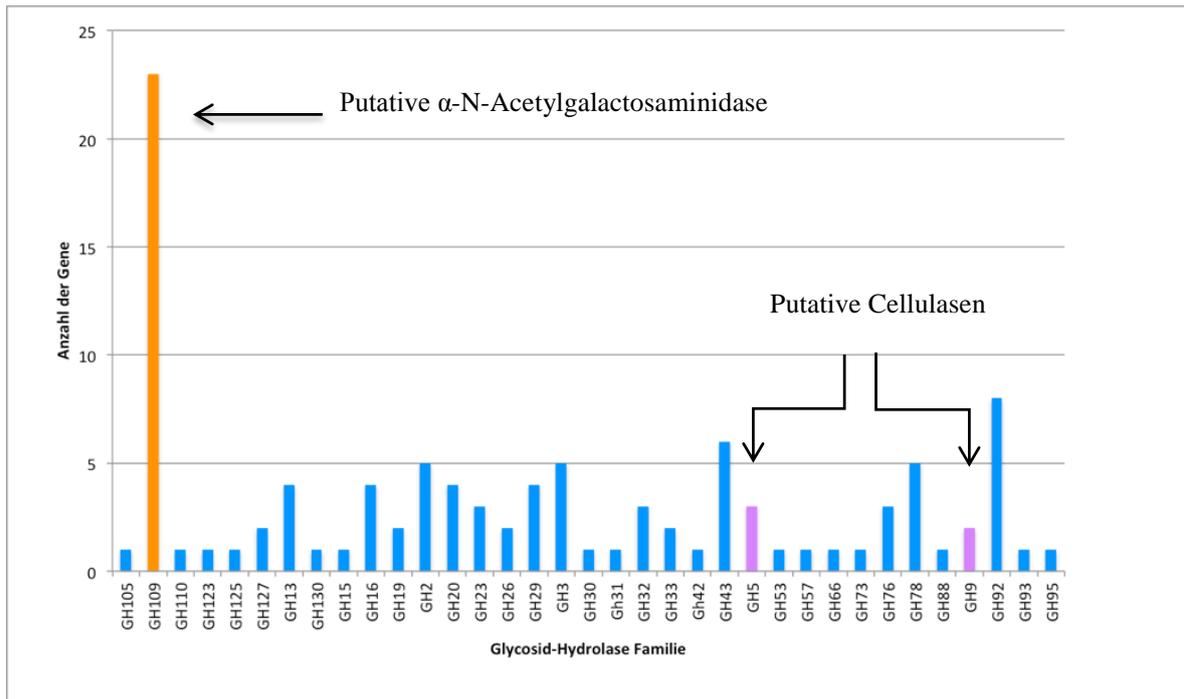
Feature	<i>Proteiniphilum</i> sp. ING-E5B
Number of reads	2,824,175
Number of sequenced bases	631,163,403 bp
Number of assembled reads	2,806,112 (99.36%)
Number of assembled bases	630,088,853 bp (99.83%)
<i>Paired-end</i> distance	4,857 – 14,572 bp
Average distance	9,714.7 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	5
Number of <i>Scaffold</i> -bases	2,800,680 bp
Largest <i>Scaffold</i>	750,982 bp
Number of contigs	38
Number of bases within contigs	2,782,994 bp
Largest contig	750,982 bp

Die Genomanalyse des Isolates *Porphyromonas* sp. ING-E5A ist noch nicht abgeschlossen und benötigt eine tiefergehende Auswertung. Aus diesem Grund werden nur die Ergebnisse der Genom-Sequenzierung und Assemblierung vorgestellt.

Nach der Sequenzierung und dem Schließen der Lücken in der Genomsequenz ergab sich für das Isolat ING-D1G eine Chromosomgröße von 2.808.926 Basen und ein durchschnittlicher GC-Gehalt von 37,30%. Auf dem Chromosom von *Proteiniphilum* sp. ING-E5B konnten mittels GenDB 2.405 Kodierregionen vorhergesagt werden. Ebenso konnten 44 tRNA Gene und zwei *rrn* Operons identifiziert werden. Die Erstellung des *Proteiniphilum* sp. ING-E5B Genoms ist dieses Jahr veröffentlicht worden (HAHNKE *et al.* 2015).

Die Analyse der im Genom von *Proteiniphilum* sp. ING-E5B kodierten Kohlenhydrat-abbauenden Enzyme mittels eines Abgleichs der *Proteiniphilum* sp. ING-E5B Proteinsequenzen gegen die *Carbohydrate-Active Enzymes Database*, ermöglichte die Identifizierung von 105 Genen, deren Genprodukte unterschiedlichen Glykosid-Hydrolase Familien zugeordnet werden konnten (**Abbildung 3**). Glykosid-Hydrolasen katalysieren die Hydrolyse von glykosidischen Bindungen. Die Liste der *Proteiniphilum* sp. ING-E5B Enzyme mit einer vorhergesagten GH-Domäne beinhaltet putative Cellulasen der Familien GH9 und GH5. Cellulasen sind Enzyme, die Cellulose abbauen.

Eine weitere Auffälligkeit stellen Gene dar, deren Genprodukte der GH-Familie 109 zugeordnet werden konnten. Vertreter dieser Familie repräsentieren  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidasen, die die Hydrolyse von N-Acetylgalactosamin oder N-Acetylglycosamin, einer strukturellen Komponente des Chitins, bewerkstelligen. Des Weiteren wurden im Genom mehrere Gene gefunden, die Peptidasen, Di- und Oligopeptidasen kodieren. Außerdem konnten im *Proteiniphilum* sp. ING-E5B Genom Gene identifiziert werden, die für eine Acetat- und Butyrat-Kinase sowie eine Fumarat-Reduktase kodieren. Diese Enzyme sind in die Synthese von Acetat, Butyrat und Succinat involviert. Darauf aufbauend wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Stamm ING-E5B acidogen ist. Das Genom von *Proteiniphilum* sp. ING-E5B wird zurzeit manuell von der Gruppe ATB (Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., AP1) annotiert, um konkretere Aussagen über das metabolische Potential dieses Mikroorganismus zu ermöglichen.



**Abbildung 3:** Verteilung von Genen im Genom von *Proteiniphilum* sp. ING-E5B, die für putative Glykosid-Hydrolasen kodieren. Die Familien GH5 und GH9, deren Vertreter potentielle Cellulasen repräsentieren, sind in der Farbe lila gekennzeichnet. Eine im Genom des Stammes ING-E5B sehr prominente Familie ist GH109 (orange Säule). Die Familie GH109 beinhaltet N- $\alpha$ -Acetylgalactosaminidasen.

### 3.1.5 Genomsequenz des Isolats *Propionispora* sp. 2/2 37 aus einem mesophilen, einphasigen Biogasreaktor

Der Stamm 2/2 37 wurde von der Gruppe von Dr. W.H. Schwarz aus einem mesophilen, einphasigen Biogasreaktor, der eine Mischung aus Maissilage, Weizenstroh und Gülle als Substrat bekommt, isoliert. Das Isolat gehört zur Gattung *Propionispora* innerhalb der Ordnung *Selenomonadales* (Klasse *Negativicutes*) und zeigt eine 95%ige 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeit zu *Propionispora hippei* DSM 15287. Zurzeit kann der Stamm 2/2 37 nicht eindeutig zu einer beschriebenen Familie zugeordnet werden und wurde deshalb dem Taxon *Selenomonadales Incertae Sedis* zugewiesen. Die phylogenetische Einordnung der Gattung *Propionispora* innerhalb der Familie *Veillonellaceae* wird zurzeit kontrovers diskutiert. Eine exakte taxonomische Klassifizierung von *Propionispora* sp. 2/2 37 gestaltet sich daher momentan als schwierig. Nur wenige Vertreter der Klasse *Negativicutes* sind bisher sequenziert worden. Es besteht daher ein großes Interesse, die Genominformation von neuen *Negativicutes* Mitgliedern für weitergehende Analysen zu nutzen.

Die Isolierung von genomischer DNA zur Erstellung einer Sequenzier-Bibliothek und Sequenzierung auf Illumina MiSeq System wurde wie von KOECK *et al.* (2015) beschrieben durchgeführt. Die Assemblierung der Sequenzdaten erfolgte mit dem GS Assembler (Version 2.8). Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in **Tabel-**

**le 12** zusammengefasst. Nach einem *in silico Finishing* mit dem Programm Consed (GORDON *et al.* 1998) konnte ein *Draft-Genom* für den Stamm *Propionispora* sp. 2/2 37 erstellt werden. Das *Draft-Genom* besitzt eine Größe von 4.122.013 Basen und einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 45,58%. Die Annotation des Genoms mit GenDB führte zur Identifikation von 3.960 Protein-kodierenden Sequenzen, 76 tRNA Genen und einem *rrn* Operon (**Tabelle 13**).

**Tabelle 12:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Propionispora* sp. 2/2 37 *Draft-Genoms*.

Feature	<i>Propionispora</i> sp. 2/2 37
Number of reads	7,619,324
Number of sequenced bases	2,048,864,807 bp
Number of assembled reads	7,452,878 (98.82%)
Number of assembled bases	1,006,005,360 bp (94.13%)
<i>Paired-end</i> distance	273 – 902 bp
Average distance	546.3 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	38
Number of <i>Scaffold</i> -bases	4,122,722 bp
Largest <i>Scaffold</i>	350,329 bp
Number of contigs	78
Number of bases within contigs	4,130,776 bp
Largest contig	317,657 bp

**Tabelle 13:** Eigenschaften des *Propionispora* sp. 2/2 37 *Draft-Genoms*.

Feature	<i>propionispora</i> sp. 2/2 37
Genome size (bp)	4,122,013
GC content (%)	45.58
Number of genes	3960
<i>rrn</i> operons	1
tRNA genes	76
Genes with a predicted function	912

Die Interpretation der Genomdaten sowie die Suche nach Genen, die Kohlenhydrat-aktive Enzyme kodieren, führte zur Identifikation von 150 entsprechenden genetischen Determinanten. Darunter sind Gene gefunden worden, deren Enzyme das Wachstum des Stammes 2/2 37 auf vielen Mono-, Di- und Polysacchariden wie Cellobiose, Sorbit, Xylan und Xylooligosaccharid erlauben. Propionsäure und Essigsäure stellen die möglichen Endprodukte dieses fermentativen Stoffwechsels dar. Alle hierfür notwendigen Gene sind im 2/2 37 Genom gefunden worden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Isolat 2/2 37 ein hydrolytisches und säurebildendes Bakterium repräsentiert. Dar-

über hinaus konnten unter Verwendung des Programm PHAST (ZHOU *et al.* 2011) drei Prophagen (etwa 32 bis 54 kb jeweils) im Genom des Stammes 2/2 37 vorhergesagt werden. Anwesenheit von Prophagen-Regionen im *Propionispora* sp. 2/2 37 Genom zeigt, dass die mikrobielle Biogasgemeinschaft einer Infektionen durch Phagen ausgesetzt sein könnte, was eine potentielle Gefahr für den gesamten Biogasprozess darstellt.

### 3.1.6 Genomsequenz des Isolats *Bacillus thermoamylovorans* 1A1 aus einer thermophilen Biogasanlage

Das thermophile Bakterium *Bacillus thermoamylovorans* 1A1 wurde aus Fermenterproben einer thermophilen Biogasanlage in der Nähe von München isoliert. Der Stamm 1A1 wurde auf einem GS-Medium mit Cellobiose als Kohlenstoffquelle angereichert und von den Verbundpartnern Dr. W. Schwarz und D. Köck zur Sequenzierung vorgeschlagen. Die Erstellung des *B. thermoamylovorans* 1A1 Genoms ist kürzlich in Form eines *Genome Announcements* veröffentlicht worden (KOECK *et al.* 2014). Das Genom wurde auf dem Illumina MiSeq System nach dem *Mate-Pair* Verfahren sequenziert. Zur Assemblierung der Sequenzdaten wurde der GS *de novo* Assembler (Version 2.8) angewandt. Eine Zusammenfassung über die Sequenzier- und Assemblierungsstatistik ist in der **Tabelle 14** zu finden.

**Tabelle 14:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *B. thermoamylovorans* 1A1 Genoms

Feature	<i>B. thermoamylovorans</i> 1A1
Number of reads	2.412.074
Number of sequenced bases	546.768.830 bp
Number of assembled reads	2.394.520 (99,27%)
Number of assembled bases	542.150.637 bp (99,16%)
<i>Paired-end</i> distance	4.935 – 14.805 bp
Average distance	9870,2 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	5
Number of <i>Scaffold</i> -bases	3.868.695 bp
Largest <i>Scaffold</i>	773.739 bp
Number of contigs	3,858.769 bp
Number of bases within contigs	139
Largest contig	3.747.954 bp

Die Assemblierung der *B. thermoamylovorans* 1A1 Sequenzdaten führte zur Erstellung eines *Draft*-Genoms mit der Größe von 3.708.331 Basen und einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 37,28% (**Tabelle 15**). Die Annotation des 1A1 *Draft*-Genoms mit dem

Programm GenDB resultierte in der Identifizierung von 3.472 Protein-kodierenden Sequenzen, 59 tRNA Genen und 10 *rrn* Operons.

Der Vergleich des *B. thermoamylovorans* 1A1 16S rRNA Gens mit nah verwandten Organismen zeigte eine 99% Sequenzähnlichkeit zu dem *B. thermoamylovorans* Typstamm DKP<sup>T</sup> (COMBET-BLANC *et al.* 1995). Im Gegensatz zu dem Stamm DKP<sup>T</sup>, der aus Wein isoliert wurde, ist der Stamm 1A1 das erste Isolat aus einer Biogas-Produktionsanlage. Im Genom des Isolates *B. thermoamylovorans* 1A1 wurden alle Gene gefunden, die das Wachstum dieses Stammes auf verschiedenen Polysacchariden wie Xylan, Pektin und Stärke erlauben. Dies lässt vermuten, dass *B. thermoamylovorans* 1A1 ein hydrolytisches Bakterium ist und in der Hydrolysephase des Biogasprozesses eine Rolle spielt.

**Tabelle 15:** Eigenschaften des *B. thermoamylovorans* 1A1 Draft-Genoms.

Feature	Chromosome
Genome size (bp)	3,707,331
GC content (%)	37.28
Number of genes	3,472
<i>rrn</i> operons	10
tRNAs	59

### 3.1.7 Genomsequenz des Isolats *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup>

Das Isolat M2/40<sup>T</sup> wurde in der Gruppe von Dr. M. Klocke (ATB, AP1) isoliert und als neue Spezies beschrieben (HAHNKE *et al.* 2014a). Der Stamm wurde nach dem Standort des ATBs, Potsdam-Bornim benannt und trägt jetzt den Namen *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup>. Das Genom wurde auf dem Illumina MiSeq System unter Verwendung des *Mate-Pair*-Verfahrens am CeBiTec sequenziert (TOMAZETTO *et al.* 2015). Die Assemblierung der Sequenzdaten erfolgte mit dem GS Assembler (Version 2.8). Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

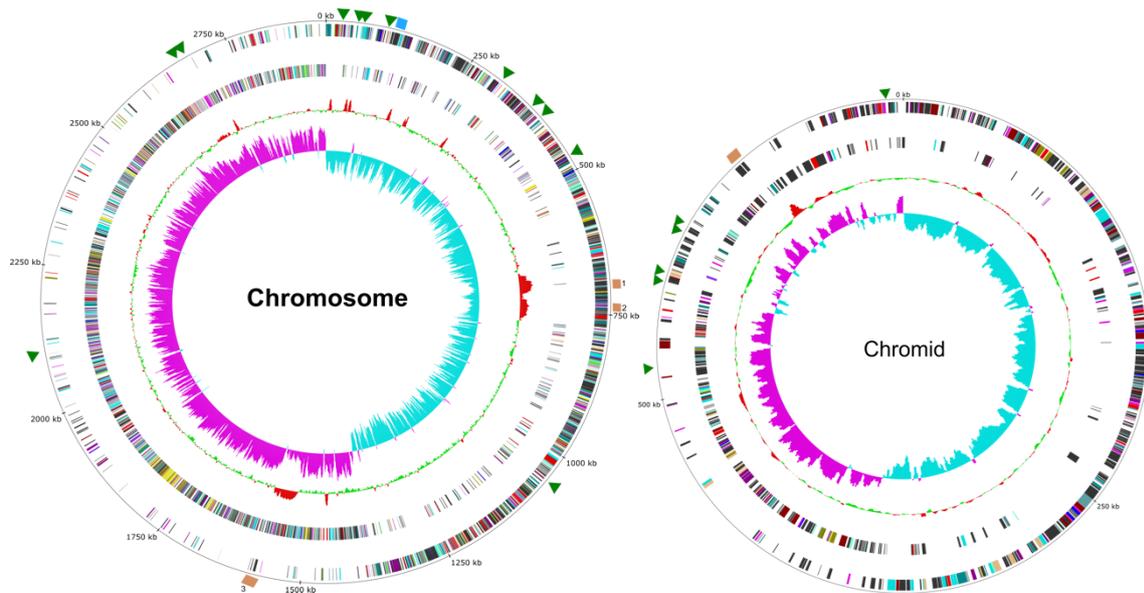
**Tabelle 16:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genoms.

Feature	<i>Clostridium bornimense</i> M2/40 <sup>T</sup>
Number of reads	798,042
Number of sequenced bases	191,346,246 bp
Number of assembled reads	1,360,023 (94.95%)
Number of assembled bases	271,307,791 bp (93.66%)
<i>Paired-end</i> distance	3,063 – 9,190 bp
Average distance	6,127 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	6
Number of <i>Scaffold</i> -bases	3,596,489 bp
Largest <i>Scaffold</i>	2,885,337 bp
Number of contigs	50
Number of bases within contigs	3,551,200 bp
Largest contig	664,315 bp

Das M2/40<sup>T</sup> Genom wird durch 50 *Contigs* in 6 *Scaffolds* repräsentiert. Aufgrund der geringen *Contig*-Anzahl konnte mittels *in silico Finishing* eine lückenlose Genomsequenz erstellt werden. Das Genom besteht aus zwei Replikons, einem Chromosom und einem Chromid. Zur weiteren Analyse des M2/40<sup>T</sup> Genoms wurden beide Replikons in die Annotationsplattform GenDB importiert, manuell annotiert und ausgewertet (**Tabelle 17**). Das erste M2/40<sup>T</sup> Replikon hat eine Größe von 2.917.864 bp, einen GC-Gehalt von 29,78% und kodiert 2,694 Gene (**Abbildung 3**). Es repräsentiert ein typisches primäres Chromosom, welches alle bekannten Haushaltsgene kodiert. Das zweite M2/40<sup>T</sup> Replikon (Größe: 699.161 bp, GC Gehalt: 28,09%, Gene: 680) ist ein sekundäres Replikon. Dabei wird aus der Sequenz nicht deutlich, ob es sich dabei um ein sekundäres Chromosom, ein Chromid oder ein Megaplasmid handelt. Dieses Replikon beinhaltet nur wenige vermutlich essentielle Gene und auch typische Plasmideigenschaften konnten bisher nicht gefunden werden. Der GC-Skew deutet allerdings auf einen chromosomalen Hintergrund hin.

**Tabelle 17:** Eigenschaften des *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genoms.

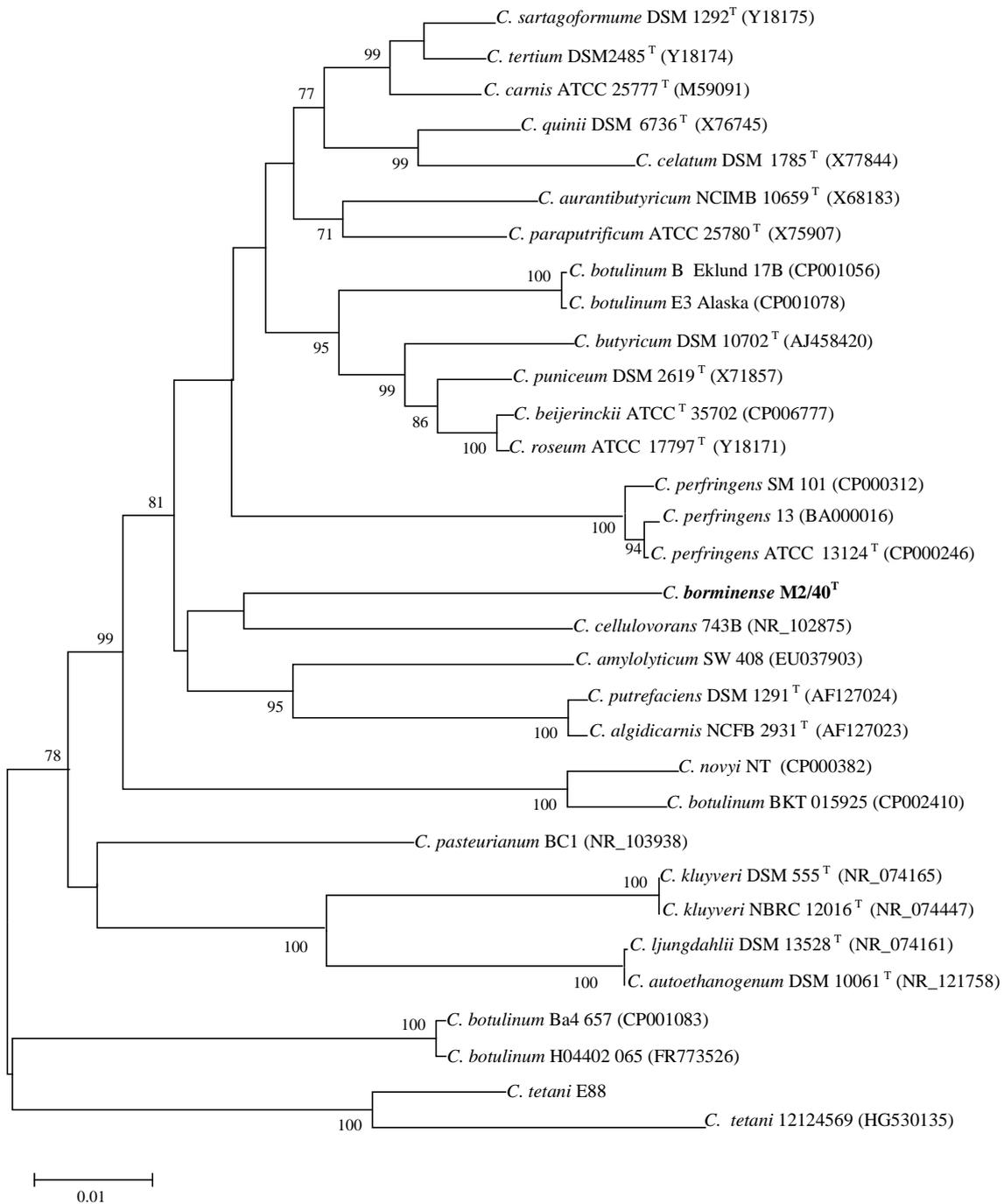
Feature	Chromosome	Chromid
Genome size (bp)	2,917,864	699,161
GC content (%)	29.78	28.09
Number of genes	2,694	680
<i>rrn</i> operons	8	0
tRNAs	56	0



**Abbildung 3:** Eigenschaften des *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> Chromosoms (links) und Chromids (rechts). Der äußere Kreis zeigt die Koordinaten des Genoms in Kilo-Basenpaaren (kb). Die nächsten beiden Kreise repräsentieren die kodierten Gene, die im Uhrzeigersinn und entgegen des Uhrzeigersinns transkribiert werden. Die Farbgebung entspricht der COG Klassifikation (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) der Gene. Kreis 4: GC-Gehalt, Kreis 5: GC-Skew. Braune Vierecke bezeichnen die kodierten Prophagen-Regionen (1, 2 und 3), grüne Pfeile repräsentieren Transposase Gene, das blaue Viereck steht für ein CRISPR-cas System.

Eine detaillierte phylogenetische Analyse basierend auf einem 16S rRNA Gen-Alignment hat gezeigt, dass *C. cellulovorans* 743B der nächste Verwandte zu *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> ist (**Abbildung 4**). Beide zusammen bilden eine 'Geschwistergruppe' zu dem Cluster mit den Isolaten *C. amylolyticum*, *C. putrefaciens* und *C. algidicarnis*. Die genannten Spezies gehören dem sog. *Clostridium* Cluster I an.

Biomasse-abbauende Mikroorganismen produzieren Kohlenhydrat-aktive Enzyme (CAZymes), die in der Lage sind, Cellulose- und Hemicellulose-haltiges Pflanzenmaterial in einfache Zucker wie z.B. Glucose zu zerlegen. Diese werden im weiteren Fermentationsprozess zum Aufbau von Zellbiomasse und zur Erzeugung von Energie und Biokraftstoffen verwendet. Das Genom von *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> wurde mit Hilfe des *Carbohydrate-active-enzyme Annotation Web-Servers* dbCAN (YIN *et al.* 2012) auf das Vorhandensein von Genen, die Kohlenhydrat-aktive Enzyme kodieren, überprüft. Insgesamt wurden 89 Gene vorhergesagt, die Kohlenhydrat-abbauende Enzyme kodieren. Darunter befinden sich 29 GHs, 36 Glycosyltransferasen (GT), 14 Kohlenhydratesterasen (CE) und 5 Polysaccharidlyasen (PL). Zusätzlich wurden 5 Gene gefunden, deren Genprodukte eine Kohlenhydrat-bindende Domäne (CBM) kodieren (**Tabelle 18**).



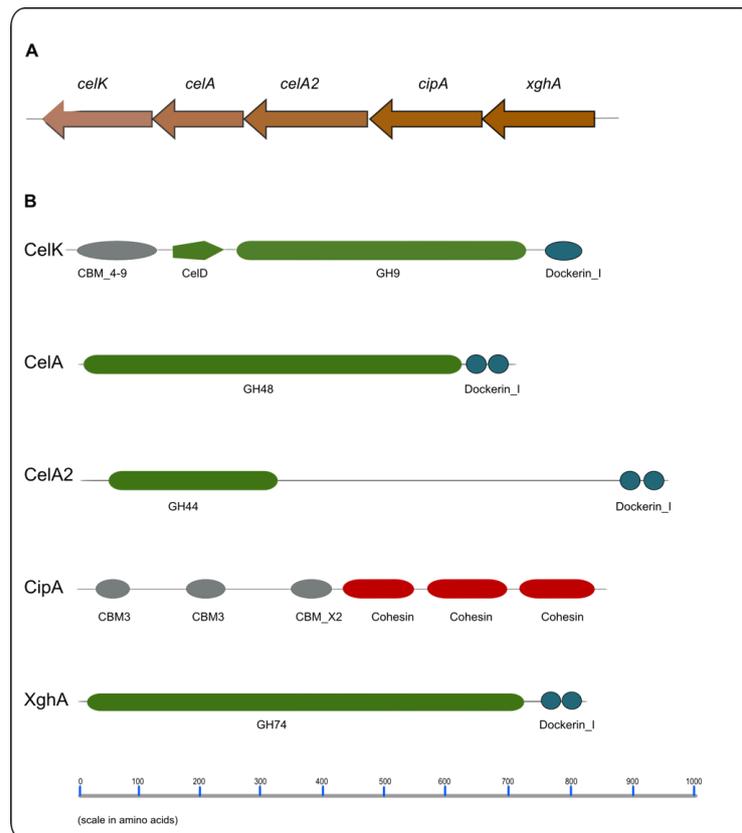
**Abbildung 4:** Phylogenetische Einordnung des Stammes *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> im Vergleich zu bekannten Typstämmen der Gattung *Clostridium* auf Basis von 16S rRNA Gen-Sequenzen.

**Tabelle 18:** Glycosid-Hydrolase Familien, die im *Clostridium bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genom kodiert sind.

<b>GH<sup>a</sup></b>	<b>Known activities</b>	<b>Annotated gene product</b>	<b>Localization</b>
GH1	β-glucosidase, β-galactosidase, 6-phospho-β-glucosidase, others	6-phospho-β-glucosidase (EC: 3.2.1.86)	CM240_1050; CM240_1755
GH3	Xylan 1,4-β-xylosidase, β-glucosylceramidase, others	β-N-acetylhexosaminidase (EC: 3.2.1.52)	CM240_1792
GH5	Cellulase, chitosanase, others	Putative cellulase	CM240_1811
		Endo-β-mannanase (EC: 3.2.1.78)	M2/40_chr2_21
		Endoglucanase A (EC: 3.2.1.4)	M2/40_chr2_202; M2/40_chr2_285
GH9	Endoglucanase, cellobiohydrolase, others	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (EC: 3.2.1.91)	M2/40_chr2_19
GH13	α-amylase, pullulanase, others	Glucan 1,6-α-glucosidase (EC:3.2.1.70)	CM240_0329
		Oligo-1,6-glucosidase (EC:3.2.1.10)	M2/40_chr2_324
		Cyclomaltodextrinase (EC: 3.2.1.54)	CM240_1115/ M2/40_chr2_9
		α-amylase (EC: 3.2.1.-)	CM240_0876; CM240_0420
		Pullulanase (EC: 3.2.1.41)	CM240_2198; CM240_2616; CM240_2617
		Trehalose-6-phosphate hydrolase (EC: 3.2.1.93)	CM240_2555
GH18	Chitinase, lysozyme, others	Chitinase A1 family protein (EC:3.2.1.14)	CM240_1107
		Glycosyl hydrolases family 18 (EC: 3.2.1.-)	CM240_0629; CM240_0688; CM240_1378
GH23	G-type lysozyme, peptidoglycan lyase, others	Transglycosylase, SLT Family	CM240_2196
GH30	Endo-β-1,4-xylanase, β-glucosidase, others	Glucuronoxylanase (EC: 3.2.1.136)	M2/40_chr2_286
GH44	Endoglucanase and xyloglucanase	Glycoside hydrolase family 44	M2/40_chr2_446
GH48	Endo-β-1,4-glucanase, chitinase	Endoglucanase A (EC: 3.2.1.4)	M2/40_chr2_24
GH74	Endoglucanase, xyloglucanase, others	Xyloglucanase (EC:3.2.1.151)	M2/40_chr2_20
GH77	Amylomaltase or 4-α-glucanotransferase activity	4-alpha-glucanotransferase (EC:2.4.1.25)	CM240_1993
GH94	Cellobiose phosphorylase, cello-dextrin phosphorylase, others	Glycosyltransferase family 36	CM240_0906

<sup>a</sup>GH – Glycoside hydrolase family

Des Weiteren fiel auf, dass auf dem zweiten Replikon ein Gencluster kodiert ist, dessen Genprodukte für eine *Cellulosom*-ähnliche Struktur kodieren (**Abbildung 5A**). Ein *Cellulosom* stellt einen extrazellulären Enzymkomplex dar, der für den Abbau von Cellulose zuständig ist. Der Cellulose-Abbau durch *Cellulosomen* wird als eine der effizientesten natürlichen Strategien zur Nutzung der Pflanzenzellwandbiomasse betrachtet (DOI 2008, JUTURU & WU 2014, SMITH & BAYER 2013). Das Chromid des Stammes M2/40<sup>T</sup> trägt fünf cellulosomale Gene, nämlich *xghA*, *cipA*, *celA2*, *celA* und *celK*, die in einem Cluster organisiert sind. In den Aminosäuresequenzen der Genprodukte der Gene *xghA*, *celA2*, *celA* und *celK* wurden mit Hilfe des dbCAN Web-Servers die Domänen der Glycosid-Hydrolase Familien GH74, GH44, GH48 und GH9 sowie eine Dockerindomäne Typ I vorhergesagt (**Abbildung 5B**). Das Gen *celK* kodiert zusätzlich eine Kohlenhydrat-bindende Domäne CBM\_4-9. Das Protein des Gens *cipA* repräsentiert ein mögliches *Scaffoldin*, das drei Kohlenhydrat-bindende Domänen (zwei CBM3- und eine CBM\_X2 Domäne), sowie drei *Cohesin*-Module besitzt. Es wird angenommen, dass die *Cohesin*-Module mit Dockerinen der Glycosid-Hydrolasen XghA, CelA2, CelA und/oder CelK in Verbindung treten.

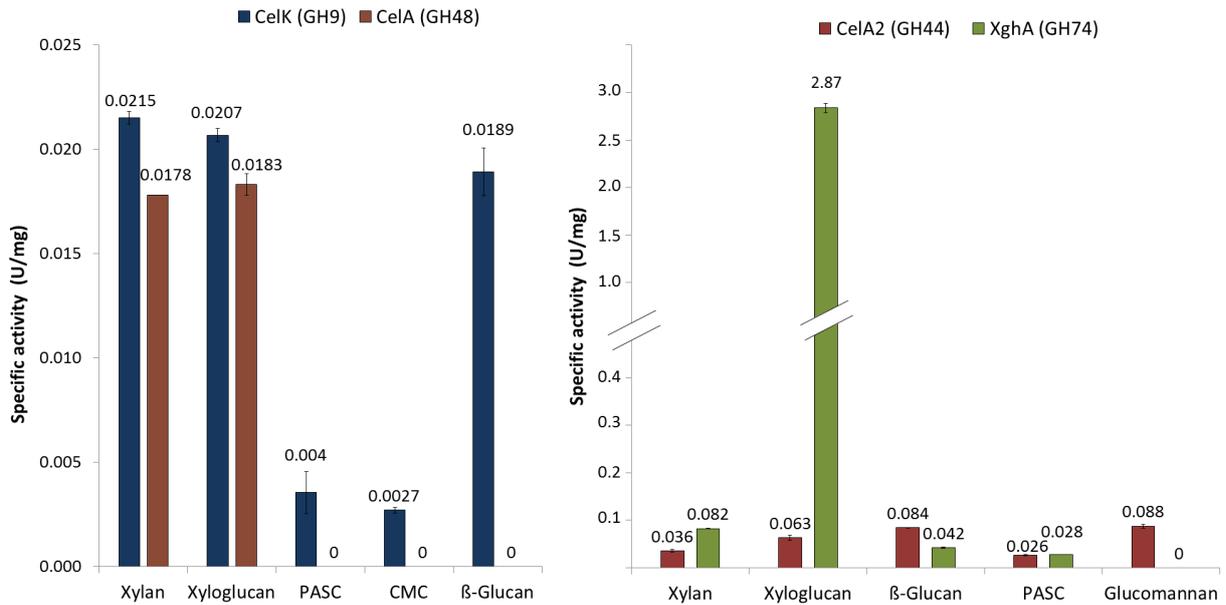


**Abbildung 5:** Putatives Cellulosom-Gencluster auf dem zweiten *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Replikon (Chromid). A: Die Anordnung der *Cellulosom*-Gene auf dem Chromid. B: Domänenstruktur der jeweiligen *Cellulosom* Proteine: CBM\_4\_9, Kohlenhydrat-bindende Domäne; CelD, N-terminale ig-ähnliche Domäne einer Cellulase; GH9, Cellulose 1,4-beta-Cellobiosidase; Dockerin\_I, Dockerin type I repeat; GH48, Endoglucanase A; GH44, Endo- $\beta$ -Mannanase; CBM3, Cellulose-bindende Domäne; CBM\_X2, Kohlenhydrat-bindende Domäne X2; Cohesin, Cohesin-Domäne, GH74, Xyloglucanase.

Unter den bekannten mesophilen *Clostridien* besitzen nur *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> und *C. acetobutylicum* kein vollständiges Cellulosom (NÖLLING *et al.* 2001, SABATHÉ *et al.* 2003, HAHNKE *et al.* 2014). Des Weiteren wurden bei *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* und *C. bornimense* keine Gene gefunden, die Cellulosom-Ankerproteine kodieren. Zusätzlich wurden im Falle von *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> keine Signalpeptid-Sequenzen in den Cellulosom-Proteinen identifiziert. Somit bleibt unklar, ob die *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Cellulosom-Proteine ausgeschleust werden können.

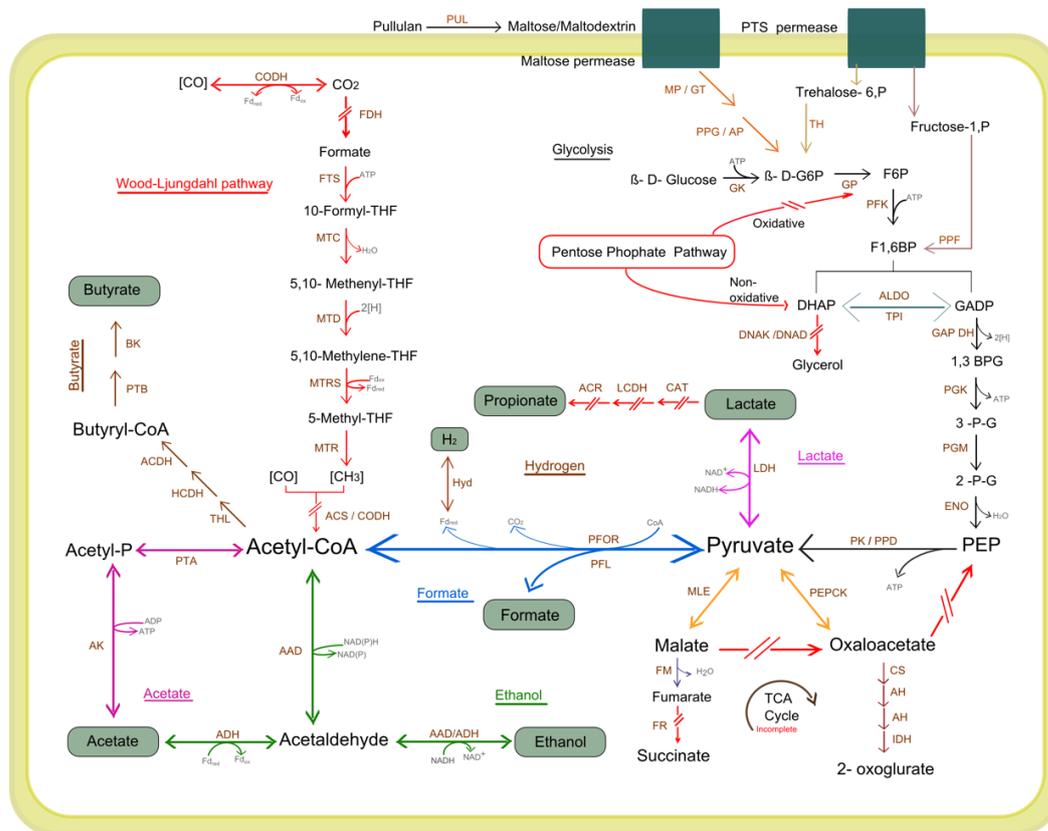
Um zu untersuchen, ob die Glycosid-Hydrolasen XghA, Cella2, Cella und CelK aus dem Isolate *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> aktiv sind, wurden die Enzyme überexprimiert und in Enzymassays getestet. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Daniela Köck, Dr. Vladimir Zverlov und Prof. Dr. W.H. Schwarz (Technische Universität München, TUM) durchgeführt. Es wurde keine cellulolytische Aktivität des Stammes M2/40<sup>T</sup> auf kristalliner Cellulose (Avicel) oder amorpher Cellulose (z.B. PASC) beobachtet. Das CelK Protein zeigte jedoch eine schwache Aktivität auf Beta-Glucan, Carboxymethylzellulose (CMC) und Phosphorsäure gequollener Cellulose (PASC) (**Abbildung 6**). Alle vier Enzyme vermittelten den Abbau der Polysaccharide Xylan und Xyloglucan. Dabei zeigten die Xylanasen XghA und Cella2 die höchste Aktivität. Die hydrolytische Aktivität von XghA in Bezug auf den Xyloglucan-Abbau war um den Faktor 50 bis 100 höher als die der anderen vier Enzyme. Die vorhergesagte Funktion des Enzyms XghA als eine putative Xyloglucanase konnte somit bestätigt werden. Das Genprodukt des Gens *cellA2* wurde als eine putative  $\beta$ -Mannanase annotiert. Auch hier konnte durch Expressionsexperimente bestätigt werden, dass die Annotation des *cellA2* Gens richtig ist, da das Cella2 Enzym eine hohe Aktivität auf Glucomannan zeigte.

Basierend auf der Tatsache, dass der Stamm *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> nicht in der Lage war, Mannose, Cellulose oder Xylan als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten, bleibt die Funktion des M2/40<sup>T</sup> Cellulosome-Genclusters weiterhin unklar. Weitere Arbeiten sind erforderlich, um die Funktion der möglichen cellulosomalen Komponenten aufzuklären.



**Abbildung 6:** Enzymatische Aktivität von *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Glykosylhydrolasen. Die Aktivität wurde auf verschiedenen Polymer-Substraten untersucht und auf Basis der Freisetzung von Glucose in mmol pro mg Zellprotein pro Minute (U / mg) bestimmt. Drei technische Replikate wurden pro Datenpunkt gemessen. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Abkürzungen: PASC, Phosphorsäure gequollene-Cellulose; CMC, Carboxymethylzellulose.

Die detaillierte Analyse der *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genomsequenz ermöglichte die Rekonstruktion des Metabolismus des Isolates. Die **Abbildung 7** fasst die entsprechenden Ergebnisse zusammen.



**Abbildung 7:** Überblick über die prominenten Stoffwechselwege von *Clostridium bournimense* M2/40<sup>T</sup>. Die M2/40<sup>T</sup> Enzyme sind durch braune Großbuchstaben repräsentiert. Pfeile stehen für enzymatische Reaktionen. Durchgestrichene Pfeile markieren Reaktionen sowie daran beteiligte Enzyme, für die kein passendes Gen im M2/40<sup>T</sup> Genom gefunden wurde. Die Metabolite in den grünen Boxen stellen die Fermentationsendprodukte dar. Verwendete Abkürzungen: ATP, Adenosintri-phosphat; ADP, Adenosindiphosphat; CO<sub>2</sub>, Kohlenstoffdioxid; FD<sub>red</sub>, Ferredoxin (reduziert); NAD, Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert); NADH, Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert); NADP, Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat (oxidiert); NADPH, Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat (reduziert); TCA, Tricarbonsäure-Zyklus. **Acetyl-CoA (Wood-Ljungdahl) pathway:** CODH, CO-Dehydrogenase; FDH, Formatdehydrogenase; FTS, Formyl-THF-Synthase; MTC, Methenyl-THF-Cyclohydrolase; MTD, Methylene-THF-Dehydrogenase; MTRS, Methylene-THF-Reduktase; MTR, Methyltransferase; ACS/CODH, Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase. **Glycolysis:** GK, Hexokinase; GP, Phosphoglucose-Isomerase; PFK, Phosphofruktokinase; ALDO, Fructose-Bisphosphat-Aldolase; TPI, Triosephosphat-Isomerase; DHAK, DHA-Kinase; DHAD, Glycerol-dehydratase; GAPDH, Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase; PGK, Phosphoglycerat-Kinase; PGM, Phosphoglycerat-Mutase; ENO, Enolase. **Central pyruvate metabolism:** PK, Pyruvat-kinase; PPD, Pyruvat-Phosphatdikinase; MLE, Malat-Enzym; PEPCK, PEP-Carboxykinase. PFOR, Pyruvate: Ferredoxin-Oxidoreduktase; PFL, Pyruvat-Format-lyase. **Incomplete TCA cycle:** CS, Citratsynthase, Citratlyase; AH, Aconitat-Hydratase; IDH, Isocitrat-dehydrogenase; FM, Fumarase; FR, Fumaratreduktase. **Hydrogen production:** [FeFe]-Hydrogenase. **Lactate fermentation pathway:** LDH, Lactatdehydrogenase. **Propionate fermentation pathway:** CAT, CoA-Transferase, LCDH, Lactoyl-CoA-Dehydrogenase; ACR, Acrylyl-CoA-Reduktase. **Ethanol fermentation pathway:** AAD, Alkohol/Aldehyd-dehydrogenase; ADH, Alkohol-dehydrogenase. **Acetate fermentation pathway:** PTA, Phosphotransacetylase; AK, Acetat-Kinase. **Butyrate fermentation pathway:** THL, Thiolase; HCDH, 3-hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase; BK, Butyrat-Kinase; ACDH, Acyl-CoA-Dehydrogenase; PTB, Phosphotransbutyrylase. **Maltose and PTS permease:** Zucker-Phosphotransferase System. **Trehalose fermentation pathway:** TH, Trehalose-6-Phosphat. **Fructose fermentation pathway:** PPF, 1-Phosphofruktokinase. **Starch fermentation pathway:** PUL, Pullulanase; MP, Maltodextrinphosphorylase; GT, 4- $\alpha$ -Glucanotransferase; PPG, Phosphogluco-mutase; AP, Aldose 1-Epimerase.

Die Gene des Tricarbonsäurezykluses (TCA), der Glykolyse (Embden-Meyerhof-Weg) sowie der nicht-oxidative Zweig des Pentosephosphat (PP) Weges wurden im *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genom identifiziert. Die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat kann durch Pyruvatkinase (PPK) oder Pyruvat-Phosphatdikinase (PPDK) bewerkstelligt werden. Entsprechende Gene sind im M2/40<sup>T</sup> Genom kodiert. Anschließend kann Pyruvat in Acetyl-CoA, Ethanol und organische Säuren, wie Lactat, Formiat, Butyrat und Acetat überführt werden. Alle hierfür notwendigen Gene sind im M2/40<sup>T</sup> Genom vorhergesagt worden.

Kultivierungsansätze mit *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> auf Glucose (HAHNKE *et al.* 2014a) haben gezeigt, dass der Stamm in der Lage war, Wasserstoff (H<sub>2</sub>), Ethanol sowie die organischen Säuren Formiat, Propionat und Laktat zu produzieren. Die Produktion von Acetat und Butyrat konnte experimentell nicht nachgewiesen werden, obwohl alle hierfür notwendigen Gene im Genom identifiziert wurden. Andererseits konnte die Propionsäure-Synthese in kultivierungsbasierten Ansätzen gezeigt werden, obwohl der Propionsäurestoffwechselweg in *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> nicht vollständig kodiert ist. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass im *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> Genom ein alternativer Propionsäuresyntheseweg kodiert ist.

Der Wood-Ljungdahl (WL) Stoffwechsel spielt eine wichtige Rolle in der bakteriellen Acetogenese, wodurch Kohlenstoffmonoxid (CO) und/oder Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) fixiert werden und anschließend Acetyl-CoA gebildet wird. Acetyl-CoA kann in Folgereaktionen zu Butyrat, Butanol, Ethanol und Acetat (TRACY *et al.* 2012, RAGSDALE 2008, BROWN *et al.* 2014) umgewandelt werden. Mit Ausnahme der Formiatdehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase, die in den ersten beiden Schritten des WL-Stoffwechselweges eine Rolle spielen, sind alle anderen Enzyme dieses Weges in *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> gefunden worden. Somit bleibt unklar, welche Rolle der unvollständige WL-Stoffwechselweg in *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> spielt. Weitere Analysen sind an dieser Stelle notwendig.

Basierend auf den oben dargestellten Ergebnissen in Zusammenhang mit phänotypischen Eigenschaften von *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup>, beschrieben durch HAHNKE *et al.* (2014a), wurde der Stamm als ein Kohlenhydrat-fermentierendes, acidogenes Bakterium klassifiziert (TOMAZETTO *et al.* 2015).

### 3.1.8 Sequenzierung und Analyse von *Defluviitoga tunisiensis* L3 aus einer thermophilen Biogas-Produktionsanlage

Die taxonomische Profilierung der thermophilen BGA Viersen (Kapitel 3.2.1) Ende des Jahres 2013 hat gezeigt, dass Vertreter der Familie *Thermotogaceae* eine abundante Gruppe der Domäne *Bacteria* in dieser BGA bilden. Der Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 repräsentiert ein bakterielles Isolat, das aus dieser Biogasanlage durch den Kooperationspartner JGU (Prof. Dr. Helmut König und Katharina Cibis, Johannes-

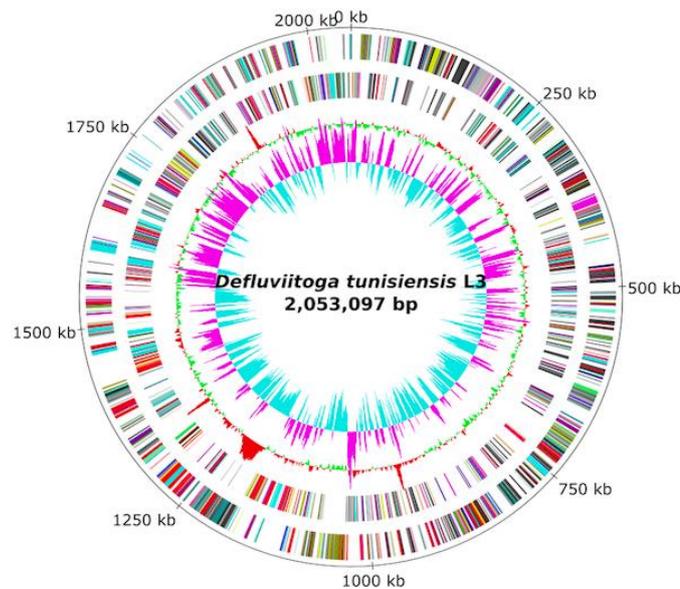
Gutenberg-Universität Mainz) gewonnen wurde. Aufgrund der unzureichenden Information über die Rolle der *Thermotogaceae* im Biogasprozess, ist dieses Isolat zur Genomsequenzierung ausgewählt worden. Die erstellte Genomsequenz sollte das metabolische Potential dieses Stammes aufzeigen, sowie neue Erkenntnisse über die Rolle des Isolates im Biogasprozess liefern.

Die Erstellung des *D. tunisiensis* L3 Genoms ist kürzlich von unserer Gruppe veröffentlicht worden (MAUS *et al.* 2015). Das Genom wurde auf dem Illumina MiSeq System nach dem *Mate-Pair* Verfahren sequenziert. Zur Assemblierung der Sequenzdaten wurde der GS *de novo* Assembler (Version 2.8) angewandt. Eine Zusammenfassung über die Sequenzier- und Assemblierungsstatistik ist in der **Tabelle 19** zu finden.

**Tabelle 19:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *D. tunisiensis* L3 Genoms.

Feature	<i>D. tunisiensis</i> L3
Number of reads	4,812,240
Number of sequenced bases	1,039,158,288 bp
Number of assembled reads	4,743,541 (98.57%)
Number of assembled bases	1,027,604,239 bp (98.89%)
<i>Paired-end</i> distance	4,298 – 12,895 bp
Average distance	8,596.7 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	1
Number of <i>Scaffold</i> -bases	2,059,338 bp
Largest <i>Scaffold</i>	2,054,760 bp
Number of contigs	150
Number of bases within contigs	2,035,741bp
Largest contig	210,880 bp

Fertigstellung des *D. tunisiensis* L3 Genoms ergab eine Genomgröße von 2.053.097 bp sowie einen GC-Gehalt von 31,38%. Eine nachfolgende Genvorhersage unter Verwendung der GenDB Annotationsplattform 2.0 für prokaryontische Genome (MEYER *et al.* 2003) ermöglichte die Identifizierung von 1.815 Genen, 47 tRNA Genen sowie drei *rrn* Operons (**Tabelle 20**). Die **Abbildung 8** zeigt den Genomplot für den Stamm *D. tunisiensis* L3.



**Abbildung 8:** Eigenschaften des *D. tunisiensis* L3 Genoms. Der äußere Kreis zeigt die Koordinaten des Genoms in Kilo-Basenpaaren (kb). Die nächsten beiden Kreise repräsentieren die kodierten Gene, die im Uhrzeigersinn und entgegen des Uhrzeigersinns transkribiert werden. Die Farbgebung entspricht der COG Klassifikation (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) der Gene. Kreis 4: GC-Gehalt, Kreis 5: GC-Skew.

**Tabelle 20:** Eigenschaften des *Defluviitoga tunisiensis* L3 Genoms.

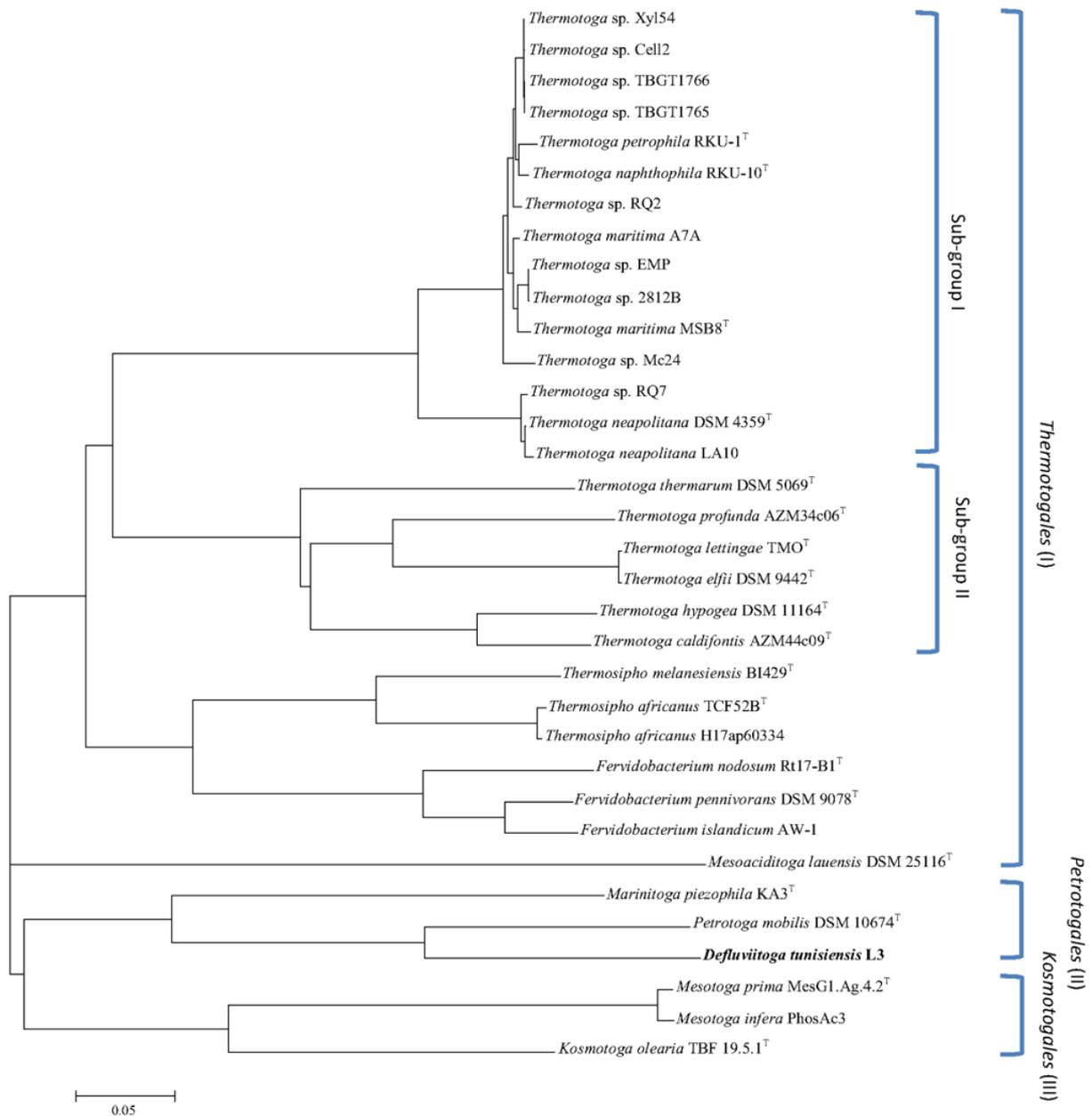
Feature	Chromosome
Genome size (bp)	2,053.097
GC content (%)	31.38
Total number of genes	1,881
<i>rrn</i> operons	3
tRNAs	47
Protein coding genes (cds)	1,815
Genes with a predicted function	1,270

Seit der Sequenzierung und Publikation des ersten *Thermotogae* Genoms (*Thermotoga maritima* MSB8<sup>T</sup>) sind 33 weitere Genome von Vertretern dieses Phylums inklusive *D. tunisiensis* L3 vollständig sequenziert worden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). Zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse von 33 sequenzierten *Thermotogae* Organismen und *D. tunisiensis* L3 wurde das Programm EDGAR angewandt. Ein phylogenetischer Baum basierend auf 250 *Core*-Genen konnte berechnet werden (**Abbildung 9**). Der präsentierte phylogenetische Baum ist in drei Cluster gegliedert (I, II und III). Diese repräsentieren die Ordnungen *Thermotogales* (I), *Petrotogales* (II) and *Kosmotogales* (III). Innerhalb dieser drei Ordnungen sind fünf Familien vorhanden: *Thermotogaceae*, *Fervidobacteriaceae*, *Petrotogaceae*, *Kosmotogaceae* und *Mesoaciditoga lauensis* DSM 25116<sup>T</sup> mit keiner weiteren taxonomischen Zuweisung. Der thermophile Stamm *Petrotoga mobilis* DSM 10674<sup>T</sup> (LIEN *et al.* 1998), der ursprünglich aus einer

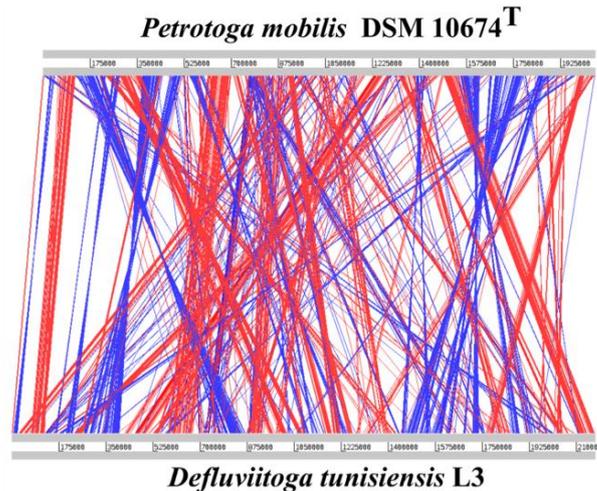
Nordsee Öl-Produktionsstätte stammt, repräsentiert den nächsten Verwandten zu *D. tunisiensis* L3. Nur der Stamm L3 wurde bisher aus einer Biogas-Produktionsanlage isoliert, wohingegen alle anderen vollständig sequenzierten *Thermotogae* Bakterien aus unterschiedlichen Habitaten wie z.B. einem hydrothermalen Tiefseesediment, Hochtemperatur-Ölreservoir oder einem tunesischen Fermenter, der mit Phosphorgips gefüttert wurde, stammen.

Das thermophile Bakterium *P. mobilis* DSM 10674<sup>T</sup>, das sehr nah mit dem Isolat *D. tunisiensis* L3 verwandt ist, wurde im Jahr 2007 sequenziert. Das 10674<sup>T</sup> Genom ist 2.169.548 bp groß und hat einen GC-Gehalt von 34.1% (accession number: CP000879.1). Die Analyse der Genom-Sequenzen der Stämme *D. tunisiensis* L3 und *P. mobilis* DSM 10674<sup>T</sup> mit dem Programm *Artemis Comparison Tool* (ACT) (CARVER *et al.* 2008) zeigte eine mosaikartige Genomorganisation. Viele genomische Reorganisationen, Deletionen und Insertionen von neuen DNA-Sequenzen konnten in den untersuchten Stämmen identifiziert werden (**Abbildung 10**). Auch bei anderen *Thermotogae* Spezies wurden zuvor zahlreiche genomische Reorganisationen beobachtet. Diese sah man im Zusammenhang mit Anpassungen an das jeweilige Habitat (MONGODIN *et al.* 2005). Basierend auf diesem Literaturbefund wird angenommen, dass auch die Genomorganisation des Isolates L3 die Anpassung an einen spezifischen Lebensraum widerspiegelt.

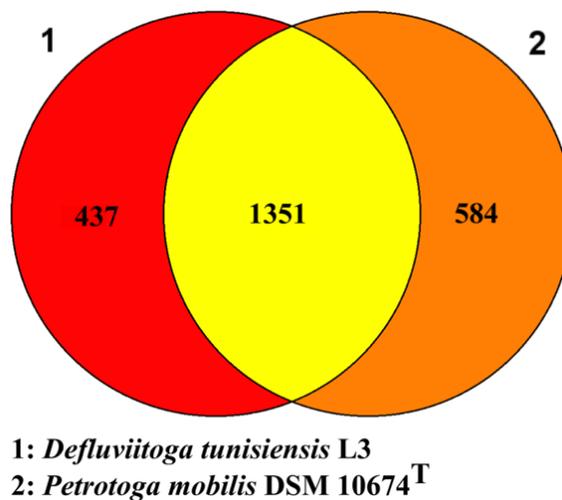
Die Identifizierung von *Core*- sowie Stamm-spezifischen Genen in den Isolaten *D. tunisiensis* L3 and *P. mobilis* DSM 10674<sup>T</sup> mit dem Programm EDGAR hat gezeigt, dass beide Organismen 1,351 homologe Gene besitzen (69% des Genoms von DSM 10674<sup>T</sup> und 74% des Genoms von L3) (**Abbildung 11**). Darunter sind 325 Gene, die hypothetische Proteine kodieren, aber auch Gene, die den vollständigen Glycolyse Stoffwechselweg repräsentieren. Des Weiteren gehören Gene, die in die Aufnahme und Fermentation von verschiedenen Zuckern involviert sind, zum *Core*-Genom der Spezies. Das Isolat *D. tunisiensis* L3 kodiert 437 stammspezifische Gene, die keine Homologie zu *P. mobilis* DSM 10674<sup>T</sup> Genen aufweisen. Ein großer Teil dieser Gene (238) kodiert für hypothetische Proteine und Enzyme, die eine Rolle für den Peptidabbau und Zuckers-transport spielen.



**Abbildung 9:** Taxonomische Klassifikation von *Defluviitoga tunisiensis* L3. Der phylogenetische Baum basiert auf 250 Core-Genen von vollständig sequenzierten *Thermotogae* Isolaten. Die drei Hauptgruppen links repräsentieren die Ordnungen *Thermotogales*, *Petrotogales* und *Kosmotogales*. Der Genus *Thermotoga* wurde zusätzlich in zwei Sub-Gruppen, *Thermotoga sub-group I* und *Thermotoga sub-group II*, unterteilt.



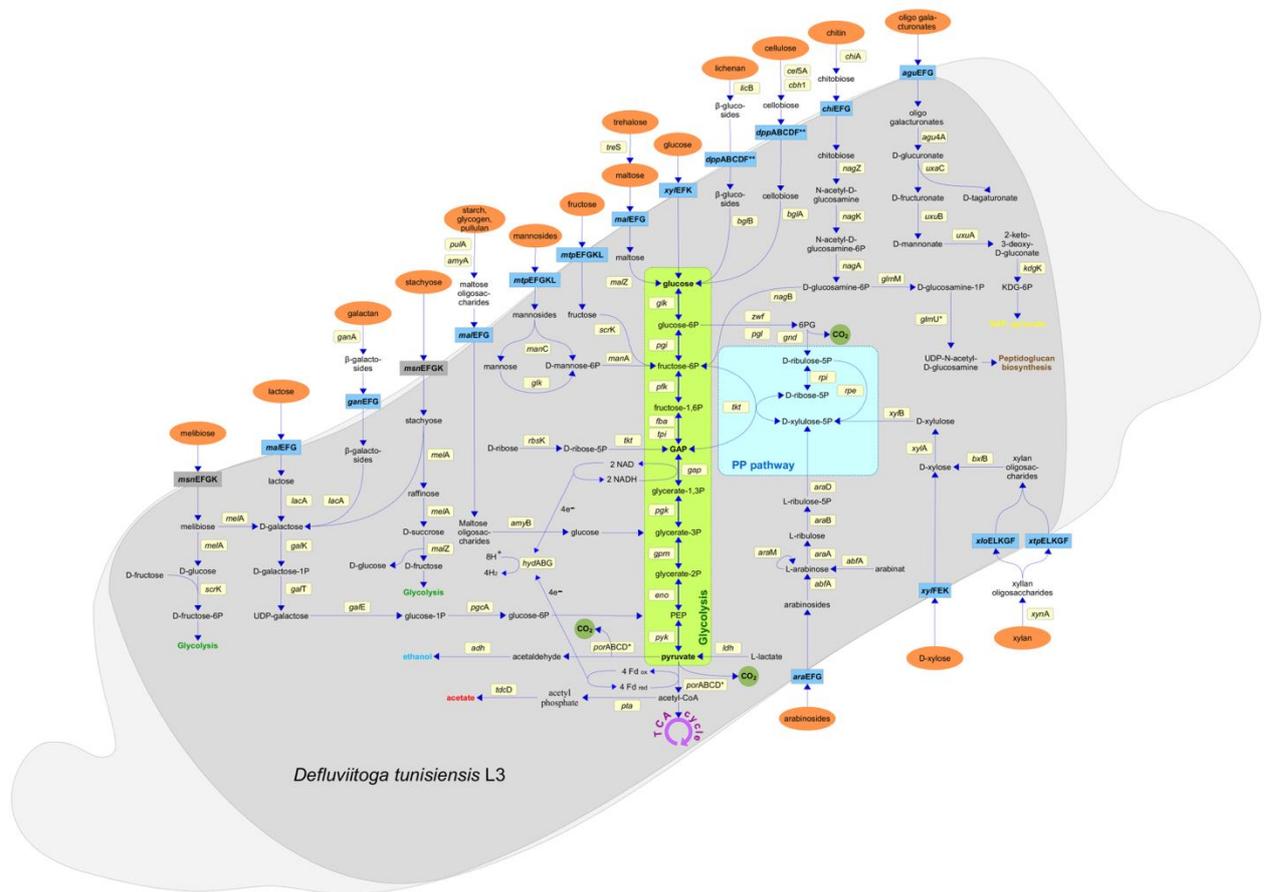
**Abbildung 10:** Genomarchitektur von *Defluviitoga tunisiensis* L3 und *Petrotoga mobilis* DSM 10674<sup>T</sup>. Das Programm ACT wurde angewandt, um die vergleichende Analyse der beiden Genome durchzuführen. Rote Linien zeigen ähnliche Sequenzen zwischen den Stämmen L3 und DSM 10674<sup>T</sup>, wohingegen blaue Linien invers komplementäre Regionen anzeigen.



**Abbildung 11:** Die Anzahl von orthologen und Stamm-spezifischen Genen von *Defluviitoga tunisiensis* L3 und *Petrotoga mobilis* DSM 10674<sup>T</sup> dargestellt in einem Venn-Diagramm.

Manuelle Annotation des *D. tunisiensis* L3 Genoms hat gezeigt, dass dieses Bakterium 115 Gene kodiert, die mit der Verwertung von Mono- sowie Polysacchariden wie z.B. Arabinose, Galactose, Maltose, Mannose, Fructose, Raffinose, Ribose, Cellulose, Cellobiose, Chitin, Stahyose, Lactose, Xylose, Xylan und Lactose in Verbindung gebracht werden können (**Abbildung 12**). Acetat, Ethanol, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> sind als Abbauprodukte dieses fermentativen Stoffwechsels vorhergesagt worden. Alle Gene, die für die Entstehung der genannten Endprodukte notwendig sind, konnten im L3 Genom identifiziert werden. Dieser Befund lässt vermuten, dass dem Isolat *D. tunisiensis* L3 die Rolle eines hydrolytischen Bakteriums im Biogasprozess zukommt (MAUS *et al.* 2016). Es ist sehr wahrscheinlich, dass *D. tunisiensis* L3 eine wichtige

Rolle beim Abbau von Pflanzenmaterial spielt. Die beim Abbau von Pflanzenmaterial erzeugten Endprodukte Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> dienen den methanogenen *Archaea* als Substrate für die Methanogenese.



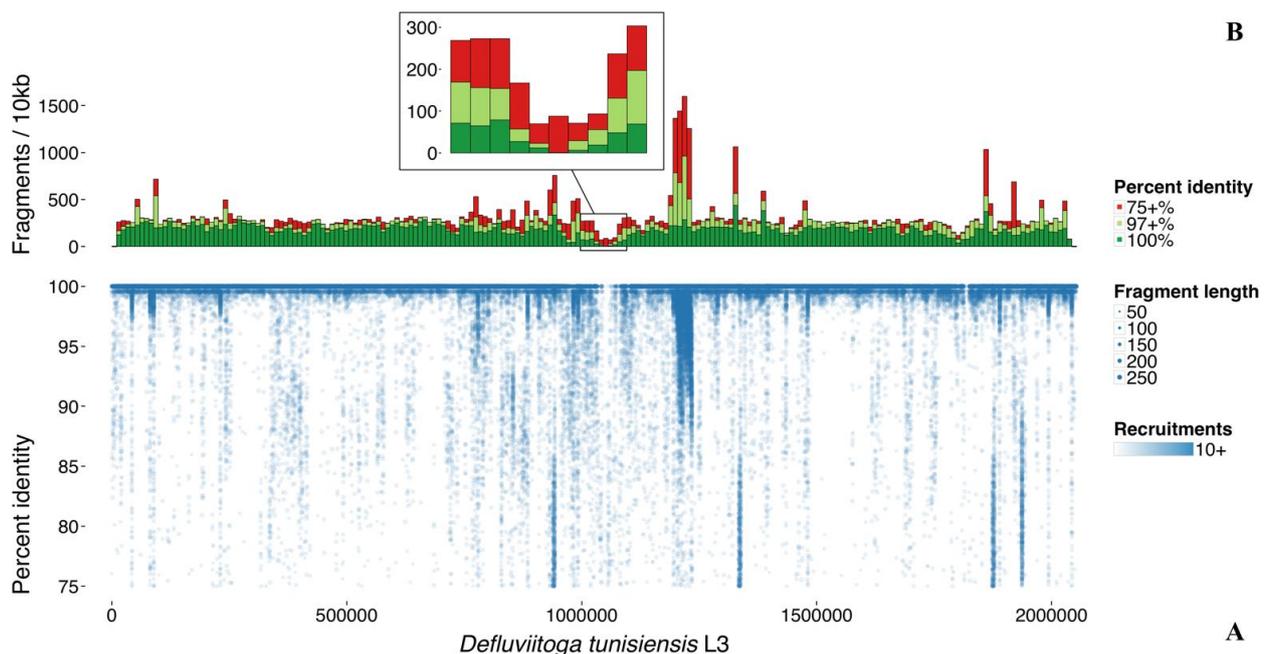
**Abbildung 12:** Überblick über die prominenten metabolischen Eigenschaften von *D. tunisiensis* L3, die aus der genomischen Sequenz abgeleitet wurden. Farbcode: Orange, Mono- bzw. Polysaccharide; blau, Zuckertransporter; gelb, Gene, die für abbauende Enzyme kodieren; grau, das entsprechende Gen konnte bisher nicht im Genom gefunden werden. Die zwei wichtigsten Stoffwechselwege, die Glykolyse und der Pentosephosphatweg sind farblich gekennzeichnet und so hervorgehoben.

Im Folgenden sollte die Bedeutung des Stammes *D. tunisiensis* L3 in der mikrobiellen Gemeinschaft der Biogas-Anlage Viersen bestimmt werden. Für diese Anlage liegen metagenomische Sequenzdaten vor (Metagenomdaten stehen unter den IDs Gb0056840 and Gb0056841 in der GOLD Datenbank zur Verfügung). Es sollte ermittelt werden, welcher Anteil der metagenomischen Sequenzen das Genom des Stammes *D. tunisiensis* L3 repräsentiert. Hierzu wurden die metagenomischen Sequenzen auf das Genom des Isolates L3 gemappt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in **Abbildung 13** dargestellt. Insgesamt konnten 251.729 von 4 Millionen Sequenzen (6.29%) mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 75% auf das L3 Genom gemappt werden. Etwa

4.8% der metagenomischen Sequenzen zeigen eine Sequenzähnlichkeit von 97% bis 100% zu der Genomsequenz von *D. tunisiensis* L3. Ungefähr 3% der metagenomischen Sequenzen passen perfekt auf das L3 Genom. Dieser Befund belegt, dass die Spezies *D. tunisiensis* abundant in der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA Viersen vorhanden ist.

Eine konservierte Region an der Position 1.202.500 im L3 Genom wurde besonders betrachtet. Diese Region ist 34 kb lang und kodiert für einen Prophagen. Dieser Prophagen scheint in anderen *D. tunisiensis* L3 Stämmen der Anlage ebenfalls vertreten zu sein, denn viele metagenomische Sequenzen passen zu dieser Prophagenregion mit einer Ähnlichkeit von 87% bis 100%.

Die Position von 1.036.000 bp bis 1.084.000 bp im *D. tunisiensis* L3 Genom ist nicht mit metagenomischen Sequenzen abgedeckt. Diese Lücke ist 48 kb groß und enthält 43 Gene, die für verschiedene Glycosyltransferasen, Transposasen, hypothetische Proteine und Enzyme des Aminozuckermetabolismus kodieren. Genau diese Gene unterscheiden das Isolat L3 von allen anderen *Thermotogae* Stämmen in der thermophilen Anlage Viersen.



**Abbildung 13:** A: *Fragment recruitment* von metagenomischen Sequenzen der thermophilen Gemeinschaft der BGA Viersen auf die *Defluviitoga tunisiensis* L3 Genomsequenz. Die X-Achse zeigt die Genomsequenz des Stammes L3, wohingegen die Y-Achse die Sequenzähnlichkeit der gemappten Metagenomsequenzen repräsentiert. B: Balken repräsentieren die *Coverage* von gemappten Metagenomsequenzen auf die L3 Genomsequenz. Die vergrößerte Teilregion des *D. tunisiensis* Genoms ist im Mittel schlechter abgedeckt als das übrige Genom.

Aus der Genomsequenz des Stammes *D. tunisiensis* L3 konnte letztlich abgeleitet werden, dass das Bakterium eine Rolle bei der Hydrolyse des Substrats spielt. Es ist sehr

vielseitig in Bezug auf die Verwertung unterschiedlichster Zuckerquellen, die schließlich zu Metaboliten abgebaut werden, die in die Methanogenese einfließen.

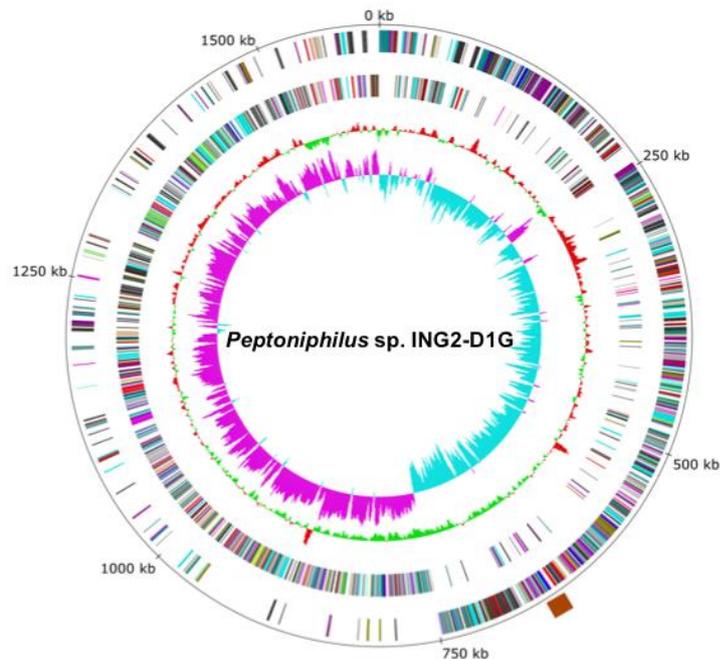
### 3.1.9 Sequenzierung von *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G (*Firmicutes*) aus einem Biogas-Laborfermenter

Taxonomische Profilierungen der Biogas-produzierenden Gemeinschaften zeigten, dass Mitglieder des Phylums *Firmicutes* eine abundante Gruppe im Biogas-Prozess sind (STOLZE *et al.* 2015, SCHLÜTER *et al.* 2008). Mikroorganismen dieses Phylums sind weit in anaeroben Habitaten verbreitet (Weiss *et al.* 2008) und bauen ein breites Spektrum an komplexen organischen Makromolekülen (Proteine und Kohlenhydrate) ab. Ein neuer Vertreter der *Firmicutes*, nämlich der Stamm *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Klocke und Dr. Sarah Hahnke (ATB, AP1) aus einem mesophilen Rührkesselreaktor, der Maissilage in Co-Fermentation mit Schweine- und Rindergülle fermentiert, isoliert. *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G ist die erste Spezies aus der Gattung *Peptoniphilus* (Phylum *Firmicutes*, Ordnung *Tissierella*), die aus einem Biogasreaktor isoliert wurde. Bisher kennt man *Peptoniphilus* Isolate als eine bakterielle Gruppe des menschlichen Mikrobioms, die häufig in Verbindung mit Infektionen wie chronische Rhinosinusitis, Wundinfektionen und postoperative Infektionen gebracht werden (ULGER-TOPRAK *et al.* 2012, CHO *et al.* 2015). Aufgrund der Tatsache, dass bisher noch wenig über *Peptoniphilus* Vertreter aus Biogasfermentern bekannt ist, wurde der Stamm ING2-D1G am CeBiTec sequenziert und im Detail analysiert (TOMAZETTO *et al.* 2014). Das Genom des Stammes ING2-D1G wurde auf dem Illumina MiSeq System sequenziert. Zur Anwendung kam das *Mate-Pair* Verfahren. Die Assemblierung der Sequenzdaten wurde mit dem GS *de novo* Assembler (Version 2.6.) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in **Tabelle 21** zusammengefasst.

**Tabelle 21:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G Genoms.

Feature	<i>Peptoniphilus</i> sp. ING2-D1G
Number of reads	2,999,211
Number of sequenced bases	678,196,305 bp
Number of assembled reads	19977082 (99,74%)
Number of assembled bases	676,131,848 bp (99,70%)
<i>Paired-end</i> distance	4,363 – 13.091 bp
Average distance	8,727.8 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	2
Number of <i>Scaffold</i> -bases	1,591,398 bp
Largest <i>Scaffold</i>	795,699 bp
Number of contigs	19
Number of bases within contigs	1,578,915 bp
Largest contig	288,372 bp

Nach der Assemblierung der Sequenzdaten und dem Schließen der Lücken in der Genomsequenz ergab sich für das Isolat ING2-D1G eine Chromosom-Größe von 1.601.846 Basen und ein durchschnittlicher GC-Gehalt von 34,85%. Das Chromosom des Stammes ist in einem zirkulären Plot in **Abbildung 14** graphisch veranschaulicht. Die Annotation des Genoms wurde mit Hilfe des Programms GenDB durchgeführt und ergab 1.541 kodierende Sequenzen, 53 tRNA Gene und vier *rrn* Operons (siehe auch **Tabelle 22**).



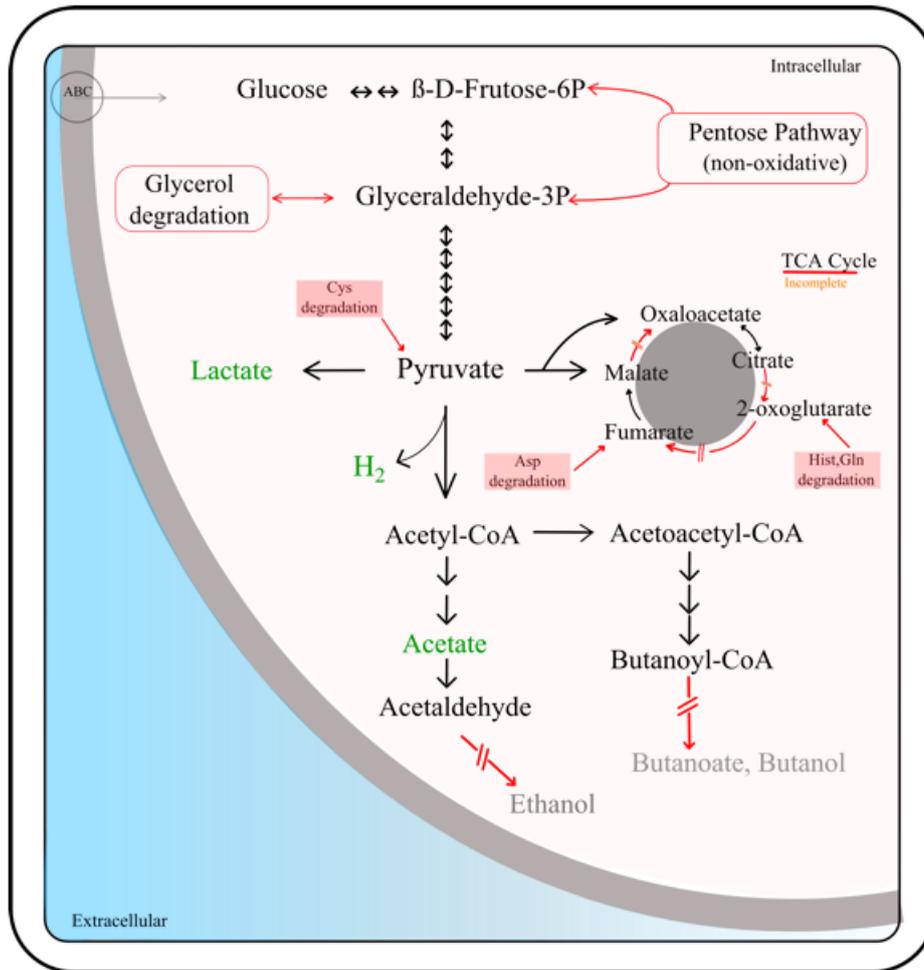
**Abbildung 14:** Eigenschaften des *Peptoniphilus sp. ING2-D1G* Genoms. Der äußere Kreis zeigt die Koordinaten des Genoms in Kilo-Basenpaaren (kb). Die nächsten beiden Kreise repräsentieren die kodierten Gene, die im Uhrzeigersinn und entgegen des Uhrzeigersinns transkribiert werden. Die Farbgebung entspricht der COG Klassifikation (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) der Gene. Kreis 4: GC-Gehalt, Kreis 5: GC-Skew. Das rote Viereck kennzeichnet die Prophagenregion auf dem ING2-D1G Chromosom.

Viele der kodierenden Gene (69,24% des Genoms) konnten einer COG-Kategorie (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) zugeordnet werden. Des Weiteren konnte mittels des Programms PAST (ZHOU *et al.* 2011) eine Prophagenregion im Genom des Stammes ING2-D1G identifiziert werden (**Abbildung 14**), die 28.261 bp lang ist und 1,76% des ING2-D1G Genoms ausmacht.

**Tabelle 22:** Eigenschaften des *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G Chromosoms.

Feature	Value	% of total
Genome size (bp)	1,601,846	100.00
DNA coding (bp)	1,460,250	91.16
DNA G + C (bp)	558,171	34.85
DNA scaffolds	1	100.00
Total genes	1,541	100.00
Protein coding genes	1,476	95.78
RNA genes	12	0.77
Pseudo genes	0	0
Genes in internal clusters	394	26.69
Genes with function prediction	1,068	69.30
Genes assigned to COGs	1,017	65.99
Genes with Pfam domains	1,139	77.16
Genes with signal peptides	64	4.33
Genes with transmembrane helices	381	25.81
CRISPR	0	0

Eine manuelle Annotation des *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G Genoms hat gezeigt, dass dieses Bakterium keine Gene besitzt, deren Produkte in den Abbau von komplexen Kohlenhydraten, wie Cellulose oder Hemicellulose involviert sind. Das Isolat ING2-D1G sollte jedoch in der Lage sein, Glucose, Pentosen und Glycerin zu fermentieren (**Abbildung 15**). Alle hierfür notwendigen enzymkodierenden Gene wurden gefunden. Des Weiteren gibt es im ING2-D1G Genom einige Gene, deren Proteine dem Butanoat und Butanol Stoffwechsel zugeordnet werden können. Dem Stamm ING2-D1G fehlen jedoch Gene für eine Phosphotransbutyrylase (EC 2.3.1.19) und Butyrat-Kinase (EC 2.7.2.7), die die Umwandlung von Butanoyl-CoA in Butanoat katalysieren. Auch die Gene für eine Butanal-Dehydrogenase (EC 1.2.1.57) und Butanol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.-) für die Synthese von Butanoyl-CoA/Butanol sind nicht vorhanden. Demzufolge ist *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G nicht in der Lage, Butanoat und Butanol zu produzieren. Im Genom von *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G ist keine Alkohol-Dehydrogenase kodiert. Damit ist Ethanol sehr wahrscheinlich kein Gärungsprodukt.



**Abbildung 15:** Rekonstruktion des Zentralstoffwechsels des Isolates *Peptoniphilus* sp. ING2-DG1 aus Genom-Sequenzdaten. Folgende Stoffwechselwege sind im Chromosom des Stammes ING2-DG1 kodiert: Glykolyse, Glycerin Abbau, Pentosephosphatweg, Pyruvatstoffwechselweg und der unvollständige Trikarbonsäure-Zyklus. Pfeile symbolisieren enzymatische Reaktionen. Durchgestrichene Pfeile markieren enzymatische Reaktionen, für die keine Gene im ING2-DG1 Genom gefunden wurden. Grüne Metabolite stellen Fermentationsendprodukte (Lactat, Acetat und Wasserstoff) dar. Graue Metabolite (Ethanol, Butanol und Butanoat) werden sehr wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit einschlägiger Gene nicht synthetisiert.

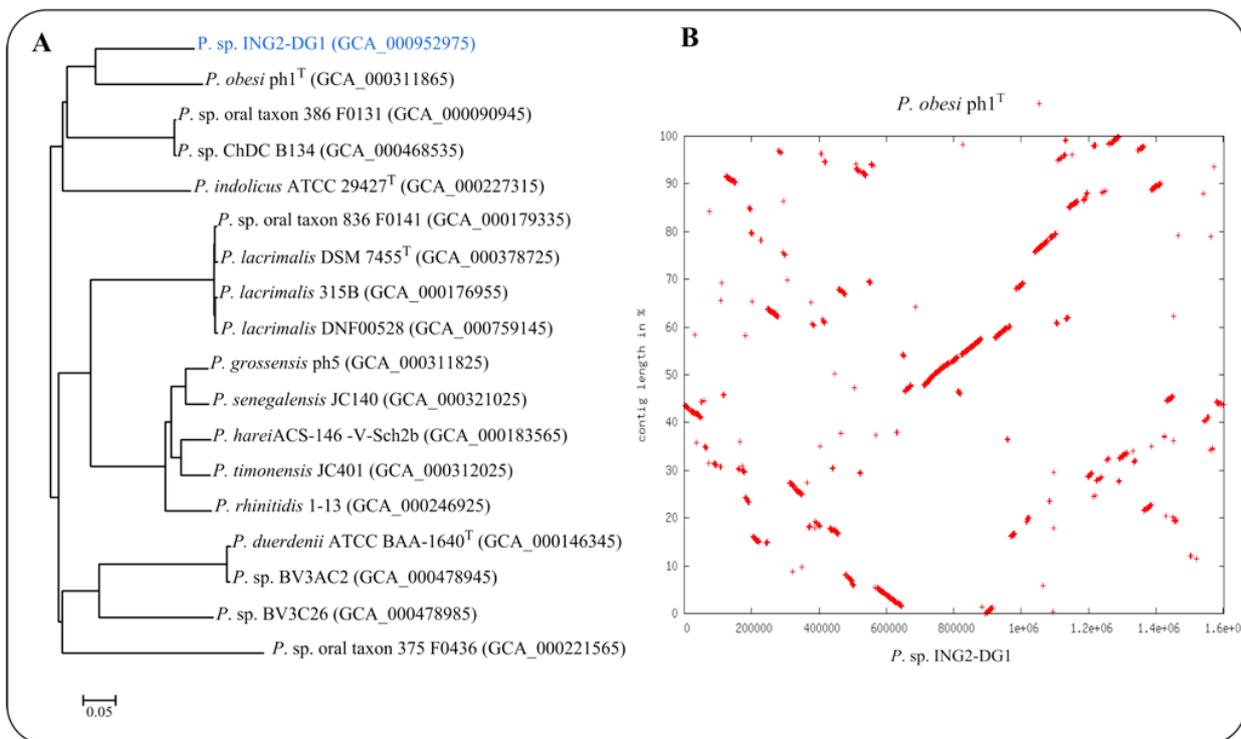
Derzeit existieren 18 vollständig sequenzierte Genome von Stämmen der Gattung *Peptoniphilus* (**Tabelle 23**) inklusive *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G. Diese Isolate wurden aus dem menschlichen Mikrobiom isoliert und sind mit Infektionen assoziiert. 13 von 18 Genomen haben eine Größe von 1,5 bis 2,0 Mb mit Ausnahme des Genoms des Stammes *P. lacrimalis* DNF00528 (GCA\_000759145.1), das eine Chromosomgröße von 3,5 Mb besitzt. Der GC-Gehalt dieser Genome liegt im Bereich von 30% bis 34%, mit Ausnahme von *Peptoniphilus* sp. F0436 mit einem GC-Gehalt von 41,4%. *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G ist die erste Spezies der Gattung *Peptoniphilus* für die ein geschlossenes Genom vorliegt. Darüber hinaus repräsentiert der Stamm ING2-D1G die erste Art dieser Gattung, die aus einem Biogasreaktor isoliert wurde.

Tabelle 23: Sequenzierte Stämme der Gattung *Peptoniphilus*.

<i>Peptoniphilus</i> species	Strain	Isolated	Size (Mb)	GC %	Scaffolds	Genes	Proteins	G.A.A <sup>a</sup>
<i>Peptoniphilus</i> sp.	ING2-D1G	Biogas sludge	160.185	34.8	1	1578	1489	GCA_000952975.1
<i>P. lacrimalis</i>	DSM 7455 <sup>T</sup>	Human eye discharge	18.492	30.2	21	1757	1675	GCA_000378725.1
<i>P. duerdenii</i>	ATCC BAA-1640	Urogenital tract, vaginal	212.484	34.5	16	1929	1860	GCA_000146345.1
<i>P. harei</i>	ACS-146-V-Sch2b	Human Microbiome Project	183.603	34.4	32	1727	1643	GCA_000183565.2
<i>P. indolicus</i>	ATCC 29427	Oral	223.786	32.7	98	2088	1873	GCA_000227315.1
<i>P. rhinitidis</i>	1-13	Chronic rhinosinusitis	188.526	29.9	56	1814	1726	GCA_000246925.2
<i>Peptoniphilus</i> sp.	BV3AC2	Human Microbiome Project	19.952	34.2	34	1820	1717	GCA_000478945.1
<i>Peptoniphilus</i> sp.	BV3C26	Human Microbiome Project	192.597	31.6	69	1896	1744	GCA_000478985.1
<i>P. timonensis</i>	JC401	Host stool sample	17.586	30.9	7	1720	1371	GCA_000312025.1
<i>P. obesi</i>	ph1 <sup>T</sup>	Host stool sample	1.774	30.4	5	1678	1607	GCA_000311865.1
<i>P. senegalensis</i>	JC140	Host stool sample	185.134	32.5	29	1720	1636	GCA_000321025.1
<i>P. grossensis</i>	ph5	Host stool sample	210.187	34.4	8	1978	1886	GCA_000311825.1
<i>Peptoniphilus</i> sp. oral taxon 386	F0131	Human Microbiome Project	156.939	31.10	11	1510	1404	GCA_000090945.1
<i>P. lacrimalis</i>	315-B	Human Microbiome Project	169.921	29.9	71	1579	1491	GCA_000176955.1
<i>P. lacrimalis</i>	DNF00528	Human Microbiome Project	350.325	34.7	126	3382	3241	GCA_000759145.1
<i>Peptoniphilus</i> sp. oral taxon 836	F0141	Human Microbiome Project	17.586	30.9	7	1720	1371	GCA_000179335.1
<i>Peptoniphilus</i> sp. oral taxon 375	F0436	Human Microbiome Project	195.055	41.4	1	2081	1851	GCA_000221565.2
<i>Peptoniphilus</i> sp. ChDC B134	ChDC B134	Periapical abcess lesion	149.976	31	5	1449	1361	GCA_000468535.1

<sup>a</sup> GenBank assembly accession number

Zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse von 17 sequenzierten *Peptoniphilus* Isolaten und *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G wurde das Programm EDGAR angewandt. Der berechnete phylogenetische Baum basiert auf 448 Core-Genen und ist in **Abbildung 16A** dargestellt. Der Stamm *Peptoniphilus obesi* ph1<sup>T</sup> repräsentiert den nächsten Verwandten zu *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G. Beide Stämme teilen 1.013 orthologe Gene (68,63% der Gene von ING2-D1G und 58,96% von ph1<sup>T</sup>). Darunter sind Gene identifiziert worden, die für die Synthese von H<sub>2</sub> und Acetat kodieren. Wie in *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G sind auch im *Peptoniphilus obesi* ph1<sup>T</sup> Genom die Fermentationswege für die Synthese von Ethanol, Butanol und Butyrat nur unvollständig kodiert.



**Abbildung 16:** Taxonomische Klassifikation von *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G (A) und ein Synteni-Plot der Stämme *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G und *Peptoniphilus obesi* ph1<sup>T</sup> (B). Der phylogenetische Baum wurde auf Basis von 488 Core-Genen von vollständig sequenzierten *Peptoniphilus* Isolaten konstruiert. Der Stamm *P. obesi* ph1<sup>T</sup> repräsentiert den nächsten Verwandten zu *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G.

Komparative Analyse der Stämme *Peptoniphilus* sp. ING2-D1G und *P. obesi* ph1<sup>T</sup> hat gezeigt, dass beide Isolate wenig Ähnlichkeit zueinander aufweisen (**Abbildung 16B**). In den Chromosomen der beiden Stämme sind viele Deletionen, Insertionen und Reorganisationen vertreten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Genome der Stämme Veränderungen im Zuge der Anpassung an die jeweiligen, bevorzugten Habitate erfahren haben.

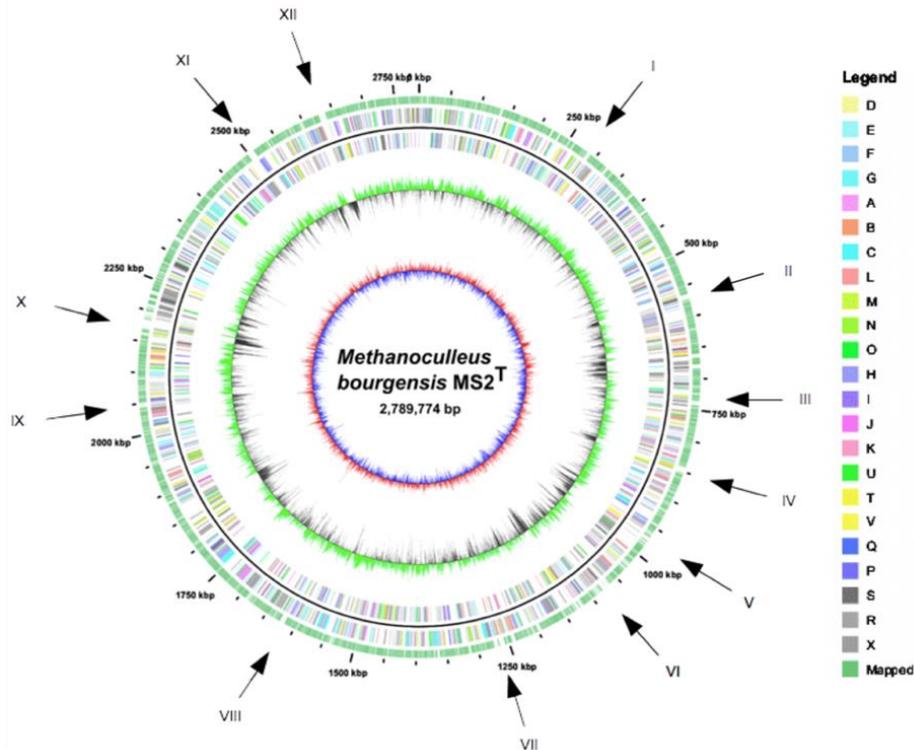
### 3.1.10 Sequenzierung und Analyse des *Methanoculleus bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genoms

Das Genom des hydrogenotrophen, methanogenen Archaeons *Methanoculleus bourgensis* MS2<sup>T</sup> wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Helmut König und Dr. Robbin Stantscheff (JGU, Mainz) am CeBiTec erstellt. Da *M. bourgensis* bereits in unterschiedlichen Biogas-produzierenden mikrobiellen Gemeinschaften als abundante Spezies identifiziert wurde, sollte die Genominformation dieses Stammes auch in das 'BIOGAS-CORE' Projekt einfließen und die Genomsequenz weitergehend interpretiert und analysiert werden.

Das Genom des methanogenen *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> wurde auf dem GS Junior System (Roche) mit Hilfe des *shotgun*- und *paired-end* Sequenzierverfahrens erstellt. Die Assemblierung der kombinierten Sequenzdaten mit dem GS *de novo* Assembler 2.6 (Roche) in Kombination mit einer PCR-basierten Strategie führte zur Erstellung eines zirkulären Chromosoms der Länge 2.789.773 bp und einem GC-Gehalt von 60,64% (**Abbildung 17**). Die Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in **Tabelle 10** zusammengefasst. Die Annotation des Genoms wurde mit dem Programm GenDB durchgeführt und ergab 2,619 kodierende Sequenzen mit einer durchschnittlichen Genlänge von 877 bp, sowie 45 tRNA Gene und ein *rrn* Operon. Die Erstellung des *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genoms wurde bereits veröffentlicht (MAUS *et al.* 2012, MAUS *et al.* 2014a). Die wichtigsten Ergebnisse der Sequenzierung des Stammes *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> sind in der **Tabelle 24** zusammengefasst.

**Tabelle 24:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genoms.

Feature	<i>M. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>
Number of reads	122,030
Number of sequenced bases	577,864,764 bp
Number of assembled reads	120,890 bp (99,07%)
Number of assembled bases	57,231,058 bp (99,04%)
<i>Paired-end</i> distance	1,435 - 4479 bp
Average distance	2870.6 bp
Number of <i>Scaffolds</i>	1
Number of <i>Scaffold</i> -bases	12,790,001 bp
Largest <i>Scaffold</i>	290,002 bp
Number of contigs	42
Number of bases within contigs	2,780,407 bp
Largest contig	290,002 bp



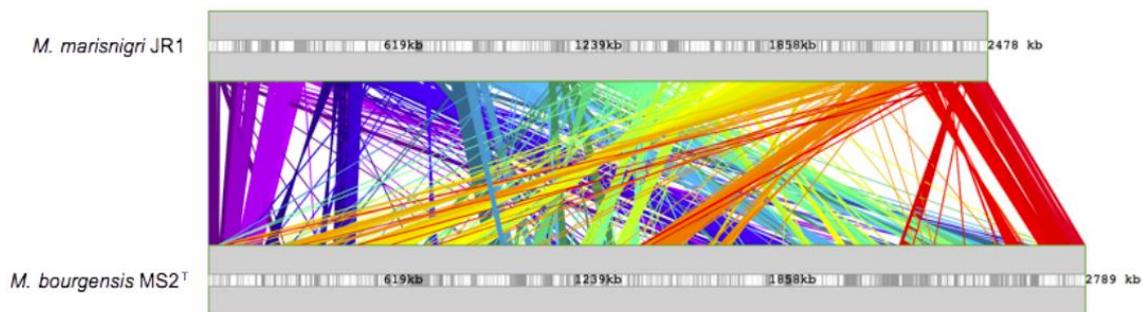
**Abbildung 17:** Eigenschaften des *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genoms. Der äußere Kreis zeigt die Nummerierung und die Position der Lücken, die durch die Metagenomsequenzen (Erklärung im Text) nicht abgedeckt wurden. Der nächste Kreis repräsentiert die Koordinaten des Genoms in Kilo-Basenpaaren (kb). Der dritte Kreis stellt die Metagenomsequenzen dar, die auf das MS2<sup>T</sup> Genom gemappt wurden. Die nächsten beiden Kreise repräsentieren die kodierten Gene, die im Uhrzeigersinn und entgegen des Uhrzeigersinns transkribiert werden. Die Farbgebung entspricht der COG-Klassifikation (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) der Gene. Kreis 4: GC-Gehalt, Kreis 5: GC-Skew.

**Tabelle 25:** Eigenschaften der *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> und *M. marisnigri* JR1 Chromosome.

Feature	Chromosome of <i>M. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	Chromosome of <i>M. marisnigri</i> JR1
Genome size (bp)	2,789,773	2,478,101
GC content (%)	60.64	62.1
No. of protein-coding sequences	2,586	2,560
No. of functional protein-coding sequences	1,632	1,629
No. of hypothetical protein-coding sequences	844	910
No. of orphan protein-coding sequences	110	21
<i>rrn</i> operons	1	1
No. of tRNAs	45	54

Die Genomsequenz des hydrogenotrophen Archaeons *Methanoculleus marisnigri* JR1 (ANDERSON *et al.* 2009) wurde 2009 veröffentlicht und ermöglichte komparative Analysen mit dem *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genom. Das *M. marisnigri* JR1 Chromosom besitzt eine Länge von 2.48 Mbp und hat einen GC-Gehalt von 62.1% (**Tabelle 25**). Zur

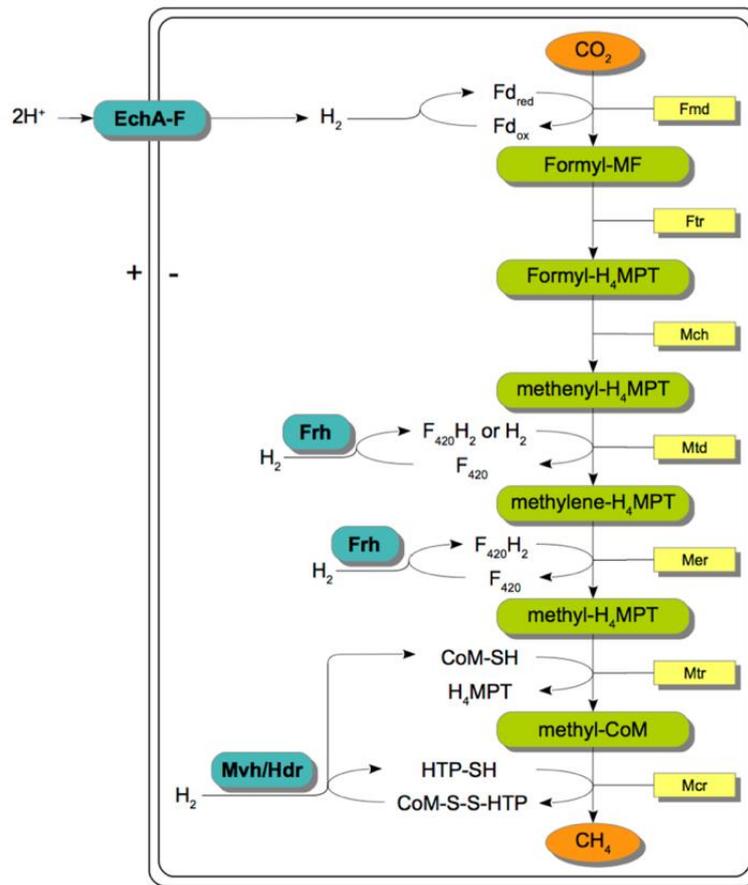
Analyse der Organisation der Genome der Stämme MS2<sup>T</sup> und JR1, wurde ein globales Sequenz-Alignment mit dem Programm M-GCAT durchgeführt. Es zeigte sich eine mosaikartige Struktur (**Abbildung 18**), was als Hinweis auf die Plastizität des Genoms gedeutet werden kann. Viele Reorganisationen, aber auch Deletionen und Insertionen wurden identifiziert. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Isolate des Genus *Methanosarcina* beschrieben (MAEDER *et al.* 2006). Es ist denkbar, dass sich die Struktur der Chromosomen der methanogenen *Archaea* schnell umorganisieren lässt, um Anpassungen an spezifische Umweltbedingungen zu ermöglichen.



**Abbildung 18:** Vergleichende Analyse von *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> and *M. marisnigri* JR1 Genomarchitektur. Die horizontalen Linien (grau) representieren die jeweilige Genomsequenz. Die vertikalen Linien zeigen maximale Sequenzübereinstimmung, die während des Vergleichs gefunden wurde, die invertierten Linien/Rechtecke weisen auf Regionen mit Reorganisation hin. Farbgradient visualisiert die konservierten Regionen, die in beiden Chromosomen enthalten sind.

Das Programm EDGAR wurde anschließend verwendet, um die *Core*- und *unique* Gene der Stämme *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> and *M. marisnigri* JR1 zu bestimmen. Beide besitzen 1898 Gene, die eine starke Homologie zueinander haben und damit das *Core*-Genom repräsentieren. *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> besitzt 677 sogenannte *Singletons*, wohingegen *M. marisnigri* JR1 579 *unique* Gene aufweist. Innerhalb der *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> *Singletons* wurden viele Gene identifiziert, die für hypothetische Proteine kodieren. Des Weiteren, sind Gene gefunden worden, die für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem kodieren. Weitere MS2<sup>T</sup> *Singleton* Gene sind in die Synthese von Osmoprotektanten involviert. Unter den Genen, die für *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> spezifisch sind, werden diejenigen Determinanten vermutet, die die Anpassung des Isolates an sein Habitat vermitteln.

Die Rekonstruktion des Methanogenese-Stoffwechsels aus dem *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genom hat gezeigt, dass alle Gene, die für die Synthese von Methan über den hydrogenotrophen Weg nötig sind, identifiziert werden konnten (**Abbildung 19**). Des Weiteren sind Gene, die für Hydrogenasen kodieren, im Genom vorhanden. Hydrogenasen spielen sehr wahrscheinlich für die Reduktion von Cofaktoren im Zuge der Methanogenese eine wichtige Rolle.



**Abbildung 19:** Rekonstruktion des hydrogenotrophen Methanogenese-Stoffwechsels in *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> (modifiziert nach THAUER *et al.* 2008). Koenzyme (grün), Hydrogenasen (blau) ebenso wie Proteine, die am Methanogenese-Stoffwechsel beteiligt sind (gelb), sind farblich gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: MF, Methanofuran; H<sub>4</sub>MPT, 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin; CoM-SH, Coenzym M; HTP-SH, N7-Mercaptoheptanoyl-l-Threonin-Phosphat; CoM-S-S-HTP, Heterodisulfid von CoM-SH und HTP-SH; Ech, [NiFe]-Hydrogenase; Mvh, Methylviologen-reduzierende Hydrogenase; Frh, F<sub>420</sub>-reduzierende-Hydrogenase; Hdr, Heterodisulfid-Reduktase; Fwd, Formylmethanofuran-Dehydrogenase; Ftr, Formylmethanofuran-Tetrahydromethanopterin-N-Formyltransferase; Mch, N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase; Mtd, F<sub>420</sub>-Methyltetrahydromethanopterin-Dehydrogenase; Mer, N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-Methylenetetrahydromethanopterin-Reduktase; Mtr, N<sub>5</sub>-Methyltetrahydromethanopterin: Coenzym M Methyltransferase; Mcr, Methyl-coenzyme-M-Reduktase.

Anpassung an hohe Salzkonzentrationen in der Umgebung kann in Biogas-Anlagen sehr wichtig sein, da häufig Gülle als Substrat verwendet wird. Im Genom von *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> sind insgesamt 35 genetische Determinanten gefunden worden, die potentiell in die Akkumulation und den Transport von Osmoprotektanten, sogenannten kompatiblen *Soluten*, involviert sind. Darunter sind Gene, die für Glycin-Betain, N-acetyl-β-Lysin, Trehalose oder K<sup>+</sup> Transportsysteme kodieren, gefunden worden (**Tabelle 26**). Die Präsenz von Genen für Osmoprotektionssysteme in den Genomen der analysierten *Methanomicrobiaceae* Spezies weist deutliche Unterschiede auf. Für den Genus *Methanoculleus* wurden mehr Gene gefunden, die für die Synthese kompatibler *Solute* kodieren, als z.B. für *M. hungatei* JF-1 oder *M. tarda* NOBI-1.

**Tabelle 26:** Genetische *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Determinanten, die in Osmoprotektion involviert sind.

Putative gene products involved in osmoregulation	Genes found in <i>M. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	Genes found in <i>M. marisnigri</i> JR1	Genes found in <i>M. hungatei</i> JF-1	Genes found in <i>M. tarda</i> NOBI-1
<b>Accumulation of inorganic ions</b>				
Uptake system for K <sup>+</sup> ions (Kdp)	BN140_1994 to 1997	-	-	-
Uptake system for K <sup>+</sup> ions (Trk-like)	BN140_0330, BN140_1240, BN140_3035	Memar_1156, Memar_1936	-	MettaDRAFT_1426, MettaDRAFT_1783
Membrane bound K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ions antiporter	BN140_1402, BN140_1841	Memar_0764	-	MettaDRAFT_0755
Choline/Carnitine/Betaine transporter	BN140_0084	Memar_0160	-	-
Glycine betaine/proline transporter (Ota-like)	BN140_1922 to 1925	Memar_0991 to 0994	-	-
NA <sup>+</sup> /prolin symporter	BN140_2233, BN140_2293	Memar_1158, Memar_1255	-	-
Phosphate transport system (Pts)	BN140_1305 to 1308	Memar_2276 to 2279	Mhun_2981 to 2984	MettaDRAFT_1024 to 2027
<b>Sugar and polyhydric alcohols</b>				
Trehalose synthase (Tps)	BN140_0628	Memar_1255	-	-
Trehalose phosphatase (Tpp)	BN140_1446	Memar_2216	-	-
Trehalose phosphorylase (TreP)	BN140_0244, BN140_1261	Memar_1763, Memar_2023	-	-
I-P-synthase (DIP synthesis)	BN140_1905	Memar_0974	-	-
I-1-P-cytidyltransferase (DIP synthesis)	BN140_2402	Memar_2296	Mhun_2404	MettaDRAFT_0800
DIP-synthase (DIP synthesis)	BN140_1898	Memar_0967	Mhun_0903	MettaDRAFT_1282
<b>α-Amino acids and derivatives</b>				
Glutamate synthase	BN140_1564 to 1565	Memar_0332 to 0333,	Mhun_0781 to 0782	MettaDRAFT_1815 to 1816
Glutamine synthetase	BN140_1562, BN140_2412	Memar_0335, Memar_2135	Mhun_0779	MettaDRAFT_1818
Aspartate aminotransferase	BN140_1489	Memar_0056	Mhun_2475	MettaDRAFT_1004
Lysine 2,3 aminomutase ( <i>N</i> <sup>ε</sup> -acetyl-L-lysine synthesis)	BN140_0596	Memar_1790	-	-
Lysine 2,3 acetyltransferase ( <i>N</i> <sup>ε</sup> -acetyl-L-lysine synthesis)	BN140_0318, BN140_0409	Memar_1941	-	-

Um zu untersuchen, ob *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> eine abundante Rolle in der Biogasproduzierenden Gemeinschaft spielt, wurden Metagenomsequenzen einer mesophilen Biogasanlage (JAENICKE *et al.* 2011) auf das Genom des Stammes MS2<sup>T</sup> gemappt (**Abbildung 20**). Insgesamt konnten 6,71% aller Metagenomsequenzen auf das Genom

des Stammes MS2<sup>T</sup> mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 95% gemappt werden. Des Weiteren wurden diese Sequenzen mit dem Programm GS *de novo* Assembler (Version 2.8) zu 2.728 *Contigs* assembliert und ergaben zusammen eine Sequenzlänge von 3.14 Mb. Ein Abgleich der assemblierten *Contigs* mit dem MS2<sup>T</sup> Referenzgenom ergab, dass etwa 88% der *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> Genomsequenz abgedeckt sind. Das Ergebnis zeigt, dass der Stamm MS2<sup>T</sup> sehr nah mit den dominanten methanogenen *Archaea* der analysierten Biogas-Gemeinschaft verwandt ist. Die *Methanoculleus* Stämme der untersuchten Anlage teilen mit dem Referenzstamm 2.254 Gene (87%). Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass der Stamm MS2<sup>T</sup> fast vollständig die genetische Information der dominanten *Archaea* in der analysierten Biogas-Gemeinschaft repräsentiert.

### 3.1.11 Comparative Analysen für Isolate aus dem Genus *Methanobacterium* unter besonderer Berücksichtigung des Isolates *Methanobacterium formicicum* Mb9

Methanogene *Archaea* sind das letzte Glied in der Biogas-Prozesskette, da sie für die Methan-Produktion verantwortlich sind. Basierend auf den metabolischen Eigenschaften dieser Gruppe, werden acetoklastische und hydrogenotrophe Vertreter unterschieden. Letztere verwenden CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Substrate für die Methanogenese, während acetoklastische *Archaea* Methan aus Acetat herstellen.

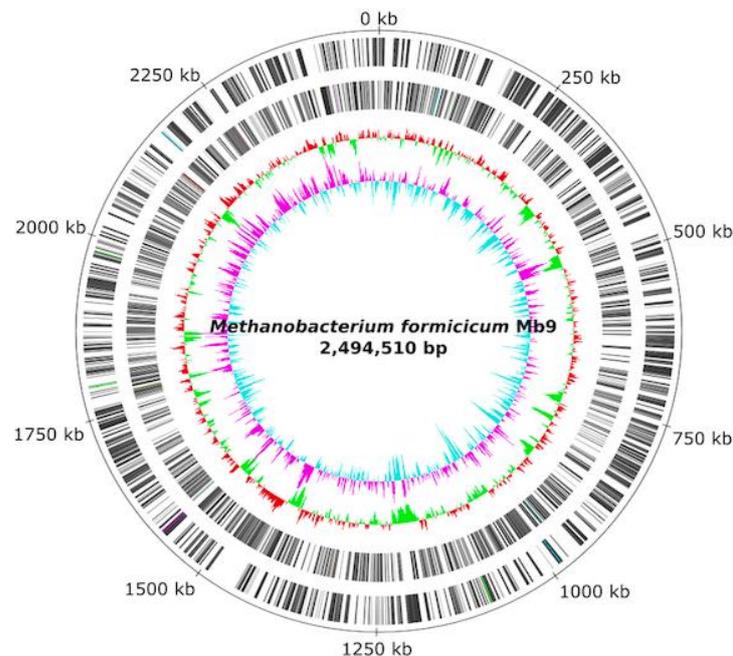
Es existieren Studien, die die Wettbewerbsfähigkeit hydrogenotropher *Archaea* der Gattung *Methanobacterium* mit einer Adaptation an hohe Salz- und/oder Ammoniumkonzentrationen in Biogas-Fermentern erklären (LEBUHN *et al.* 2014). Damit stellt sich die Frage, welche genomischen Eigenschaften die Gattung *Methanobacterium* im Vergleich zu anderen methanogenen *Archaea* auszeichnen. Die Identifizierung von genetischen Merkmalen, die potenziell dem Stress, verursacht durch hohe Salz- und/oder Ammoniumkonzentrationen eines solchen Habitats, entgegenwirken können, ist von großem Interesse.

Der Stamm *Methanobacterium formicicum* Mb9 repräsentiert ein methanogenes *Archaeon*, das aus einer mesophilen Biogasanlage von den Verbundpartnern der JGU (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, AP3) gewonnen wurde. Um mögliche genetische Determinanten, die für die Adaptation an spezifische Habitatbedingungen eine Rolle spielen können, zu identifizieren, wurde das Isolat *Methanobacterium formicicum* Mb9 für eine Genomsequenzierung ausgewählt. Die erzielten Ergebnisse der Sequenzierung und Assemblierung sind in der **Tabelle 27** zusammengefasst.

**Tabelle 27:** Statistik der Sequenzierung und Assemblierung des *Methanobacterium formicicum* Mb9 Genoms.

Feature	<i>M. formicicum</i> Mb9
Number of reads	2,835,051
Number of sequenced bases	378,234,041 bp
Number of assembled reads	2,797,084 (98.66%)
Number of assembled bases	372,207,544 bp (98.41%)
Paired-end distance	3,911 – 11,753 bp
Average distance	7,823.6 bp
Number of Scaffolds	4
Number of Scaffold-bases	2,486,354 bp
Largest Scaffold	2,472,201 bp
Number of contigs	41
Number of bases within contigs	2,455,730 bp
Largest contig	288,837 bp

Die Fertigstellung des *Methanobacterium formicicum* Mb9 Genoms resultierte in einem geschlossenen Chromosom der Länge 2.494.510 bp sowie einem GC-Gehalt von 41,14%. Eine nachfolgende Genvorhersage in der Annotationsplattform GenDB 2.0 ergab die Identifizierung von 2.416 Genen, 43 tRNA Genen sowie drei *rrn* Operons. Die **Abbildung 20** zeigt den Genomplot für das Isolat *M. formicicum* Mb9.

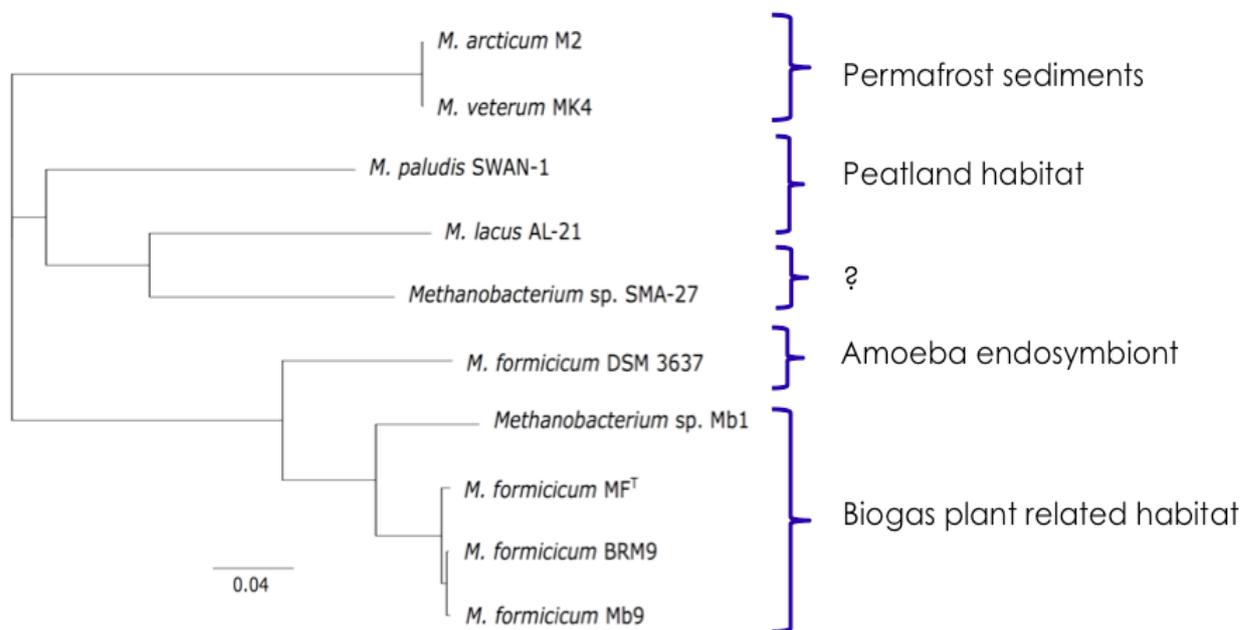


**Abbildung 20:** Zirkuläre Repräsentation des Chromosoms von *Methanobacterium formicicum* Mb9. Von außen nach innen zeigen die Ringe: (1) die DNA-Basenposition, (2 und 3) die kodierenden Gene (CDS) für beide Ableserichtungen; (4) den GC-Plot und (5) den GC-Skew.

Tabelle 28: Sequenzierte Stämme der Gattung *Methanobacterium*.

No.	Name	Strain	DSMZ no.	Type strain	Origin of strain	Accession number	Reference
1	<i>M. formicium</i>	Mb9	DSM 28100	No	Biogas plant	ERS549551	-
2	<i>M. formicium</i>	MF <sup>T</sup>	DSM 1535	Neotype	Sewage sludge digester	LN515531	Maus <i>et al.</i> , 2014
3	<i>M. formicium</i>	BRM9	-	No	Rumen of the grazing cattle	CP006933	Kelly <i>et al.</i> , 2014
4	<i>M. formicium</i>	DSM 3637	DSM 3637	No	Isolated from a giant amoeba <i>Pelomyxa palustris</i>	AMPO00000000	Gutierrez, 2012
5	<i>Methanobacterium</i> sp.	Mb1	DSM 28100	No	Biogas plant	NC_023044	Maus <i>et al.</i> , 2013
6	<i>M. lacus</i>	AL-21	DSM 24406	Yes	Northern peatlands	CP002551	Cadillo-Guiroz <i>et al.</i> , 2014
7	<i>M. arcticum</i>	M2	DSM 19844	No	Holocene permafrost sediments	JQKN00000000.1	Shcherbakova <i>et al.</i> , 2011
8	<i>M. veterum</i>	MK4	DSM 19849	Yes	Ancient permafrost sediments	JQJK00000000.1	Krivushin <i>et al.</i> , 2010
9	<i>M. paludis</i>	SWAN-1	DSM 25820	Yes	Northern peatlands	CP002772.1	Cadillo-Guiroz <i>et al.</i> , 2014

Für vergleichende Zwecke innerhalb der Gattung *Methanobacterium* sind außer dem Stamm *M. formicum* Mb9 auch die Isolate *Methanobacterium* sp. Mb1 (MAUS *et al.* 2013) sowie der Typstamm *M. formicum* MF<sup>T</sup> (MAUS *et al.* 2014) im Rahmen dieses Projektes sequenziert worden. Zurzeit liegen insgesamt 10 Genomsequenzen für Vertreter aus der Gattung *Methanobacterium* vor (**Tabelle 28**). Für eine komparative Analyse wurden alle verfügbaren *Methanobacterium* Genome in das Programm EDGAR importiert. Phylogenetische Analysen aller *Methanobacterium* Stämme basierend auf 1.219 Core-Genen (36-60% des Genoms der jeweiligen Isolate) hat gezeigt, dass die betrachteten Isolate entsprechend ihres Ursprungshabitats im phylogenetischen Baum *clustern* (**Abbildung 21**).

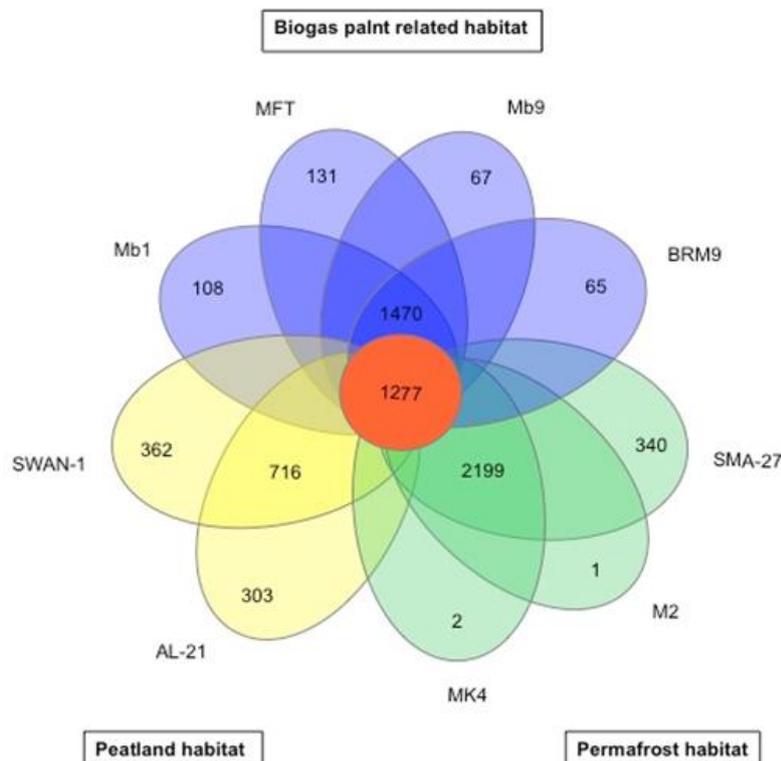


**Abbildung 21:** Phylogenetische Analyse von vollständig sequenzierten Isolaten der Gattung *Methanobacterium* basierend auf 1.219 Core-Genen (36-60% des Genoms der jeweiligen Isolate). Das Habitat des Stammes *Methanobacterium* sp. SMA-27 ist zurzeit nicht bekannt. Alle Isolate *clustern* im phylogenetischen Baum entsprechend ihres ursprünglichen Habitats.

Des Weiteren wird ersichtlich, dass innerhalb der analysierten *M. formicum* Isolate der Stamm *Methanobacterium* sp. Mb1 näher mit den *M. formicum* Stämmen verwandt ist als der Stamm DSM3637. Damit stellt sich die Frage, ob der Stamm DSM3637 tatsächlich der Spezies *M. formicum* zuzuordnen ist. Eine in diesem Kontext durchgeführte Digitale-DNA-DNA Hybridisierungsanalyse (DDH) zeigte, dass der Vergleich zwischen dem Typstamm *M. formicum* MF<sup>T</sup> und *M. formicum* DSM3637 einen DDH-Wert von 69% ergab. Da Stämme, die zu einer Art gehören, gewöhnlich einen DDH-Wert von > 70% aufweisen, wäre der Stamm DSM3637 einer anderen *Methanobacterium* Art zuzuordnen. Da der Stamm in Symbiose mit der Amöbe *Pelomyxa palustris* lebt und sich daher an eine endosymbiontische Lebensweise angepasst hat, wäre eine neue Spezies-Zuweisung zu diskutieren.

Eine weiterführende *Core-Gen* Analyse mit dem Programm EDGAR hat gezeigt, dass die *Methanobacterium* Gruppe, deren ursprüngliches Habitat eine Biogas-Anlage (oder ähnliches) ist, insgesamt 1.470 Gene gemeinsam hat. Dies ist graphisch in der **Abbildung 22** dargestellt. Neben vielen Haushaltsgenen sind auch Gene gefunden worden, die dem vollständigen Methanogenese Stoffwechselweg zugeordnet werden konnten. Alle vier untersuchten Methanobakterien verwenden CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Substrate für die Synthese von Methan (hydrogenotrophe Methanogenese).

Die weitere Analyse der stammspezifischen Gene aller Isolate aus einem Biogasproduzierenden Habitat ermöglichte die Identifizierung eines *Gen-Clusters*, das für die Synthese eines kompatiblen *Solute*, nämlich Ectoin, verantwortlich ist. Kompatible *Solute* werden von Mikroorganismen zur Stabilisierung von Enzymen, DNA und auch Membranen sowie der gesamten Zelle hergestellt. Die Synthese von kompatiblen *Solute* in methanogenen *Archaea* wird als Adaptationsmechanismus diskutiert, um dem Stress, verursacht durch hohe Salz- und/oder Ammoniumkonzentrationen, zu begegnen.



**Abbildung 22:** Flowerplot basierend auf *Core-* und *unique* Genen für sequenzierte Isolate der Gattung *Methanobacterium*. Einzelne Isolate sind entsprechend ihres natürlichen Habitats gruppiert worden, was durch die Verwendung von unterschiedlichen Farben kenntlich gemacht wird. Die Anzahl der *Core*-Gene aller analysierten Isolate der Gattung *Methanobacterium* ist im Zentrum des *Flowerplots* angegeben. *Unique* Gene sind am Rand jedes Ovals, das für ein Isolat steht, dargestellt.

### 3.2 Taxonomische und funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft der thermophilen Biogasanlage Viersen

Die thermophile Biogas-Produktionsanlage Viersen (NRW, Deutschland) wurde am 19.12.2013 beprobt. Nach dem Zellaufschluss unter Verwendung von fünf unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden und erfolgreicher Herstellung von fünf *Whole-Metagenome*-Sequenzierbibliotheken wurden diese auf dem Illumina MiSeq sequenziert. Die gewonnenen Sequenzdaten sind anschließend einer im Abschnitt 2.1.1 beschriebenen bioinformatischen Verarbeitung und Analyse unterzogen worden. **Tabelle 29** fasst die Sequenzier-Statistik der metagenomischen Datensätze zusammen.

**Tabelle 29:** Statistik der Sequenziererergebnisse der erzeugten *Whole-Metagenome*-Sequenzierbibliotheken

Applied protocol	Obtained reads	Obtained bases	Q30* value of sequenced bases [%]	Number of merged paired-end reads
<b>A</b>	4,054,984	1,058,350,824	88.71	1,777,661
<b>B</b>	5,521,480	1,441,106,280	89.62	2,689,150
<b>C</b>	5,975,856	1,559,698,416	89.34	2,890,795
<b>D</b>	3,933,006	1,026,514,566	89.10	1,793,876
<b>E</b>	2,803,170	731,627,370	89.92	1,323,234

**Angewandte DNA-Extraktionsprotokolle:**

A: FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France)

B: NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Germany)

C: PowerLyzer DNA Isolation Kit (MoBio, USA)

D: PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, USA)

E: Classical chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction (SCHLÜTER *et al.* 2008)

\* Die Wahrscheinlichkeit einer falsch detektierten Base (1:1000)

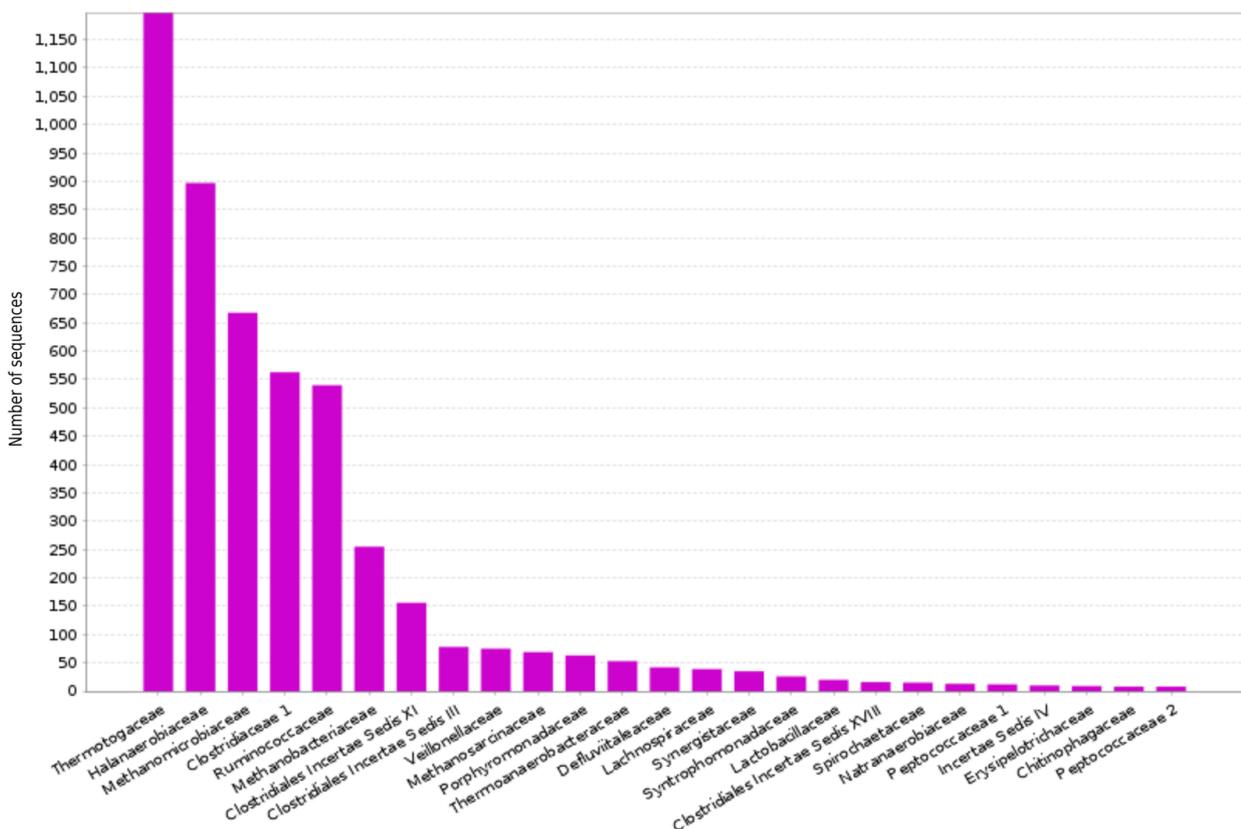
#### 3.2.1 Taxonomische Charakterisierung der thermophilen mikrobiellen Biogasgemeinschaft auf Basis der metagenomischen 16S rDNA Sequenzen

Nach der bioinformatischen Prozessierung der Sequenzdaten konnten insgesamt 21.888 16S rDNA Sequenzen aus dem Metagenomdatensatz erkannt, exportiert und analysiert werden. Davon konnten 18.817 Sequenzen (85% von allen metagenomischen 16S rDNA Sequenzen) mittels des MGX Programms taxonomisch klassifiziert werden (**Abbildung 23**). Für die verbleibenden 3.071 Sequenzen (15%) konnte keine taxonomische Zuweisung erreicht werden, da diese Sequenzen vermutlich eine neue Art repräsentieren die in den Sequenzdatenbanken nicht vorhanden ist.

Die mikrobielle Biogasgemeinschaft der thermophilen BGA Viersen wird von der Domäne *Bacteria* (95% von allen klassifizierten 16S rDNA Sequenzen) dominiert, während die übrigen 5% der Sequenzen der Domäne *Archaea* zugewiesen wurden. Die bakterielle Gemeinschaft ist hauptsächlich durch die Phyla *Firmicutes* (37%), *Thermotogae* (7%) und *Bacteroidetes* (4,5%) vertreten. Die Klassen *Clostridia* (22%), *Thermotogae* (7%)

und *Negativicutes* (0,8%) zählen zu den prominentesten in dieser mikrobiellen Gemeinschaft. Weiter in der hierarchischen Ordnung konnten die Familien *Thermotogaceae* (6,3%) (Phylum *Thermotogae*), *Halaerobiaceae* (4,7%), *Clostridiaceae* 1 (2,9%) und *Ruminococcaceae* (2,8%) (alle angehörig dem Phylum *Firmicutes*) als abundant identifiziert werden. Die Genera *Petrotoga* (5,5%) gefolgt von *Halocella* (3,5%), *Clostridium sensu stricto* (1,8%), *Clostridium* III (1,5%) und *Tepidimicrobium* (0,6%) sind die abundantesten Genera im Viesen Mikrobiom.

Die Domäne *Archaea* wird vom Phylum *Euryarchaeota* (100%) repräsentiert. Hierbei wurden die Ordnungen *Methanomicrobiales* (3,5%) und *Methanobacteriales* (1,3%) identifiziert, mit *Methanoculleus* (2,7%) und *Methanothermobacter* (0,8%) als dominante Genera innerhalb dieser Ordnungen.

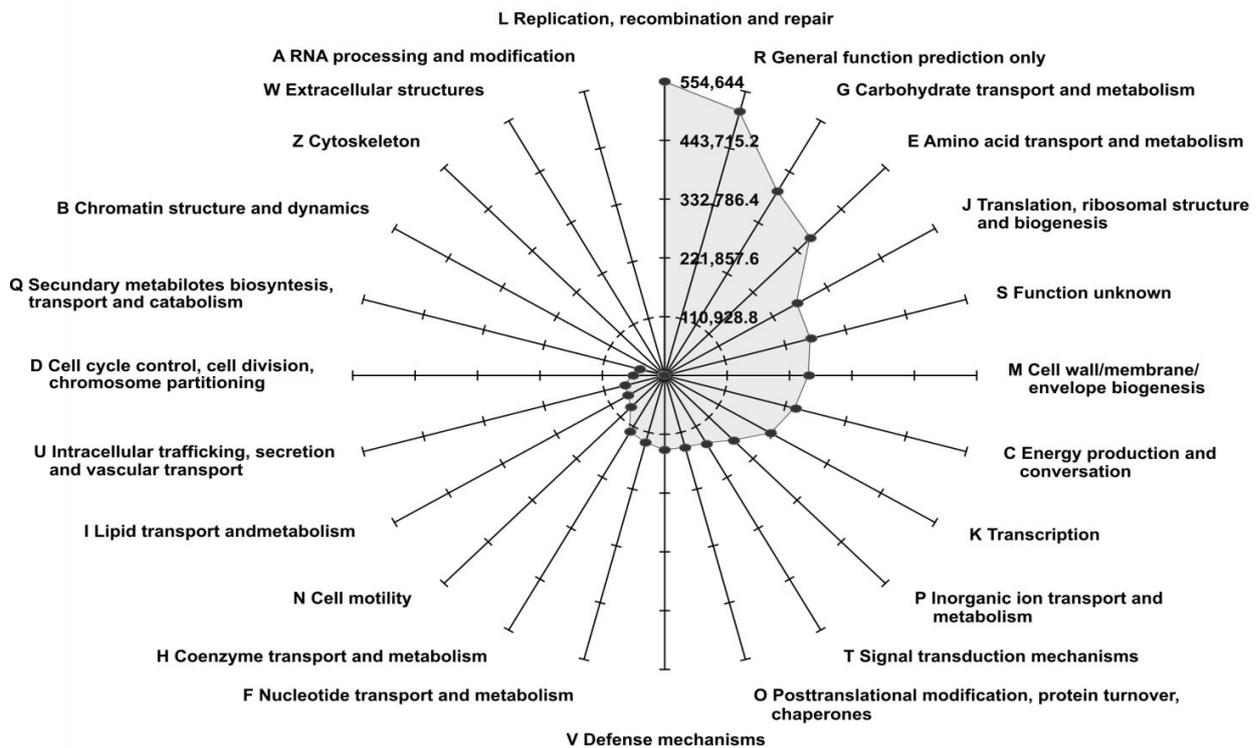


**Abbildung 23:** Prominente Taxa der mikrobiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf der Familien Ebene. Die taxonomische Klassifikation erfolgte anhand von metagenomischen 16S rDNA Sequenzen gegen die RDP Datenbank mit Hilfe des Programms MGX.

### 3.2.2 Funktionelle Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der Biogasanlage Viersen basierend auf Metagenom-Sequenzdaten

Die Umwandlung von organischem Material zu Biogas ist ein komplexer Prozess bestehend aus einer Reihe von biochemischen Reaktionen. Zunächst wird die Zellulose der

Pflanzenzellwand in weniger komplexe Zucker abgebaut. Diese werden anschließend zu Fermentations-Endprodukten wie CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und Acetat metabolisiert, die unter anderem das Substrat für methanogene *Archaea* darstellen. Um das metabolische Potenzial der mikrobiellen Biogasgemeinschaft Viersen zu untersuchen, wurde das Metagenom dieser Gemeinschaft mit dem Programm MGX funktionell profiliert und analysiert. Insgesamt konnten 3.777.965 metagenomische Sequenzen (58,1% aller Metagenomsequenzen) einem Cluster von Orthologen Gruppen von Proteinen (COG) zugeordnet werden (**Abbildung 24**). Insgesamt wurden 25 übergeordnete COG Gruppen definiert.



**Abbildung 24:** COG-Klassifizierung von Metagenomsequenzen der thermophilen Biogasproduzierenden Gemeinschaft der BGA Viersen (COG - Cluster of Orthologous Groups of proteins). Die einzelnen COG Kategorien sind außen bezeichnet. Die Anzahl der klassifizierten Sequenzen, die der jeweiligen COG Kategorie zugewiesen wurden, ist in der Mitte der Abbildung zu sehen.

Die COG-Kategorien 'carbohydrate transport and metabolism' (G), 'amino acid transport and metabolism' (E) und 'energy production and conversion' (C) sind gut durch Metagenomsequenzen repräsentiert. Sie sind von besonderem Interesse, da bei der Umwandlung von Biomasse zu Methan komplexe Polymere in Oligomere und Monomere, wie Oligosaccharide, Monosaccharide, Fettsäuren und Aminosäuren abgebaut werden. Darüber hinaus wurden in der COG-Kategorie 'carbohydrate transport and metabolism' (G) Sequenzen gefunden, die Gene für Cellobiose Phosphorylase (COG3459), Glucosidase (COG0366), alpha-Glucosidase (COG1501), Beta-Glucosidase (COG1472) und

Cellulase M (COG1363) kodieren. Das Vorhandensein von diesen Genen deutet darauf hin, dass die untersuchte Biogasgemeinschaft in der Lage ist, cellulosehaltiges Pflanzenmaterial abzubauen (**Tabelle 30**). Weitere metagenomische Sequenzen kodieren Gene für Xylanase/Chitindeacetylase (COG0726), beta-1,4-Xylanase (COG3693), Beta-Xylosidase (COG3507), ABC-Typ-Xylose-Transportsystem (COG4213) und Pektatlyase (COG3866). Die genannten Enzyme sind am Abbau der Pflanzenzellwandkomponenten Hemicellulose, Xylan und Pektin beteiligt. Des Weiteren wurden im Metagenom Gene gefunden, die für Formyl-Methanofuran Dehydrogenase (FMD) Untereinheiten (ABCD) (COG1229, COG1029, COG2218, COG1153) kodieren. Das Enzym Formyl-Methanofuran Dehydrogenase katalysiert die reversible Reduktion von CO<sub>2</sub> zu N-Formyl-Methanofuran, einem Zwischenprodukt der hydrogenotrophen Methanbildung.

Eine anschließende taxonomische Charakterisierung der Metagenomsequenzen, die den funktionellen Kategorien G, E und C zugeordnet wurden, hat gezeigt, dass *Petroto-ga*, *Clostridium*, *Halothermotrix*, *Ruminoclostridium* und *Tepidanaerobacter* die dominanten Gattungen innerhalb dieser Kategorien sind.

**Tabelle 30:** Funktionelle Profilierung der Gemeinschaft der BGA Viersen auf Basis von COG-Kategorien (COG – Cluster of Orthologous Groups of proteins).

Environmental gene tag		Assigned sequences
COG accession	Function	Assigned sequences
<i>Polysaccharide degradation and metabolism</i>		
COG0366	Glucosidase	12524
COG1472	Periplasmic beta-galactosidase and related glycosidases <sup>1</sup>	11683
COG3459	Cellobiose phosphorylase	10420
COG1501	Alpha-glycosidase, GH31 family	5616
COG2730	Aryl-phospho-beta-D-glycosidase BglC, GH1 family	2588
COG1874	Beta-galactosidase GanA	1714
COG2160	L-arabinose isomerase	1539
COG3345	Alpha-galactosidase	1385
COG1904	Glucuronate isomerase	1030
COG3325	Chitinase, GH18 family	958
COG3405	Endo-1,4-beta-D-glucanase Y <sup>2</sup>	854
COG4124	Beta-mannanase <sup>3</sup>	152
COG5297	Cellulase/cellobiase CelA1	136
COG0726	Peptidoglycan/xylan/chitin deacetylase, PgdA/CDA1	5831
COG3507	Beta-xylosidase	4780
GOG3693	Endo-1,4-beta-xylanase, GH 35 family	3797
GOG4213	ABC-type xylose transport system, periplasmic component	1628
GOG2115	Xylose isomerase	1591
COG5434	Polygalacturonase	1023
COG3867	Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase	823
COG3866	Pectate lyase	541
COG4677	Pectin methyltransferase and related acyl-CoA thioesterases	228
COG2132	Multicopper oxidase with three cupredoxin domains (includes cell division protein FtsP and spore coat protein	423
<i>Protein degradation</i>		
COG0740	ATP-dependent protease ClpP, protease subunit	5178
<i>Methanogenesis - hydrogentrophic pathway</i>		
COG1229	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit A	839
COG2218	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit C	541
COG2191	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit E	371
COG1153	Formylmethanofuran dehydrogenase, subunit D	212
COG2037	Formylmethanofuran: H4MPT formyltransferase	269
COG3252	Methenyl-H4MPT cyclohydrolase	227
COG1962	H4MPT S-methyltransferase, subunit H	246
COG4064	H4MPT S-methyltransferase, subunit G	181
COG4059	H4MPT S-methyltransferase, subunit E	167
COG4061	H4MPT S-methyltransferase, subunit C	151
COG4060	H4MPT S-methyltransferase, subunit D	150
COG4063	H4MPT S-methyltransferase, subunit A	121
COG4062	H4MPT S-methyltransferase, subunit B	14
COG4218	H4MPT S-methyltransferase, subunit F	8
<i>Methanogenesis - acetoclastic pathway</i>		
COG1614	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit β	510
COG1456	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit γ	353
COG2069	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit δ	214
COG1152	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit α	198
COG1880	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, subunit ε	55
<i>Methanogenesis - hydrogentrophic and acetoclastic pathway</i>		
COG4058	Methyl coenzyme-M reductase, subunit α	719
COG4054	Methyl coenzyme-M reductase, subunit β	550
COG4057	Methyl coenzyme-M reductase, subunit γ	270
COG4055	Methyl coenzyme-M reductase, subunit D	194
COG4056	Methyl coenzyme-M reductase, subunit C	107

### 3.2.3 Beurteilung der Abundanz von Isolaten aus der thermophilen BGA Viersen auf Basis von Metagenom-Sequenzdaten

Die Biogas-Produktionsanlage Viersen wurde im Jahr 2012 von den Verbundpartnern ATB, JGU, HAW, RIPAC und TUM gemeinsam beprobt und die entnommene Fermentationsprobe wurde zur Herstellung von Anreicherungskulturen und zur Gewinnung von Isolaten verwendet. Isolate wurden mittels Sequenzierung ihres 16S rRNA Gens taxonomisch eingruppiert. Die **Tabelle 31** vermittelt einen Überblick über alle Isolate, die aus der BGA Viersen stammen. Da für die BGA Viersen auch Metagenom-Sequenzdaten vorliegen (siehe oben) konnte die Abundanz der 16S rRNA Sequenzen der Isolate aus der Anlage im korrespondierenden Metagenom bestimmt werden. Für diesen Zweck wurde das Programm GS Mapper 2.8 (Roche) angewandt. Metagenomische Sequenzen wurden auf die 16S rRNA Sequenzen der einzelnen Isolate gemappt, um auszuzählen, wie oft eine bestimmte Sequenz durch metagenomische *Reads* getroffen wird. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden stringente Programmeinstellungen für das *Mapping* gewählt: 97% Sequenzähnlichkeit und eine Sequenzübereinstimmung über 90% der gemappten metagenomischen Sequenz.

**Tabelle 31:** Übersicht über die vorliegenden Isolate aus der BGA Viesen sowie Beurteilung ihrer Abundanzen durch *Mapping* von korrespondierenden Metagenom-Sequenzen auf die 16S rRNA Gene der Isolate.

Nearest related NCBI Genbank entry			Isolates from the thermophilic biogas plant						
Class	Family	Species	Accession number	Maximum identity of 16S rDNA	Reference isolate	Number of mapped metagenome sequences			
<b>Cellulolytic Bacteria</b>									
<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	LN626355	94 %	T3/55	17			
			LN626355	95 %	SD1D				
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium cellulosi</i>	NR_044624	99 %	DG5	0			
			AB684439	99 %	K50/50	826			
			L09174	98-99 %	Neu14	28			
		<i>Clostridium thermocellum</i>	L09173	99 %	HAW2/1	1279			
<b>Acidogenic/acetogenic Bacteria</b>									
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereaus</i>	-						
			<i>Bacillus licheniformis</i>	CP000002	100%	L2C	2		
			<i>Bacillus oleronius</i>	-					
			<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	NR_117028	99 %	Neu19	1		
			<i>Bacillus coagulans</i>	AB271752	99 %	M1A	3		
			<i>Bacillus infernus</i>	U20385	100 %	E2C	3		
			<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	AY608961	100 %	J2B	0		
			<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	-				
					-				
			<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Aneurinibacillus spp.</i>	-				
					<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	AY167814	100%	YP4-6A	0
			<i>Planococcaceae</i>	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	AB101594	100 %	A6A	2	
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium isatidis</i>	X98395	99 %	MV1	738		
				-					
				Y18177	94 %	Neu23	281		
			<i>Clostridium sporogenes</i>	-					
				<i>Clostridium thermopalmarium</i>	NR_026112	99 %	Neu4	11	
				<i>Lutispora thermophila</i>	NR_041236	99 %	XV1	3	
				<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	NR_043077	97 %	GRX2	9	
					NR_043077	99 %	GRM1		
				<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	NR_043077	96%	D1		
					NR_116042	99 %	GRC4	27	
					NR_116042	97 %	GRC1		
						NR_116042	93 %	GRC3	
				<i>Defluviitaleaceae</i>	<i>Defluviitalea saccharophila</i>	HQ020487	96%	GRX3	12
				<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfotomaculum australicum</i>	M96665	99 %	L14	1
				<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium staminisolvans</i>	BAVR01000144	98 %	Neu18	37
			AB221372			97%	Neu21	9	
			Y18180			98 %	Iso4/1b	7	
			<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	AB106353	96 %	AS34	23	
		96 %			AS46				
	<i>Inc. sed.</i> <sup>1</sup>	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	AF358114	99 %	XP2-13-3	0			
EF680277			99 %	Iso6/1b					
CP002171			100 %	Gluc2	0				
			99 %	Gluc4					
NR_117378			96%	DG3	1				
Unclassified	<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	EF116488	96 %	BA2-13	0				
<i>Thermotogae</i>	<i>Petrotogaceae</i>	<i>Defluviitoga tunisiensi</i>	NR_122085	100 %	L3	968			
				99 %	AS30				
<b>Methanogenic Archaea</b>									
<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	NR_028241	100%	HAW-Viersen	13			
			AB104858	100 %	SIV6	39			
<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanoculleus thermophilus</i>	AB065297	100 %	V2.1	389			

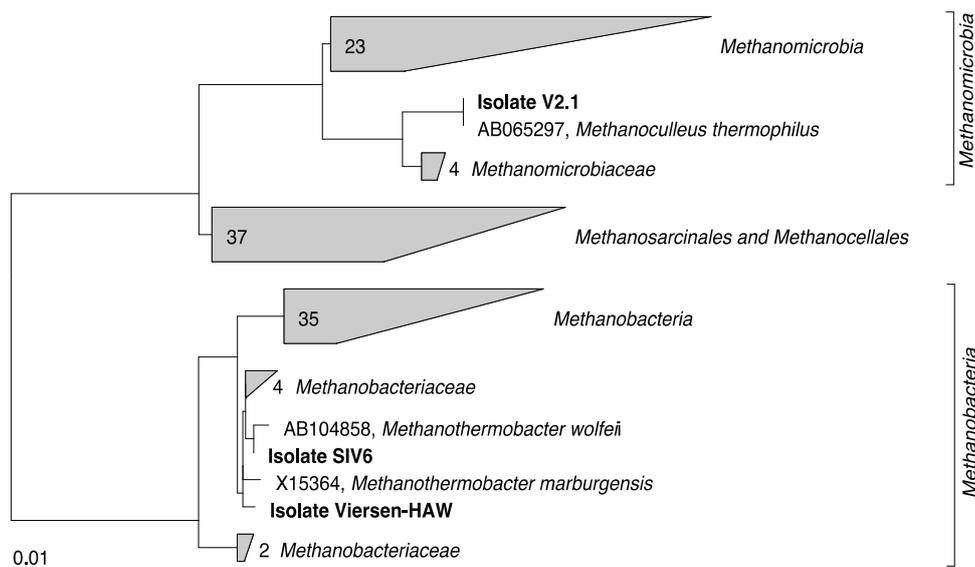
<sup>1</sup>*Inc. sed.* = *incertae sedis*

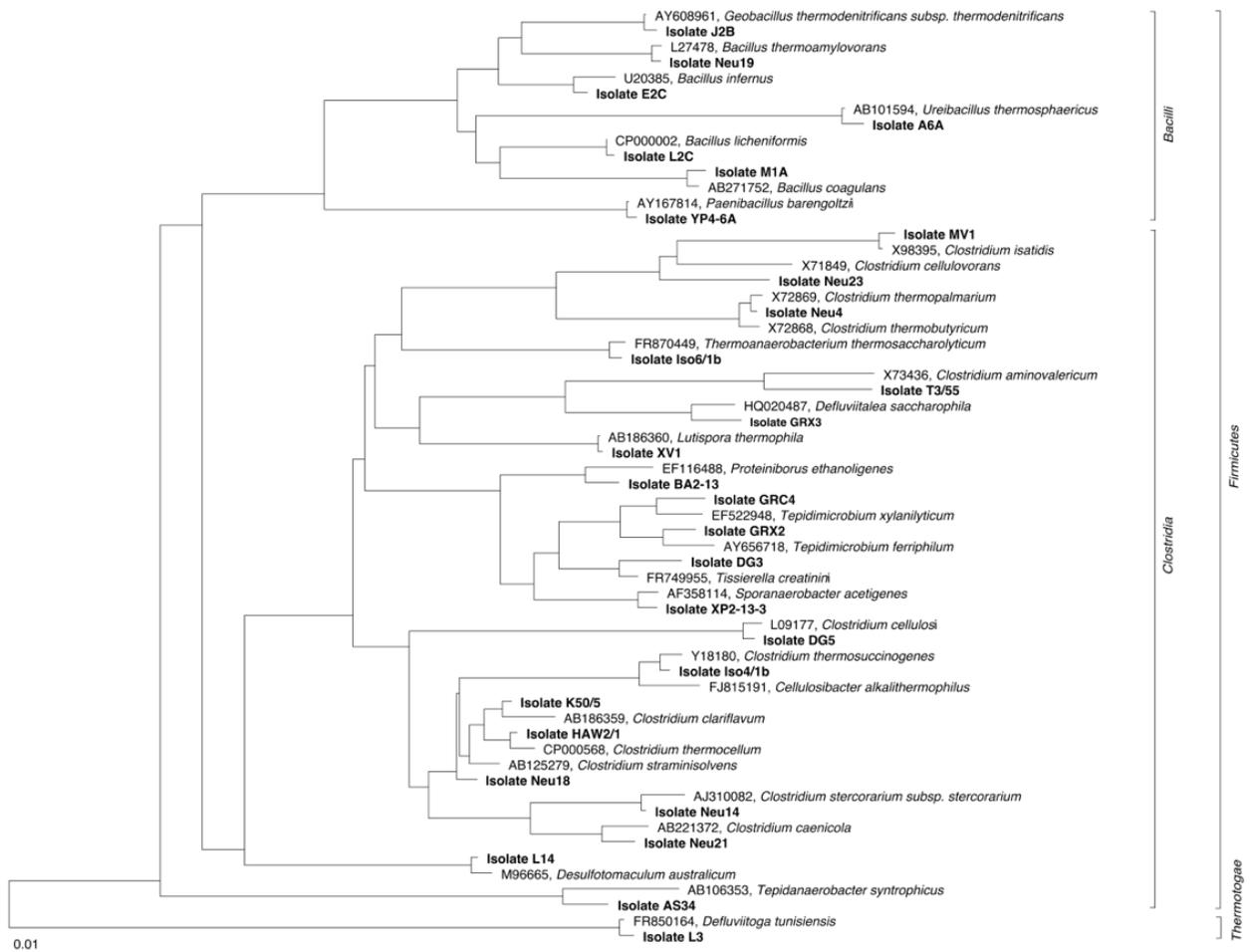
Die **Tabelle 31** zeigt, dass die vorliegenden Isolate der BGA Viersen die Phyla *Firmicutes*, gefolgt von *Thermotogae* und *Euryarchaeota* repräsentieren. Die Klassen *Clostridi-*

a, *Bacilli*, *Thermotogae*, *Methanobacteria* und *Methanomicrobia* sind demnach in der Anlage vertreten. Das *Mapping* von metagenomischen Sequenzen der thermophilen Biogasegemeinschaft auf die 16S rDNA Sequenzen der Isolate zeigt, dass die Stämme *Clostridium thermocellum* HAW2/1, *Clostridium clariflavum* K50/50, *Defluviitoga tunisensis* L3 und *Methanoculleus thermophilus* HAW-Viersen häufig in der Gemeinschaft vorkommen. Die Anzahl der gemappten Metagenomsequenzen auf die 16S rDNA Sequenzen dieser Stämme ist im Vergleich zu den anderen Isolaten in der **Tabelle 4** am höchsten. Es wird ersichtlich, dass die meisten Isolate, die in der **Tabelle 31** gelistet sind, nur eine untergeordnete Rolle in der mikrobiellen Gemeinschaft spielen.

### 3.2.4 Phylogenetische Einordnung bakterieller und archaealer Isolate unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme

Zur Ermittlung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse von gewonnenen Isolaten wurden die 16S rDNA Sequenzen der Isolate mit entsprechenden Sequenzen der Typstämme aus der SILVA Datenbank (<http://www.arb-silva.de/>) verglichen. Zunächst wurde ein multiples Alignment der 16S rDNA Sequenzen der Isolate mit dem Programm SINA (PRUESSE *et al.* 2012) berechnet. Das Programm ARB (LUDWIG *et al.* 2004) wurde eingesetzt, um aus dem Alignment die phylogenetischen Distanzen und den entsprechenden Baum zu berechnen. Zur Orientierung wurden die 16S rRNA Sequenzen der verwandten Typstämme ebenfalls in den phylogenetischen Baum eingefügt. Der resultierende phylogenetische Baum ist in der **Abbildung 25** gezeigt.





**Abbildung 25:** Phylogenetische Einordnung der archaealen (oben) und bakteriellen (unten) Stämme, die aus Fermentationsproben der thermophilen Biogasanlage Viersen gewonnen wurden. Verwandte Typstämme wurden ebenfalls in den Baum eingruppiert. Der phylogenetische Baum basiert auf den 16S rDNA Sequenzen der Isolate und Typstämme. Die eckigen Klammern außen zeigen die taxonomische Zuweisung der Isolate auf Phylum und Klassen Ebene.

Insgesamt sind in dem gezeigten phylogenetischen Baum 32 unterschiedliche Spezies repräsentiert. Die dargestellten Isolate konnten den Phyla *Firmicutes*, *Thermotogae* und *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Von den 32 Biogas-Isolaten wurden 22 Stämme der Klasse *Clostridia* zugeordnet; neun Stämmen davon gehören dem Genus *Clostridium* an. Viele Costridien Arten wie *C. thermocellum* oder *C. cellulosi* repräsentieren cellulolytische (Cellulose abbauende) Bakterien, die die ersten Schritte des Lignocellulose-Abbaus der pflanzlichen Biomasse durchführen. Einige Cellulose-abbauende *Clostridien* besitzen Cellulosomen (SCHWARZ 2001), Multienzym-Komplexe, die für eine effiziente Degradation von Cellulose sorgen (BAYER *et al.* 1994). Die gebildeten Monomere werden meistens direkt vom Bakterium verwertet.

Eine zweite Isolat-Gruppe wurde der Klasse *Bacilli* zugeordnet, mit *Bacillus* als prominentestem Genus innerhalb dieser Gruppe. Einige *Bacillus* Arten wie z.B. *Bacillus* spp. besitzen ein vollständiges Enzymsystem für den Xylan-Abbau und stellen somit eine wichtige Gruppe für die Substrathydrolyse in einem Biogasreaktor dar.

Die letzte bakterielle Gruppe im phylogenetischen Baum repräsentiert das Isolat *Defluviitoga tunisiensis* (Phylum *Thermotogae*). Die Annotation des *Defluviitoga tunisiensis* L3 Genoms hat gezeigt, dass dieser Stamm Gene kodiert, deren Produkte in den Abbau von unterschiedlichen, komplexen Zuckermolekülen involviert sind (MAUS *et al.* 2015). Die im Rahmen dieses fermentativen Stoffwechsels erzeugten Endprodukte Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> dienen den methanogenen *Archaea* als Substrat für die Methanerzeugung.

Der Phylum *Euryarchaeota* ist durch die Isolate *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermobacter wolfeii* und *Methanoculleus thermophilus* repräsentiert. Alle drei Spezies betreiben eine hydrogenotrophe Methansynthese und verwenden hierfür CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Substrate.

Der Vergleich der phylogenetischen Zuweisung der Isolate mit dem taxonomischen Profil der mikrobiellen Gemeinschaft der Anlage Viersen (Kapitel 3.2.1) lässt erkennen, dass keine Vertreter der dominanten Genera *Petrotoga*, *Halocella* oder *Clostridium sensu stricto* isoliert wurden. Sehr wahrscheinlich stellen Vertreter dieser Genera sehr spezifische Anforderungen in Bezug auf ein Wachstumsmedium und die Kultivierungsbedingungen, die möglicherweise in den durchgeführten Kultivierungen nicht getroffen wurden. Es ist allgemein bekannt, dass ein großer Anteil der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen bisher nicht kultiviert werden konnte. Des Weiteren sind einige Prokaryonten des untersuchten Habitats auf einen syntrophen Partner angewiesen und können daher nicht in Reinkultur überleben.

## 4 Fazit zu Teilvorhaben 2

Die folgenden Aufgaben im Rahmen dieses Teilvorhabens konnten erfolgreich bearbeitet werden:

- (1) Nach der Isolierung von bisher unbekanntem Spezies aus Biogasproben ausgewählter Fermenter sowie Extraktion der DNA der jeweiligen Isolate bei den Verbundpartnern konnten die Genome dieser Stämme mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgreich erstellt und analysiert werden. Insgesamt sind im Laufe des 'BIOGAS-CORE' Projektes 25 bakterielle und archaeale Genome sequenziert worden.
- (2) Die Annotation der sequenzierten Genome wurde mit dem Programm GenDB durchgeführt. Für alle Projektpartner stehen die Genomsequenzen der Isolate in der GenDB-Plattform zur weiteren Bearbeitung und Analyse zur Verfügung. Alle Partner haben über ein GenDB *Web-Front-End* Zugang zu allen Biogas-Core Genomprojekten. Mit Hilfe der GenDB-Plattform können die Annotationen der erstellten Genomsequenzen jederzeit manuell verfeinert und vervollständigt werden.
- (3) Zum Zweck der komparativen Analyse wurden die Genome mit dem Programm EDGAR analysiert. Eingerichtete EDGAR-Projekte stehen allen Projektpartnern für weitere Analysen zur Verfügung. Dies ist deshalb wichtig, weil erwartet wird, dass in Zukunft Genomsequenzen zur Verfügung stehen werden, die für Genom-Vergleiche mit den Biogas-Core Genomen herangezogen werden können.
- (4) Die Genomsequenzen von 11 Isolaten konnten im *Journal of Bacteriology* und *Journal of Biotechnology* in Form von *Genome Announcements* veröffentlicht werden. Zwei weitere *Genome Announcements* sind zurzeit in Vorbereitung und werden demnächst eingereicht.

Darüber hinaus sind die Genome der Stämme *M. bourgensis* MS2<sup>T</sup> und *C. bornimense* M2/40<sup>T</sup> komparativ im Detail analysiert worden. Die Ergebnisse dieser Studien sind kürzlich publiziert worden (MAUS *et al.* 2014, TOMAZETTO *et al.* 2015). Das Manuskript über die Genomanalyse des Stammes *D. tunisiensis* L3 ist kürzlich beim *Journal Plos One* eingereicht worden und befindet sich zurzeit unter Revision.

- (5) Die Ermittlung der Struktur und Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der thermophilen Biogas-Produktionsanlage Viersen, die im Rahmen dieses Projektes von allen Verbundpartnern beprobt wurde, konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Eine entsprechende Publikation wird derzeit zusammengestellt. Es ist geplant, diese Anfang des Jahres 2016 zur Publikation einzureichen.
- (6) Taxonomische und funktionelle Charakterisierungen der thermophilen Biogas-Gemeinschaft der Anlage Viersen wurden mit Hilfe der *Metagenomics* Analyse-Plattform MGX durchgeführt.
- (7) Das gemeinsame Manuskript zur taxonomischen Profilierung der Biogas-Produktionsanlage Viersen ist zurzeit in Arbeit und soll Anfang des Jahres 2016 fertiggestellt werden.
- (8) Die Bestimmung der Abundanzen der gewonnenen Isolate mittels *Fragment Recruitment* von korrespondierenden Metagenom-Datensätzen auf die Genomse-

quenzen der jeweiligen Isolate konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Ein Teil der erhaltenen Ergebnisse ist in den oben genannten Manuskripten veröffentlicht worden.

- (9) Detaillierte Genomanalysen für einige Isolate bieten weitere Möglichkeiten für Veröffentlichungen interessanter Aspekte, die für den Biogasprozess eine wichtige Rolle spielen können.

#### **4.1 Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Der zahlenmäßige Gesamtverwendungsnachweis lag zum Projektende noch nicht vor. Er wird schnellstmöglich nachgereicht.

#### **4.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die für das Projekt bewilligten Mittel wurden ausschließlich zur Erreichung der oben aufgeführten Projektziele eingesetzt. Die Auflistung der im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse zeigt, dass der Mitteleinsatz angemessen war. Die durchgeführten Arbeiten lieferten grundlegenden Erkenntnisse zur technischen Herangehensweise sowie zur Erfassung der Struktur und Funktion der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Biogasanlagen und stellt somit eine solide Basis für weiterführende Analysen dar. Erzielte Ergebnisse sind wie oben dargelegt öffentlich zugänglich.

#### **4.3 Nutzen und Verfügbarkeit des Ergebnisses**

Die im Rahmen dieses Projektes erzielte taxonomische Profilierung der BGA Viersen ermöglichte eine umfassende Charakterisierung der mikrobielle Diversität in dem untersuchten Fermenter. Darüber hinaus geben die Genomsequenzen von korrespondierenden Isolaten Einblicke in das metabolische Potential der jeweiligen Mikroorganismen. Basierend auf der mikrobiellen Zusammensetzung der Gemeinschaft und der Abundanz der jeweiligen Stämme lässt sich ein Überblick über die mikrobiologischen Prozesse (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese, Methanogenese) gewinnen. Projektergebnisse wurden in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht und stehen damit öffentlich zur Nutzung zur Verfügung. Ebenso wurden alle in diesem Projekt erhobenen Sequenzdaten in öffentlich zugängliche Datenbanken eingestellt und stehen damit der wissenschaftlichen Gemeinschaft ebenfalls zur Nutzung zur Verfügung. Im Rahmen des Projekts gewonnene Isolate sind bei der DSMZ (Leibniz-Institut – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen GmbH) hinterlegt worden und können damit von dort bezogen werden. Im Rahmen des Projekts gewonnene und charakterisierte Isolate stehen für biotechnologische Anwendungen zur Verfügung, z.B. als Impfkulturen (*Inocula*), Starterkulturen oder Supplemente. Ebenso kann die genetische Information der Isolate (ist über Datenbanken abrufbar) für die Produktion von Enzymen für biotechnologische Prozesse genutzt werden. Des Weiteren liefern die ermittelten Ergebnisse die Basis für

die Beurteilung der Performance von Biogas-Prozessen und können letztlich auch für die Erkennung von Prozessstörungen genutzt werden.

Sowohl Genom- als auch Metagenomsequenz-Daten sind in den Datenbanken EBI (*European Bioinformatics Institute*) und NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) hinterlegt und stehen anderen Nutzern damit bereits zur Verfügung.

#### **4.4 Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Zurzeit ist keine andere Studie bekannt, die sich mit der systematischen Isolierung, Kultivierung und Genomsequenzierung von unbekanntem Spezies aus Biogasanlagen beschäftigt. Des Weiteren ist die taxonomische Charakterisierung einer thermophilen Biogas-Produktionsanlage bisher noch nicht unter Verwendung von tief sequenzierten Metagenomen durchgeführt worden.

#### **4.5 Geplante Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse**

Im Rahmen des 'BIOGAS-CORE' Projektes sind bereits gemeinsame Publikation mit den Projektpartnern vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (AP1), der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (AP3) und der Technischen Universität München (AP5) über die Genomanalyse von Isolaten aus Biogasanlagen veröffentlicht worden (**Tabelle 32**). Drei weitere Manuskripte sind in Arbeit und sollten Anfang des Jahres 2016 fertiggestellt werden.

**Tabelle 32:** Übersicht über die erzielten Veröffentlichungen im Rahmen des 'BIOGAS-CORE' Projektes.

Nr.	Specification	Species name	Strain	Taxonomy (family level)	DSMZ no.	NCBI accession no.	EBI accession no.	Reference
1	Hydrolytic	<i>Ruminiclostridium cellulosi</i>	DG5	Clostridiaceae	DSM 29189	LM995447.1	ERP006074	Koeck et al., 2014
2	Hydrolytic	<i>Propionispora</i> sp.	2/2 37	Veillonellaceae	DSM 100628	NZ_CYSP000000000.1	CYSP01000001- CYSP01000043	Koeck et al., in preparation
3	Hydrolytic	<i>Herbinix hertcellulosilytica</i>	TUM3/55 <sup>T</sup>	Clostridiaceae	DSM 29228	CVTD000000000.2	CVTD020000001- CVTD020000035	Koeck et al., 2015
4	Hydrolytic	<i>Herbinix</i> sp.	SD1D	Clostridiaceae	DSM 100831	LN879430.1	LN879430	Koeck et al., in preparation
5	Hydrolytic/syntroph	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	L3	Thermotogaceae	DSM 29926	LN824141.1	LN824141	Maus et al., 2015, Maus et al., submitted
6	Cellulolytic	<i>Clostridium bornimense</i>	M2/40 <sup>T</sup>	Clostridiaceae	DSM 25664)	HG917868.1 (Chromosome I) HG917869.1 (Chromosome II)	HG917868 HG917869	Hahnke et al., 2014
7	Cellulolytic	<i>Clostridium thermocellum</i>	BC1	Clostridiaceae	-	GCA_000493655.1	CBQ001000001- CBQ0010000139	Koeck et al., 2014
8	Secondary fermenter	<i>Proteiniphilum</i> sp.	ING2_E5B	Porphyromonadaceae	DSM 28696	LN515532.1	LN515532	Hahnke et al., 2014
9	Acetogenic	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	1A1	Bacillaceae	-	GCA_000751775.1	CCRF01000001- CCRF01000106	Koeck et al., 2014
10	Acetogenic	<i>Peptoniphilus</i> sp.	ING2-D1G	Clostridiales incertae sedis	DSM 28672	LM997412.1	LM997412	Tomazetto et al., 2014
11	Methanogenic	<i>Methanobacterium formicicum</i>	MF <sup>T</sup>	Methanobacteriaceae	DSM 1535	LN515531.1	LN515531	Maus et al., 2014
12	Methanogenic	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Mb9	Methanobacteriaceae	DSM 28100	LN734822.1	ERS549551	-
13	Methanogenic	<i>Methanobacterium</i> sp.	Mb1	Methanobacteriaceae	-	HG425166.1	HG425166	Maus et al., 2013
14	Methanogenic	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	MS2 <sup>T</sup>	Methanomicrobiaceae	DSM 3045	HE964772.1	HE964772	Maus et al., 2012, 2014

## Veröffentlichungen:

- HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2015):** Complete genome sequence of the novel *Porphyromonadaceae* bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *J Biotechnol.* 193:34-6.
- HAHNKE S., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2014):** Whole genome sequence of *Clostridium bornimense* strain M2/40 isolated from a lab-scale mesophilic two-phase biogas reactor digesting maize silage and wheat straw. *J Biotechnol.* 184:199-200.
- KOECK D.E., WIBBERG D., KOELLMEIER T., BLOM J., JAENICKE S., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A. (2013):** Draft genome sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation. *J Biotechnol.* 168(1):62-3.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A. (2014):** Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol.* 188:136-7.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., LIEBL W., SCHLÜTER A. (2014a):** First draft genome sequence of the amyolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol.* 2014 Dec 20;192 Pt A:154-5.
- KOECK D.E., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A. (2015):** Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55(T), a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *J Biotechnol.* 214:59-60.
- KOECK D., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A. (in Vorbereitung):** Draft genome sequence of *Herbinix* sp. SD1D, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor.
- KOECK D., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A. (in Vorbereitung):** Draft genome sequence of *Propionispora* sp. 2/2 37, a new mesophilic xylan degrading bacterium isolated from a mesophilic biogas reactor.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., EIKMEYER F.G., SEFFNER A., BOELTER J., SZCZEPANOWSKI R., BLOM J., JAENICKE S., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2012):** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), Isolated from a sewage sludge digester. *J Bacteriol.* 194(19):5487-8.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., CIBIS K., EIKMEYER F.G., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2013):** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* 168(4):734-6.
- MAUS I., STANTSCHIEFF R., WIBBERG D., STOLZE Y., WINKLER A., PÜHLER A., KÖNIG H., SCHLÜTER A. (2014):** Complete genome sequence of the methanogenic neotype strain *Methanobacterium formicicum* MF(T). *J Biotechnol.* 192 Pt A:40-1.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., STOLZE Y., BLOM J., EIKMEYER F.G., FRACOWIAK J., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2014a):** Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *J Biotechnol.* 201:43-53.
- MAUS I., CIBIS K.G., WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015):** Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* 203:17-8.

**MAUS I., CIBIS K.G., BREMGES A., STOLZE Y., WIBBERG D., TOMAZETTO G., BLOM J., SCZYRBA A., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2016):** Genomic characterization of *Deffluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *J Biotechnol.* 232:50-60.

**TOMAZETTO G., HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., PÜHLER A., SCHLÜTER A., KLOCKE M. (2014):** Complete genome sequence of *Peptoniphilus* sp. strain ING2-D1G isolated from a mesophilic lab-scale completely stirred tank reactor utilizing maize silage in co-digestion with pig and cattle manure for biomethanation. *J Biotechnol.* 192 Pt A:59-61.

#### 4.6 Präsentation der Ergebnisse in der Öffentlichkeit

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des „2<sup>nd</sup> Thünen Symposium on Soil Metagenomics“ (Braunschweig, Deutschland, 2013).

Titel der Präsentation: „Taxonomic and functional profiling of the microbial community from a thermophilic production-scale biogas plant by a metagenome approach“.

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des CLIB-Graduiertenclusters „Industrielle Biotechnologie“ (Lünen, Deutschland, 2013).

Titel der Präsentation: „Comparative analyses of biogas producing communities based on genome and metagenome approaches“.

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen der Konferenz „2<sup>nd</sup> International Conference on Biogas Microbiology“ (Uppsala, Schweden, 2014).

Titel der Präsentation: „Insights into the completely annotated genome of *Methanoculleus bourgensis* MS2<sup>T</sup>, a related methanogenic archaeon in many biogas-producing reactor systems“.

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des CLIB-Graduiertenclusters „Industrielle Biotechnologie“ (Wernelskirchen, Deutschland, 2015).

Titel der Präsentation: „Comparative analyses of biogas producing communities based on genome and metagenome approaches“.

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen der Konferenz „17<sup>th</sup> International Conference on Biogas Microbiology“ (Rom, Italien, 2015).

Titel der Präsentation: „Insights into the annotated genome sequence of *Deffluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, rural biogas producing plant“.

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des 10th CeBiTec Symposiums „Bioinformatics for Biotechnology and Biomedicine“ (Bielefeld, Deutschland, 2015).

Titel der Präsentation: „Analyses of biogas producing microbial communities based on genome and metagenome approaches“.

#### I Referenzen:

**ANDERSON I.J., SIEPRAWKA-LUPA M., LAPIDUS A., NOLAN M., COPELAND A., GLAVINA DEL RIO T., TICE H., DALIN E., BARRY K., SAUNDERS E., HAN C., BRETTIN T., DETTER J.C., BRUCE D., MIKHAILOVA N., PITLUCK S., HAUSER L., LAND M., LUCAS S., RICHARDSON P., WHITMAN W.B.,**

- KYRPIDES N.C. (2009):** The Complete genome sequence of *Methanoculleus marisnigri* Romesser et al. 1981 type strain JR1. *Stand Genomic Sci* 1:189-96.
- BAYER E.A., MORAG E., LAMED R. (1994):** The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12(9):379-86. Review.
- BLOM J., ALBAUM S.P., DOPPMEIER D., PÜHLER A., VORHÖLTER F.J., ZAKRZEWSKI M., GOESMANN A. (2009):** EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics.* 10:154.
- BROWN S.D., NAGARAJU S., UTTURKAR S., DE TISSERA S., SEGOVIA S., MITCHELL W., LAND M.L., DASSANAYAKE A., KÖPKE M. (2014):** Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant *Clostridia*. *Biotechnol. Biofuels.* 7:40.
- CADILLO-QUIROZ H., BRAUER S.L., GOODSON N., YAVITT J.B., ZINDER S.H (2014):** *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1473-1480.
- CARVER T., BERRIMAN M., TIVEY A., PATEL C., BÖHME U., BARRELL B.G., PARKHILL J., RAJANDREAM M.A. (2008):** Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics.* 24(23):2672-6.
- CHO E., PARK S.N., SHIN Y., LIM Y.K., PAEK J., KIM H.K., HWANG C.H., JO E., JIN D., CHANG Y.H., KOOK J.K. (2015):** *Peptoniphilus mikwangii* sp. nov., isolated from a clinical specimen of human origin. *Curr. Microbiol.* 70: 260-266.
- COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM S.A., MCGARRELL D.M., GARRITY G.M., TIEDJE J.M. (2005):** The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33(Database issue):D294-6.
- COMBET-BLANC Y., OLLIVIER B., STREICHER C., PATEL B.K., DWIVEDI P.P., POT B., PRENSIER G., GARCIA J.L. (1995):** *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 45(1):9-16.
- DOI R.H. (2008):** Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and noncellulosome producers. *Ann. N. Y. Acad. Scis.* 1125:267-79.
- GORDON D., ABAJIAN C., GREEN P. (1998):** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8(3):195-202.
- GOSALBES M.J., DURBAN A., PIGNATELLI M., ABELLAN J.J., JIMENEZ-HERNANDEZ N., PEREZ-COBAS A.E., LATORRE A., MOYA A. (2011):** Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*, 6: e17447.
- GUTIERREZ G. (2012):** Draft genome sequence of *Methanobacterium formicicum* DSM 3637, an Archaeobacterium isolated from the methane producer amoeba *Pelomyxa palustris*. *J. Bacteriol.* 194:6967-6968.
- HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2015):** Complete genome sequence of the novel *Porphyromonadaceae* bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *J Biotechnol.* 193:34-6.
- HAHNKE S., WIBBERG D., TOMAZETTO G., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2014):** Whole genome sequence of *Clostridium bornimense* strain M2/40 isolated from a lab-scale mesophilic two-phase biogas reactor digesting maize silage and wheat straw. *J Biotechnol.* 184:199-200.
- HAHNKE S., STRIESOW J., ELVERT M., MOLLAR X.P., KLOCKE M. (2014a):** *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64(Pt 8):2792-7.

- JAENICKE S., ALBAUM S.P., LINKE B., STOYE J., GOESMANN A.** (in Vorbereitung): Flexible metagenome analysis using the MGX framework.
- JAENICKE S., ANDER C., BEKEL T., BISDORF R., DRÖGE M., GARTEMANN K.H., JÜNEMANN S., KAISER O., KRAUSE L., TILLE F., ZAKRZEWSKI M., PÜHLER A., SCHLÜTER A., GOESMANN A.** (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One*. 6:e14519.
- JUTURU V., WU J.C.** (2014): Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev*. 33:188-203.
- KELLY W.J., LEAHY S.C., LI D., PERRY R., LAMBIE S.C., ATTWOOD G.T., ALTERMANN E.** (2014): The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanobacterium formicicum* BRM9. *Stand Genomic Sci*. 9:15.
- KOECK D.E., WIBBERG D., KOELLMEIER T., BLOM J., JAENICKE S., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A.** (2013): Draft genome sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation. *J Biotechnol*. 168(1):62-3.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A.** (2014): Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol*. 188:136-7.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., LIEBL W., SCHLÜTER A.** (2014a): First draft genome sequence of the amyolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol*. 2014 Dec 20;192 Pt A:154-5.
- KOECK D.E., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A.** (2015): Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55(T), a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *J Biotechnol*. 214:59-60.
- KOECK D., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A.** (in Vorbereitung): Draft genome sequence of *Herbinix* sp. SD1D, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor.
- KOECK D., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., ZVERLOV V.V., LIEBL W., PÜHLER A., SCHWARZ W.H., SCHLÜTER A.** (in Vorbereitung): Draft genome sequence of *Propionispora* sp. 2/2 37, a new mesophilic xylan degrading bacterium isolated from a mesophilic biogas reactor.
- KRAUSE L., DIAZ N.N., EDWARDS R.A., GARTEMANN K.H., KRÖMEKE H., NEUWEGER H., PÜHLER A., RUNTE K.J., SCHLÜTER A., STOYE J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., GOESMANN A.** (2008): Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol*. 136(1-2):91-101.
- KRIVUSHIN K.V., SHCHERBAKOVA V.A., PETROVSKAYA L.E., RIVKINA E.M.** (2010): *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 60, 455-459.
- LEBUHN M., HANREICH A., KLOCKE M., SCHLÜTER A., BAUER C., PÉREZ C.M.** (2014): Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe*. 29:10-21.
- LIEN T., MADSEN M., RAINEY F.A., BIRKELAND N.K.** (1998): *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. *Int J Syst Bacteriol*. 48(3):1007-13.
- LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FÖRSTER W., BRETTSCHE I., GERBER S., GINHART A.W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KÖNIG A., LISS T., LÜSSMANN R., MAY M., NONHOFF B.,**

- REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A., SCHLEIFER K.H. (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32(4):1363-71.
- MAEDER D.L., ANDERSON I., BRETTIN T.S., BRUCE D.C., GILNA P., HAN C.S., LAPIDUS A., METCALF W.W., SAUNDERS E., TAPIA R., SOWERS K.R. (2006): The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *J Bacteriol.* 188(22):7922-31.
- MAGOČ T., SALZBERG S.L. (2011): FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 27(21):2957-63.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., EIKMEYER F.G., SEFFNER A., BOELTER J., SZCZEPANOWSKI R., BLOM J., JAENICKE S., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2012): Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), isolated from a sewage sludge digester. *J Bacteriol.* 194(19):5487-8.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., CIBIS K., EIKMEYER F.G., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2013): Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* 168(4):734-6.
- MAUS I., STANTSCHIEFF R., WIBBERG D., STOLZE Y., WINKLER A., PÜHLER A., KÖNIG H., SCHLÜTER A. (2014): Complete genome sequence of the methanogenic neotype strain *Methanobacterium formicicum* MF(T). *J Biotechnol.* 192 Pt A:40-1.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., STOLZE Y., BLOM J., EIKMEYER F.G., FRACOWIAK J., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2014a): Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *J Biotechnol.* 201:43-53.
- MAUS I., CIBIS K.G., BREMGES A., STOLZE Y., WIBBERG D., TOMAZETTO G., BLOM J., SCZYRBA A., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2016): Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *J Biotechnol.* 232:50-60.
- MAUS I., CIBIS K.G., WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015): Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* 203:17-8.
- MEEHAN C.J., BEIKO R.G. (2014): A phylogenomic view of ecological specialization in the *Lachnospiraceae*, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol. Evol.*, 6: 703-713.
- MEYER F., GOESMANN A., MCHARDY A.C., BARTELS D., BEKEL T., CLAUSEN J., KALINOWSKI J., LINKE B., RUPP O., GIEGERICH R., PÜHLER A. (2003): GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.*, 31:2187-2195.
- MONGODIN E.F., HANCE I.R., DEBOY R.T., GILL S.R., DAUGHERTY S., HUBER R., FRASER C.M., STETTER K., NELSON K.E. (2005): Gene transfer and genome plasticity in *Thermotoga maritima*, a model hyperthermophilic species. *J Bacteriol.* 187(14): 4935-44.
- NÖLLING J., BRETON G., OMELCHENKO M.V., MAKAROVA K.S., ZENG Q., GIBSON R., LEE H.M., DUBOIS J., QIU D., HITTI J., 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*. *J Bacteriol.* 183(16):4823-38.
- PRUESSE E., PEPLIES J., GLÖCKNER F.O. (2012): SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28, 1823-1829.

- QUAST C., PRUESSE E., YILMAZ P., GERKEN J., SCHWEER T., YARZA P., PEPLIES J., GLÖCKNER F.O. (2013):** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.
- RAGSDALE S.W. (2008):** Enzymology of the Wood–Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Enzymology*, 1125: 129-136.
- RITARI J., KOSKINEN K., HULTMAN J., KUROLA J.M., KYMÄLÄINEN M., ROMANTSCHUK M., PAULIN L., AUVINEN P. (2012):** Molecular analysis of meso- and thermophilic microbiota associated with anaerobic biowaste degradation. *BMC Microbiol.* 12: 121.
- SABATHÉ F., SOUCAILLE P. (2003):** Characterization of the CipA scaffolding protein and *in vivo* production of a minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* 185(3):1092-6.
- SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N.N., DONDRUP M., EICHENLAUB R., GARTEMANN K.H., KRAHN I., KRAUSE L., KRÖMEKE H., KRUSE O., MUSSGNUG J.H., NEUWEGER H., NIEHAUS K., PÜHLER A., RUNTE K.J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., TILKER A., VIEHÖVER P., GOESMANN A. (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol.* 136(1-2):77-90.
- SCHWARZ W.H. (2001):** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(5-6):634-49.
- SHCHERBAKOVA V., RIVKINA E., PECHERITSYNA S., LAURINAVISHIUS K., SUZINA N., GILICHINSKY D. (2011):** *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:144-147.
- SMITH S.P., BAYER E.A. (2013):** Insights into cellulosome assembly and dynamics: from dissection to reconstruction of the supramolecular enzyme complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 686–94.
- STOLZE Y., ZAKRZEWSKI M., MAUS I., EIKMEYER F., JAENICKE S., ROTTMANN N., SIEBNER C., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015):** Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol Biofuels.* 8:14.
- TAMARU Y., KARITA S., IBRAHIM A., CHAN H., DOI R.H. (2000):** A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J. Bacteriology* 182:5906-5910.
- TATUSOV R.L., GALPERIN M.Y., NATALE D.A., KOONIN E.V. (2000):** The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28: 33-36.
- TATUSOV R.L., NATALE D.A., GARKAVTSEV I.V., TATUSOVA T.A., SHANKAVARAM U.T., RAO B.S., KIRYUTIN B., GALPERIN M.Y., FEDOROVA N.D., KOONIN E.V. (2001):** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29: 22-28.
- THAUER R.K., KASTER A.K., SEEDORF H., BUCKEL W., HEDDERICH R. (2008):** Methanogenic *Archaea*: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:579-91.
- TOMAZETTO G., HAHNKE S., KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., PÜHLER A., KLOCKE M., SCHLÜTER A. (2015):** Complete genome analysis of *Clostridium bornimense* strain M2/40T: A ne acidogenic *Clostridium* species isolated from a mesophilic two-phase laboratory-scale biogas reactor. *J Biotechnol.* doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.001. [Epub ahead of print].
- TOMAZETTO G., HAHNKE S., MAUS I., WIBBERG D., PÜHLER A., SCHLÜTER A., KLOCKE M. (2014):** Complete genome sequence of *Peptoniphilus* sp. strain ING2-D1G isolated from a mesophilic lab-scale completely stirred tank reactor utilizing maize silage in co-digestion with pig and cattle manure for biomethanation. *J Biotechnol.* 192 Pt A:59-61.

- TRACY B.P., JONES S.W., FAST A.G., INDURTHI D.C., PAPOUTSAKIS E.T. (2012):** *Clostridia*: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr Opin Biotechnol.* 23(3):364-81.
- ULGER-TOPRAK N., LAWSON P.A., SUMMANEN P., O'NEAL L., FINEGOLD S.M. (2012):** *Peptoniphilus duerdenii* sp. nov. and *Peptoniphilus koenoeneniae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2336–2341.
- WEISS A., JEROME V., FREITAG R., MAYER H.K. (2008):** Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(1):163-73.
- YIN Y.B., MAO X.Z., YANG J.C., CHEN X., MAO F.L., XU Y. (2012):** dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 40: W445-451.
- ZAKRZEWSKI M., GOESMANN A., JAENICKE S., JÜNEMANN S., EIKMEYER F.G., SZCZEPANOWSKI R., ALSOUD W.A., SØRENSEN S., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2012):** Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput meta-transcriptome sequencing. *J Biotechnol.* 158(4):248-58.
- ZHANG K., CHEN X., SCHWARZ W.H., LI F. (2014):** Synergism of glycoside hydrolase secretomes from two thermophilic bacteria cocultivated on lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 2592-2601.
- ZHOU Y., LIANG Y., LYNCH K.H., DENNIS J.J., WISHART D.S. (2011):** PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(Web Server issue): W347-52.



# Schlussbericht

## zum Verbundvorhaben

Thema: **Etablierung eines core-Mikrobioms für Biogasanlagen**  
**Teilvorhaben 3: Acido- und acetogene Bakterien**

Förderkennzeichen: 22006812

Zuwendungsempfänger: Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Saarstraße 21  
55099 Mainz

Ausführende Stelle:  
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung  
Becherweg 15  
55099 Mainz

Berichtverfasser: Dipl. Biol. Katharina Gabriela Cibis  
Prof. Dr. Helmut König

Kontakt: Prof. Dr. Helmut König  
Tel.: 06131/39-24634, Fax: 06131/39-22695  
hkoenig@uni-mainz.de

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Ziele.....</b>	<b>173</b>
<b>I.1</b>	<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>173</b>
I.1.1	Gesamtziel des Verbundvorhabens .....	173
I.1.2	Aufgabe der Johannes Gutenberg-Universität im Verbundprojekt .....	174
<b>I.2</b>	<b>Stand der Technik.....</b>	<b>175</b>
<b>I.3</b>	<b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....</b>	<b>175</b>
<b>II</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>176</b>
<b>II.1</b>	<b>Erzielte Ergebnisse .....</b>	<b>176</b>
II.1.1	Arbeitspaket I: Diversität hydrolytischer Bakterien aus Biogasanlagen .....	176
II.1.2	Arbeitspaket II: Mikrobielle Diversität in Biogasanlagen.....	177
II.1.2.1	Mikrobielle Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure.....	177
II.1.2.2	Untersuchte Biogasanlagen.....	183
II.1.2.3	Isolierung von Bakterien aus Fermentersubstrat .....	183
II.1.2.4	Methoden zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien .....	186
II.1.2.5	Nachweis von Säuren.....	190
II.1.2.6	Isolate aus Fermentersubstrat .....	191
II.1.2.7	Isolierung der DNA aus Bakterienisolaten und Reaktorsubstrat .....	196
II.1.2.8	Amplifizierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens .....	196
II.1.2.9	Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte .....	197
II.1.2.10	Restriktionsverdau .....	198
II.1.2.11	Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR .....	199
II.1.2.12	Identifizierung der Isolate.....	201
II.1.2.13	Entwicklung Isolat-spezifischer Primer.....	209
II.1.2.14	Titerbestimmung der Isolate in Biogasanlagen mittels qPCR .....	214
II.1.2.15	Genomannotation von Isolat <i>Defuvitoga tunisiensis</i> L3 .....	221
II.1.2.16	Analyse ausgewählter Isolate mittels MALDI-TOF.....	227
II.1.2.17	Physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate .....	227
<b>II.2</b>	<b>Verwertung .....</b>	<b>240</b>
<b>II.3</b>	<b>Erkenntnisse von Dritten.....</b>	<b>241</b>
<b>II.4</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>242</b>
<b>III</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>243</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absatz
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Biogasanlage
Bp	Basenpaare
ca.	Circa
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (engl. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC-Nummern	Numerisches Klassifikationssystem für Enzyme (engl. Enzyme Commission Number)
FP	Flüssigpumpe
G	Gerste
GS	Grassilage
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
LRW	Langachsrührwerk
MS	Maissilage
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RG	Rindergülle
RM	Fester Rindermist
SAPD-PCR	Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR
SG	Schweinegülle
<i>T.</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i>

<i>Tepid.</i>	<i>Tepidanaerobacter</i>
Tm	Schmelztemperatur
TMRW	Tauchmotorrührwerk
TS	Trockensubstanz
TUM	Technische Universität München
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	Vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	Zum Beispiel

## I Ziele

### I.1 Aufgabenstellung

#### I.1.1 Gesamtziel des Verbundvorhabens

Ziel des Verbundvorhabens war die Entwicklung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen. Am Verbundprojekt beteiligt waren das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., die Universität Bielefeld, die Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, die Technische Universität München, das RIPAC LABOR GmbH (Potsdam-Golm) sowie die Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Da in der Bundesrepublik Deutschland seit Inkrafttreten des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes im Jahr 2000 die Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien stark zugenommen hat, sind Biogasanlagen ein wichtiges Forschungsgebiet geworden, um den Prozess der Energiegewinnung effizienter zu machen.

In Biogasanlagen existiert eine komplexe und dynamische Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen, welche den anaeroben Abbau von organischer Biomasse zu Biogas bewirkt. Dieser Prozess kann in vier Stufen eingeteilt werden: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Zunächst werden in der Hydrolyse komplexe Ausgangssubstrate wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette in einfache organische Verbindungen gespalten. Die gebildeten Zwischenprodukte werden in der Acidogenese durch säurebildende Bakterien zu niederen Säuren (Formiat, Acetat, Propionat und Butyrat) sowie zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut. Es können auch Milchsäure und Alkohole gebildet werden. Bei der Acetogenese entstehen Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Im letzten Schritt des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, werden Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Methan, Wasser und Kohlenstoffdioxid umgewandelt (WEILAND 2010, MERLIN CHRISTY *et al.* 2014))

Für eine technologische Optimierung der Biogasproduktion ist die Kenntnis über die Mikroflora in Biogasanlagen notwendig. Die Mehrheit der Mikroorganismen in Biogasanlagen ist bislang wissenschaftlich noch nicht ausreichend untersucht. Zwar ist die mikrobielle Diversität von Biogasanlagen mit Hilfe von molekularen Methoden bereits gut erforscht, so haben jedoch beispielsweise Metagenom-Analysen gezeigt, dass viele Mikroorganismen noch nicht klassifiziert oder unbekannt sind (KRÖBER *et al.* 2009). Da es wegen der geringen Anzahl von Isolaten aus Biogasanlagen auch nur wenig Referenzdaten gibt, ist es erforderlich, Mikroorganismen aller vier Abbaustufen zu isolieren.

In diesem Verbundprojekt sollten gemäß der Vorhabenbeschreibung folgende Arbeitsbereiche durchgeführt werden:

- 1) Auswahl und Beprobung repräsentativer Biogasanlagen
- 2) Isolierung von cellulolytischen, acidogenen, acetogenen und Stickstoffumsetzenden Bakterien sowie von methanogenen Archaea

- 3) Entwicklung von neuen Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren
- 4) Genomsequenzierung der Isolate und deren bioinformatische Auswertung
- 5) Aufbau einer Referenzdatenbank anhand bereits vorhandener Metagenomdaten
- 6) Aufbau einer Referenzdatenbank für den Kernbestand an Mikroorganismen und Abgleich der Daten
- 7) Entwicklung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS

Von den beteiligten Verbundpartnern wurden am Auftaktsymposium des Verbundvorhabens BIOGAS-CORE am 05.11.2013 zwei Arbeitspakete beschlossen, welche im Folgenden aufgeführt werden.

#### Arbeitspaket I: Diversität hydrolytischer Bakterien aus Biogasanlagen

In diesem Arbeitspaket sollte die genetische Variation des Bakteriums *Clostridium thermocellum* in verschiedenen Biogasanlagen ermittelt werden. Dieses Bakterium hat eine wichtige Bedeutung in der Hydrolyse von Biomasse. Jeder Teilnehmer des Verbundprojekts sollte Praxisbiogasanlagen auswählen, welche eine konstante Fütterung mit Biomasse und einen möglichst stabilen Fermentationsprozess aufwiesen sowie mit nachwachsenden Rohstoffen betrieben wurden. Fermenterproben der ausgewählten Biogasanlagen sollten an die Verbundpartner der Technischen Universität München (TUM) für die Isolierung von *Clostridium thermocellum* übergeben werden. Anschließend sollten die Isolate mittels MALDI-TOF MS durch das RIPAC-Labor analysiert und die Genome von CeBiTec in Bielefeld untersucht werden.

#### Arbeitspaket II: Mikrobielle Diversität in Biogasanlagen

Ziel dieses Arbeitspakts war die Isolierung von Mikroorganismen der vier anaeroben Abbaustufen sowohl aus einer gemeinsam beprobten thermophilen Biogasanlage in Viersen als auch von Biogasanlagen in der Nähe der jeweiligen Projektpartner.

### 1.1.2 Aufgabe der Johannes Gutenberg-Universität im Verbundprojekt

#### Arbeitspaket I: Diversität hydrolytischer Bakterien aus Biogasanlagen

Zur Bearbeitung des Arbeitspakets I sollten von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz geeignete Biogasanlagen ausgewählt (siehe Abschnitt II.1.1) und Fermenterproben an die TUM übergeben werden.

#### Arbeitspaket II: Mikrobielle Diversität in einem Modellreaktor

In diesem Arbeitspaket bestand die Aufgabe der Johannes Gutenberg-Universität Mainz darin, acido- und acetogene Bakterien aus Biogasanlagen (drei mesophile Biogasanlagen, eine thermophile Biogasanlage sowie zwei Hochdruck-Biogas-Laborfermenter) zu isolieren und mit Hilfe von klassischen und molekularen Methoden zu identifizieren.

Weiterhin sollten die physiologischen Leistungen der gewonnenen Isolate bestimmt werden. Der Fokus der Isolierungsarbeiten der Johannes Gutenberg-Universität sollte hierbei auf Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäure-bildenden Bakterien liegen, um eine thematische Überschneidung mit den Isolierungsarbeiten der Technischen Universität München und der anderen Projektteilnehmer zu vermeiden. Dies war erforderlich, da die Hydrolyse nicht genau von der Acidogenese getrennt werden kann.

## I.2 Stand der Technik

In den vergangenen Jahren gab es viele Studien mit Laborfermentern und Biogasanlagen, wobei hier hauptsächlich der Fokus auf kultivierungsunabhängigen Methoden lag. Zum Einsatz kamen hierbei Methoden wie 454-Pyrosequenzierung, Klonbibliotheken, DGGE (Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese)-Analysen oder Metaproteomanalysen (SCHLÜTER *et al.* 2008, KRÖBER *et al.* 2009, HANREICH *et al.* 2013, RÖSKE *et al.* 2014). Zusätzlich gab es Untersuchungen mit Laborfermentern, welche ein Inokulum einer Biogasanlage enthielten. Hierbei wurde der Einfluss der jeweiligen Parameter auf die mikrobielle Diversität hin untersucht. (WAGNER *et al.* 2013). In molekularbiologischen Untersuchungen wurde immer wieder deutlich, dass viele Organismen in Biogasanlagen noch unbekannt sind, da viele Gensequenzen keinen Referenzorganismen zugeordnet werden konnten (KRAUSE *et al.* 2008). Aus diesem Grund wird die mikrobielle Diversität in Biogasanlagen auch oft als „black box“ bezeichnet (COLLINS *et al.* 2006). Bisher existieren nur wenig kultivierungsabhängige Studien über die gezielte Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasanlagen. In den vergangenen Jahren gab es verschiedene Veröffentlichungen zu Isolaten aus Biogasanlagen oder Laborfermentern. Hierbei sind beispielsweise die Arbeiten von KOECK *et al.* (2014) zur Isolierung von Stämmen der Art *Clostridium thermocellum*, von HAHNKE *et al.* (2014) über die Isolierung der neuen Art *Clostridium bornimense* sowie STANTSCHIEFF *et al.* (2014) zur Isolierung von methanogenen Archaeen aus Biogasanlagen oder Laborfermentern zu erwähnen.

Über Untersuchungen zur gezielten Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäure-bildenden Bakterien wurde nicht berichtet, obwohl es sich bei diesen Säuren um wichtige Produkte der Acidogenese handelt. Essigsäure ist ein wichtiges Substrat für die Methanogenese. Dagegen kann es durch eine Anreicherung von Propionsäure und Buttersäure zu einer Ansäuerung des Fermenters kommen, welche zu einer Hemmung der am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismen führen kann. Zu einer Ansäuerung des Fermenters kann es beispielsweise durch eine Überladung mit Substraten kommen (AHRING *et al.* 1995).

## I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Verbundvorhabens kam es zur Zusammenarbeit mit anderen Verbundpartnern. Zur Bearbeitung des Arbeitspaketes I (Diversität hydrolytischer Bakterien aus

Biogasanlagen) wurden geeignete Biogasanlagen ausgewählt und Fermenterproben an die TUM übergeben. Weiterhin wurden Isolate der untersuchten Biogasanlagen zur Analyse mittels MALDI-TOF MS an das RIPAC-Labor übergeben. In Kooperation mit dem CeBiTec (Centrum für Biotechnologie) der Universität Bielefeld wurde das Gesamtgenom des Isolates *Defluviitoga tunisiensis* L3 sequenziert. Anschließend wurde in Zusammenarbeit mit Irena Maus (CeBiTec, Universität Bielefeld) das Genom manuell annotiert und ausgewertet.

## II Ergebnisse

### II.1 Erzielte Ergebnisse

#### II.1.1 Arbeitspaket I: Diversität hydrolytischer Bakterien aus Biogasanlagen

Für die Bearbeitung des Arbeitspakets I wurden drei landwirtschaftliche mesophile Biogasanlagen (BGA) ausgewählt: BGA Glahn, BGA Gebel und BGA Wagner. **Tabelle 1** gibt eine Übersicht über die Biogasanlagen und deren Betriebsparameter. 50 ml der jeweiligen Fermenterproben wurden in 100 ml Transfusionsflaschen bis zur Übergabe an die TUM am 07.01.2013 bei 4°C gelagert.

**Tabelle 1:** Anlagenparameter der beprobten Biogasanlagen.

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

<sup>1</sup> FP = Flüssigpumpe; LRW = Langachsührwerk; TMRW = Tauchmotorührwerk; NV = keine Angaben verfügbar

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

<sup>3</sup> Nachgärer thermophil

## II.1.2 Arbeitspaket II: Mikrobielle Diversität in Biogasanlagen

Für eine umfassende Bearbeitung des Arbeitspakets II wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt, um einen Überblick über potentielle Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäure-bildende Mikroorganismen und ihre Stoffwechselwege zu bekommen. Die Ergebnisse dieser Literaturrecherche sind in Abschnitt II.1.2.1 aufgeführt.

### II.1.2.1 Mikrobielle Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure

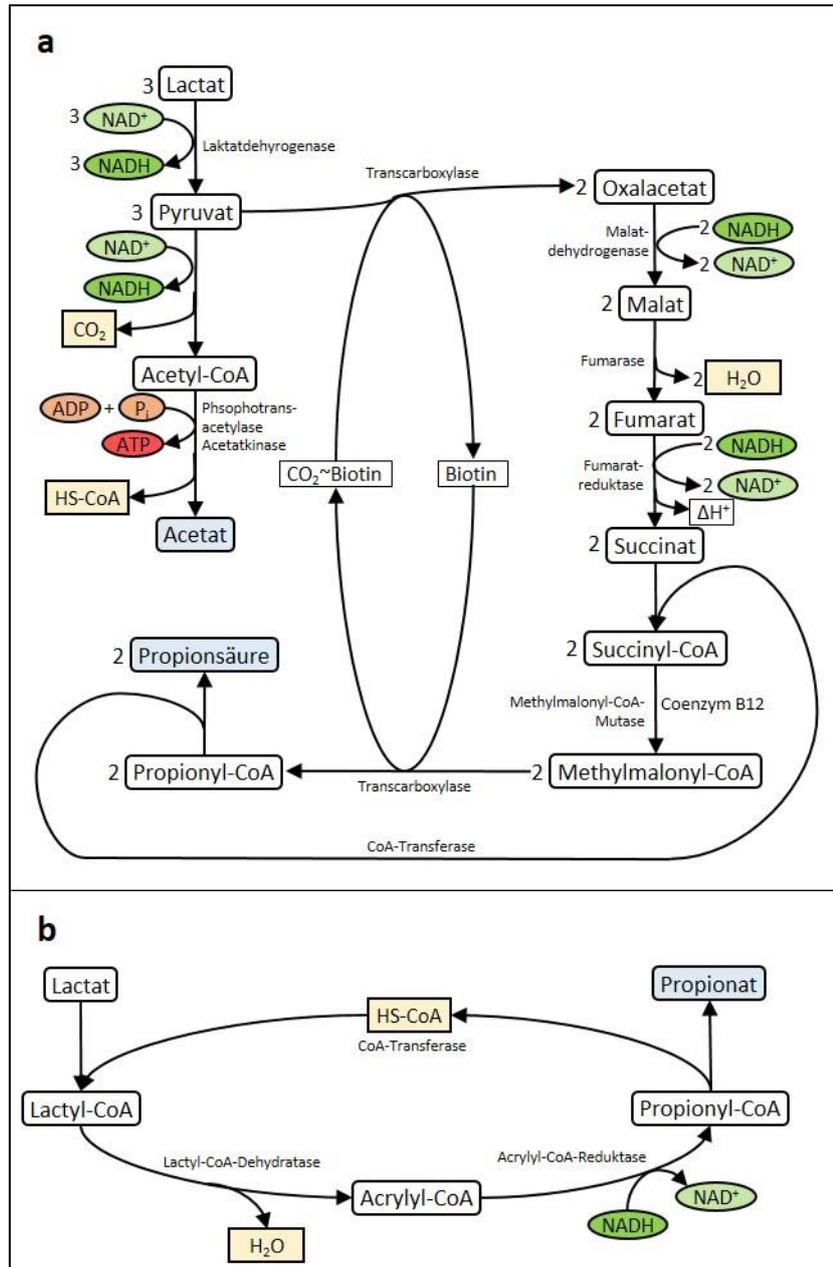
Für die Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure und Buttersäure-bildenden Bakterien ist eine Kenntnis von Substraten wichtig, aus welchen die genannten Säuren gebildet werden können. Mengenmäßig kommen Essigsäure und Propionsäure am häufigsten in Biogasanlagen vor. Hierbei sollte die Konzentration von Essigsäure unterhalb von 3000 mg/l liegen, die von Propionsäure unterhalb von 1000 mg/l und die von iso-Buttersäure unterhalb von 500 mg/l. Optimal ist das Verhältnis 2:1 zwischen Essigsäure und Propionsäure (KAISER *et al.* 2007).

Für die anaerobe Bildung von Propionsäure sind drei Stoffwechselwege bekannt: Methylmalonyl-CoA-Weg (**Abbildung 1a**), Acrylyl-CoA-Weg (**Abbildung 1b**) und Succinat-Decarboxylierung.

Beim Methylmalonyl-CoA-Weg werden 3 Mol Laktat zunächst zu 3 Mol Pyruvat oxidiert. Ein Mol Pyruvat wird zu Acetat und CO<sub>2</sub> weiteroxidiert, wobei es zur Energiegewinnung durch die Bildung von ATP kommt. Die Reduktion von 2 Mol Laktat zu 2 Mol Propionsäure dient der Reoxidation der anfallenden Reduktionsäquivalente aus der Oxidation von Laktat zu Acetat. Hierbei werden 2 Mol Pyruvat durch eine Biotin-enthaltene Transcarboxylase zu 2 Mol Oxalacetat carboxyliert. Ein charakteristisches Zwischenprodukt ist Methylmalonyl-CoA, dessen freie Carboxygruppe auf Pyruvat übertragen wird. Als Endprodukt dieses reduktiven Zweiges entsteht Propionsäure (FUCHS 2007). Substrate, welche über diesen Weg abgebaut werden, sind beispielsweise Glucose, Glycerin, Laktat, Ethanol und Glutamat. Beispielorganismen, welche diese Substrate zu Propionsäure umsetzen können sind in den **Tabellen 2 bis 6** zusammengefasst.

Ein weiterer Stoffwechselweg, bei welchem Propionsäure gebildet wird, ist der Acrylyl-CoA-Weg (**Abbildung 1b**). Laktat wird bei diesem Weg durch eine CoA-Transferase zu Laktyl-CoA und weiter durch Wasserabspaltung zu Acrylyl-CoA umgesetzt. Propionyl-CoA entsteht anschließend durch Reduktion der Doppelbindung (FUCHS 2007). Die Substrate Laktat, Ethanol und Alanin können z.B. über den Acrylyl-CoA-Weg verwertet werden.

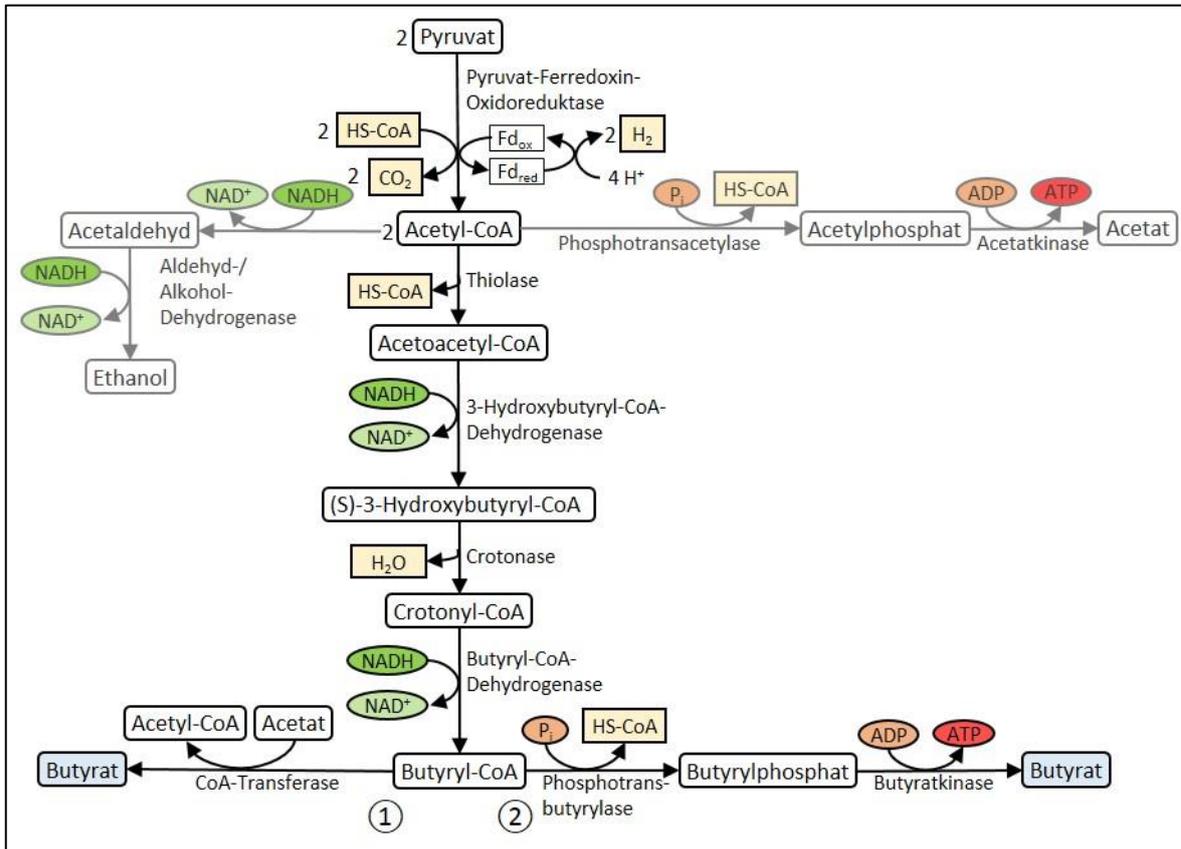
Beim dritten Propionsäure-Bildungsweg, der Succinat-Decarboxylierung, wird Succinat unter Bildung von CO<sub>2</sub> zu Propionsäure umgesetzt. Das Schlüsselenzym dieses Weges ist eine membrangebundene Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, welches bei der Energiekonservierung eine wichtige Rolle spielt (DIMROTH & SCHINK 1998).



**Abbildung 1:** Stoffwechselwege zur Bildung von Propionsäure. (a) Methylmalonyl-CoA-Weg, (b) Acrylyl-CoA-Weg. Verändert nach FUCHS (2007).

Die Buttersäuregärung wird typischerweise von grampositiven anaeroben Endosporenbildnern durchgeführt, wobei saccharolytische und peptolytische Buttersäuregärer unterschieden werden (FUCHS 2007). Kohlenhydrate (z. B. Glucose) werden zunächst über die Glycolyse zu Pyruvat oxidiert, welches anschließend durch eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> weiteroxidiert wird. In nachfolgenden Schritten werden in der Buttersäuregärung die Reduktionsäquivalente der Glycolyse regeneriert. **Abbildung 2** zeigt einen schematischen Überblick über die Buttersäuregärung. Das hierbei entstehende Butyryl-CoA kann durch eine CoA-Transferase zu Butyrat umgesetzt werden, wobei der CoA-Thioester auf Acetat übertragen wird (**Abbildung 2** ①). *Roseburia hominis* ist ein Beispielorganismus, welcher diese Reaktion

durchführt (LOUIS *et al.* 2007). Buttersäure kann auf der anderen Seite auch durch die Aktivität der Enzyme Phosphotransbutyrylase und Butyratkinase gebildet werden, wie es für *Clostridium acetobutylicum* beschrieben ist (**Abbildung 2** ②; LOUIS *et al.* 2004). Neben der Bildung von Buttersäure können während der Buttersäuregärung auch geringe Mengen an Essigsäure, Ethanol oder Milchsäure gebildet werden.



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

Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure können anaerob aus Zuckern, Säuren, Alkoholen, aromatischen Verbindungen, Polyaminen, CO<sub>2</sub> und Aminosäuren gebildet werden. **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die Bildung der drei Säuren aus Glucose.

**Tabelle 2:** Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Glucose.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Glucose	Propionsäure + Essigsäure	<i>Propionibacterium</i> sp. <sup>1</sup> , <i>Arachnia propionica</i> <sup>1</sup> , <i>Bacteroides fragilis</i> <sup>1</sup> , <i>Selenomonas ruminantium</i> <sup>1</sup>	PINE & GEORGE 1969, PAYNTER & ELSDEN 1970, ALLEN & LINEHAN 1977, MACY <i>et al.</i> 1978
Glucose	Buttersäure, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	GOTTSCHALK 1979
Glucose	Essigsäure, Milchsäure	<i>Bifidobacterium</i> sp.	GOTTSCHALK 1979

<sup>1</sup>Propionsäurebildung über den Methylmalonyl-CoA-Weg

Glucose kann in der Propionsäuregärung zu Propionsäure und Essigsäure vergoren werden (z. B. von Vertretern der Gattung *Propionibacterium*). Des Weiteren kann Glucose bei der Buttersäuregärung zu Buttersäure, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> umgesetzt werden. Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* und *Fusobacterium* führen diese Reaktion durch. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Essigsäure und Milchsäure aus Glucose durch *Bifidobacterium* sp.

In **Tabelle 3** sind Bakterien zusammengefasst, welche Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure aus Alkoholen bilden können. Als Substrat kann hierbei Glycerin oder Ethanol in Kombination mit CO<sub>2</sub> oder Essigsäure dienen. Diese Reaktionen werden beispielsweise von Vertretern der Gattung *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Pelobacter* oder *Desulfobulbus* durchgeführt.

**Tabelle 3:** Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Alkoholen.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Glycerin	Propionsäure	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> <sup>1</sup> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Clostridium propionicum</i>	Barbirato <i>et al.</i> 1997
Ethanol + CO <sub>2</sub>	Propionsäure + Essigsäure	<i>Pelobacter propionicus</i> <sup>1</sup> , <i>Desulfobulbus propionicus</i> <sup>1</sup> , <i>Clostridium neopropionicum</i> <sup>2</sup>	STAMS <i>et al.</i> 1984, SCHINK <i>et al.</i> 1987, THOLOZAN <i>et al.</i> 1992
Ethanol + Essigsäure	Buttersäure + Caproat	<i>Clostridium kluveri</i>	SEEDORF <i>et al.</i> 2008

Propionsäurebildung durch: <sup>1</sup> Methylmalonyl-CoA-Weg, <sup>2</sup> Acrylyl-CoA-Weg

Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure können auch aus Säuren gebildet werden, welche Zwischen- oder Endprodukte anderer Stoffwechselreaktionen sein können. Beispiele für solche Säuren sind Succinat, Laktat, Acetat, Crotonsäure, Citrat, Malonat oder Urat. **Tabelle 4** zeigt, welche Organismen in der Lage sind, die letztgenannten Säuren

ren umzusetzen. Für die Fermentation von Succinat zu Propionsäure können Vertreter der Gattungen *Propionigenium*, *Selenomonas* und *Sporomusa* genannt werden und für die Fermentation von Laktat zu Propionsäure *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Propionispira*, *Pelobacter*, *Clostridium* oder *Megasphaera*. Milchsäurebakterien, *Eubacterium hallii* oder *Anaerostipes caccae* können Milchsäure zu Buttersäure vergären.

**Tabelle 4:** Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Säuren.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Succinat	Propionsäure	<i>Propionigenium modestum</i> , <i>Propionigenium maris</i> , <i>Selenomonas acidaminovorans</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Sporomusa malonica</i>	SCHEIFINGER & WOLIN 1973, SCHINK & PFENNIG 1982, DEHNING <i>et al.</i> 1989, GUANGSHENG <i>et al.</i> 1992, JANSSEN & LIESACK 1995
Laktat	Propionsäure, Essigsäure, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> <sup>1</sup> , <i>Veillonella parvula</i> <sup>1</sup> , <i>Propionispira arboris</i> <sup>1</sup> , <i>Pelobacter propionicus</i> <sup>1</sup> , <i>Clostridium propionicum</i> <sup>2</sup> , <i>Megasphaera elsdenii</i> <sup>2</sup> , <i>Clostridium homopropionicum</i> <sup>2</sup>	GOTTSCHALK 1979, SCHINK <i>et al.</i> 1982, SCHINK 1984, SEELIGER <i>et al.</i> 2002
Laktat	Buttersäure	Milchsäurebakterien, <i>Eubacterium hallii</i> , <i>Anaerostipes caccae</i>	DUNCAN <i>et al.</i> 2004
Essigsäure + CO <sub>2</sub>	Propionsäure	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	STAMS <i>et al.</i> 1984, SCHINK <i>et al.</i> 1987
Crotonsäure	Buttersäure + Essigsäure	obligat synthrophe Gärer	FUCHS 2007
Citrat	Essigsäure + Formiat + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Bacteroides</i> sp.	MADIGAN <i>et al.</i> 2001
Malonat	Essigsäure + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Malonomonas rubra</i> , <i>Sporomusa malonica</i>	DEHNING & SCHINK 1989, DEHNING <i>et al.</i> 1989
Urat	Essigsäure	<i>Clostridium acidii-urici</i> , <i>Clostridium cylindrosporium</i>	GOTTSCHALK 1979

Propionsäurebildung durch: <sup>1</sup> Methylmalonyl-CoA-Weg, <sup>2</sup> Acrylyl-CoA-Weg

Aus der aromatischen Verbindung Resorcinol oder dem Polyamin Putrescin kann Propionsäure und Buttersäure entstehen (**Tabelle 5**). *Clostridium aceticum* und *Acetobacterium woodii* können in der homoacetogenen Gärung Essigsäure aus Kohlenstoffdioxid bilden.

**Tabelle 5:** Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Resorcinol, Putrescin oder CO<sub>2</sub>.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Resorcinol	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium</i> sp.	MADIGAN <i>et al.</i> 2001
Putrescin	Buttersäure + Essigsäure	nicht klassifizierte grampositive, nicht sporenbildende Anaerobier	MADIGAN <i>et al.</i> 2001
CO <sub>2</sub>	Essigsäure + H <sub>2</sub> O	<i>Clostridium aceticum</i> , <i>Acetobacterium woodii</i>	GOTTSCHALK 1979, BRAUN <i>et al.</i> 1981

Auch aus Aminosäuren können Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure gebildet werden. In **Tabelle 6** sind die wichtigen Aminosäuren zusammengestellt. Propionsäure kann aus folgenden Aminosäuren gebildet werden: Alanin, Glutamat, Cystein, Methionin, Serin, Glycin, Tyrosin und Threonin. Viele Clostridien können Aminosäuren zu Propionsäure oder Buttersäure vergären.

**Tabelle 6:** Bildung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure aus Aminosäuren.

Substrat	Produkte	Organismen	Literatur
Glutamat	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium tetanomorphum</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Clostridium cochlearium</i> , <i>Clostridium saccarobutyricum</i> , <i>Clostridium microsporium</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Acidaminococcus fermentans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium fusiformis</i>	BUCKEL & BARKER 1974, GOTTSCHALK 1979
Glutamat	Propionsäure + Essigsäure	<i>Selenomonas acidaminophila</i> , <i>Barkeria propionica</i>	Buckel 2001
Lysin	Buttersäure + Essigsäure	<i>Clostridium sticklandii</i> , <i>Clostridium peptidivorans</i>	MECHICHI <i>et al.</i> 2000, FONKNECHTEN <i>et al.</i> 2010
Glycin	Essigsäure + CO <sub>2</sub> + NH <sub>3</sub>	<i>Peptococcus anaerobius</i> , <i>Clostridium thermoaceticum</i> , <i>Clostridium formicoaceticum</i>	GOTTSCHALK 1979
Methionin	Propionsäure	<i>Clostridium peptidivorans</i>	MECHICHI <i>et al.</i> 2000
Alanin	Propionsäure + Essigsäure	<i>Clostridium propionicum</i> <sup>2</sup>	SCHWEIGER & BUCKEL 1984
Threonin	Propionsäure + H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	<i>Clostridium propionicum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Clostridium sticklandii</i>	GOTTSCHALK 1979, FONKNECHTEN <i>et al.</i> 2010

<sup>2</sup> Propionsäurebildung über den Acrylyl-CoA-Weg

### II.1.2.2 Untersuchte Biogasanlagen

Zur Bearbeitung des Arbeitspakets II wurde von allen Verbundpartnern eine Biogasanlage gemeinsam beprobt. Es handelte sich um eine thermophile Anlage (Prozesstemperatur: 54°C), welche als Substrate Mais-Ganzpflanzensilage, festen Rindermist, Gerste und Schweinegülle beinhaltete. Bei dem Fermenter handelte es sich um einen 4Biogas NOVA-Fermenter der Firma 4Biogas, einen zweistufigen Hochleistungsfermenter mit integrierter Hydrolyse in einem Gärraum (Volumen: 110 m<sup>3</sup>). Die Verweilzeit der Substrate war kurz. Sie betrug 21 Tage. Die Anlagenparameter sind in **Tabelle 1** (Abschnitt II.1.1) angegeben.

Von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurden zusätzlich seit dem 13.08.2014 säurebildende Bakterien aus drei weiteren Biogasanlagen isoliert. Hierfür wurden die drei mesophilen Biogasanlagen gewählt, welche auch für das Arbeitspaket I beprobt wurden. Die Anlagenparameter dieser Anlagen sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Seit 15.08.2014 wurden zudem zwei weitere Laborfermenter für die Isolierung von Säurebildenden Bakterien beprobt. Es handelte sich um zwei Hochdruck-Batch-Fermenter der Universität Hohenheim. In diesen Fermentern wurde mit Stickstoff ein Überdruck von 50 bzw. 100 bar eingestellt. Die Fermenter enthielten als Substrat Maissilage und hatten eine Prozesstemperatur von 38°C. Nach 30 Tagen Versuchsdauer wurden Proben für die mikrobielle Analyse den Fermentern entnommen. Die genannten Hochdruck-Biogas-Fermenter wurden für Untersuchungen zur direkten Einspeisung von aufgereinigtem Biogas in das Erdgasnetz entworfen.

### II.1.2.3 Isolierung von Bakterien aus Fermentersubstrat

Für die Isolierung von Bakterien aus Biogasanlagen, welche Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure bilden, musste zunächst ein Nährmedium auf Basis eines Mineralsalzmediums entwickelt sowie verschiedene Methoden zur Anreicherung und Vereinzelung getestet und modifiziert werden. Um geeignete Nährmedien für die Anreicherung und Isolierung der Bakterien herzustellen, wurden die in Abschnitt II.1.2.1 gewonnenen Erkenntnisse durch die Literaturrecherche hinzugezogen, aus welchen Substraten Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure gebildet werden können. Als Grundlage wurde ein Nährmedium auf Basis eines Mineralsalzmediums verwendet, welches nach dem DSMZ-Medium 287 (DSMZ 2007) modifiziert wurde. Durch das Hinzufügen jeweils einer spezifischen Kohlenstoffquelle (C-Quelle) sollte schon in den Anreicherungskulturen eine gewisse Selektion erreicht werden. Aus den Substraten, die als Kohlenstoffquelle in Betracht kamen (vgl. **Tabellen 2 bis 6**), wurden sechs verschiedene Substrate für die Herstellung von Nährmedien ausgewählt. Als Kohlenstoffquellen dienten Laktat, Succinat, eine Aminosäure-Mischung aus sechs verschiedenen Aminosäuren (Alanin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin), Glycerin, Glucose oder Ethanol. Das zur Isolierung von Säurebildenden Bakterien verwendete Medium 287a ist in **Tabelle 7** aufgeführt.

**Tabelle 7:** Nährmedium 287a zur Isolierung von säurebildenden Bakterien (verändert nach DSMZ 2007).

<b>Nährmedium 287a</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,30 g/l
NaCl	0,50 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,15 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,30 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,10 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	2,00 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	4,00 g/l
C-Quelle <sup>1</sup>	6,00 g/l
Vitaminstammlösung ( <b>Tabelle 8</b> )	5,00 ml/l
Spurenelementstammlösung ( <b>Tabelle 8</b> )	5,00 ml/l
Resazurinstammlösung (1 mg/ml)	1,00 ml
destilliertes Wasser	990,00 ml
Agar (bei festen Nährmedien)	15,00 g/l
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Cystein-HCl	0,50 g/l
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
pH-Wert	6,8-7,0
Atmosphäre	N <sub>2</sub> bzw. N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)

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

In **Tabelle 8** sind die Spurenelement- und Vitaminstammlösungen für das 287a-Medium aufgeführt.

**Tabelle 8:** Vitamin- und Spurenelementstammlösung für das Medium 287a (DSMZ 2012a)

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

Zur Herstellung des 287a-Mediums mit jeweils einer C-Quelle wurden die Medienbestandteile abgewogen und unter Formiergasatmosphäre (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 95/5) in einem Anaerobenzelt (**Abbildung 3**) mit abgekühltem Wasser vereinigt, welches zuvor durch Aufkochen entgast wurde. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,8 - 7,0 erfolgte nach Zugabe der reduzierenden Agenzien Cystein-HCl und Na<sub>2</sub>S x 9 H<sub>2</sub>O. Nach ca. 60 Minuten wurde das Nährmedium in Kulturgefäße aliquotiert und mit Butylstopfen verschlossen. Die Gasphase wurde gegen eine N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20)-Atmosphäre ausgetauscht. Die Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.



**Abbildung 3:** Anaerobenzelt. Die anaeroben Arbeiten wurden in einem Anaerobenzelt (Firma Coy Laboratory Products, Michigan, USA) mit Formiergasatmosphäre ( $N_2/H_2$  95/5) durchgeführt.

Für die Herstellung von thermophilen Anreicherungskulturen wurde Fermentersubstrat zunächst 20 Minuten bei  $0,1 \times g$  zentrifugiert. Von dem Überstand wurden  $500 \mu\text{l}$  bzw.  $1 \text{ ml}$  zu  $19 \text{ ml}$  287a-Medium mit jeweils einer Kohlenstoffquelle pipettiert. Weitere Anreicherungskulturen wurden folgendermaßen hergestellt:  $250 \text{ mg}$  oder  $500 \text{ mg}$  Fermenterinhalt (Flüssigkeit mit Pflanzenresten) wurden zu  $5$  bzw.  $9 \text{ ml}$  287a-Medium mit jeweils einer Kohlenstoffquelle gegeben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei  $54^\circ\text{C}$  als Standkultur.

Für die Herstellung von Anreicherungskulturen der drei mesophilen Biogasanlagen wurde Fermentersubstrat aufgetaut, welches bei  $-75^\circ\text{C}$  tiefgefroren war. Anschließend wurden  $250 \text{ mg}$  Fermentersubstrat zu  $5 \text{ ml}$  Medium (C-Quelle: Glycerin, Ethanol +  $\text{CO}_2$ ) bzw.  $500 \text{ mg}$  Fermentersubstrat zu  $9 \text{ ml}$  Medium hinzugegeben. Anreicherungskulturen von den zusätzlich beprobten Laborfermentern der Universität Hohenheim wurden durch Zugabe von  $500 \text{ mg}$  Reaktorsubstrat zu  $9 \text{ ml}$  Nährmedium mit jeweils einer Kohlenstoffquelle gewonnen. Sowohl die Anreicherungskulturen der mesophilen Biogasanlagen als auch diejenigen der Laborfermenter wurden bei  $39^\circ\text{C}$  als Standkulturen inkubiert. Zur Erhaltung von Reinkulturen wurde die Tiefagar-Verdünnungsmethode angewendet.

#### II.1.2.4 Methoden zur Isolierung von Säure-bildenden Bakterien

Für die Isolierung von Bakterien aus Anreicherungskulturen der einzelnen Biogasanlagen wurde geprüft, mit welchen Vereinzelmethode Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäure-bildende Bakterien isoliert werden können. Folgende Methoden wur-

den getestet: Verdünnung in flüssigem Nährmedium (Verdünnungsreihe), anaerobes Ausplattieren, Koch'scher Plattenguss, Schrägagar in Kulturröhrchen und Tiefagar-Verdünnungsmethode. Diese Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

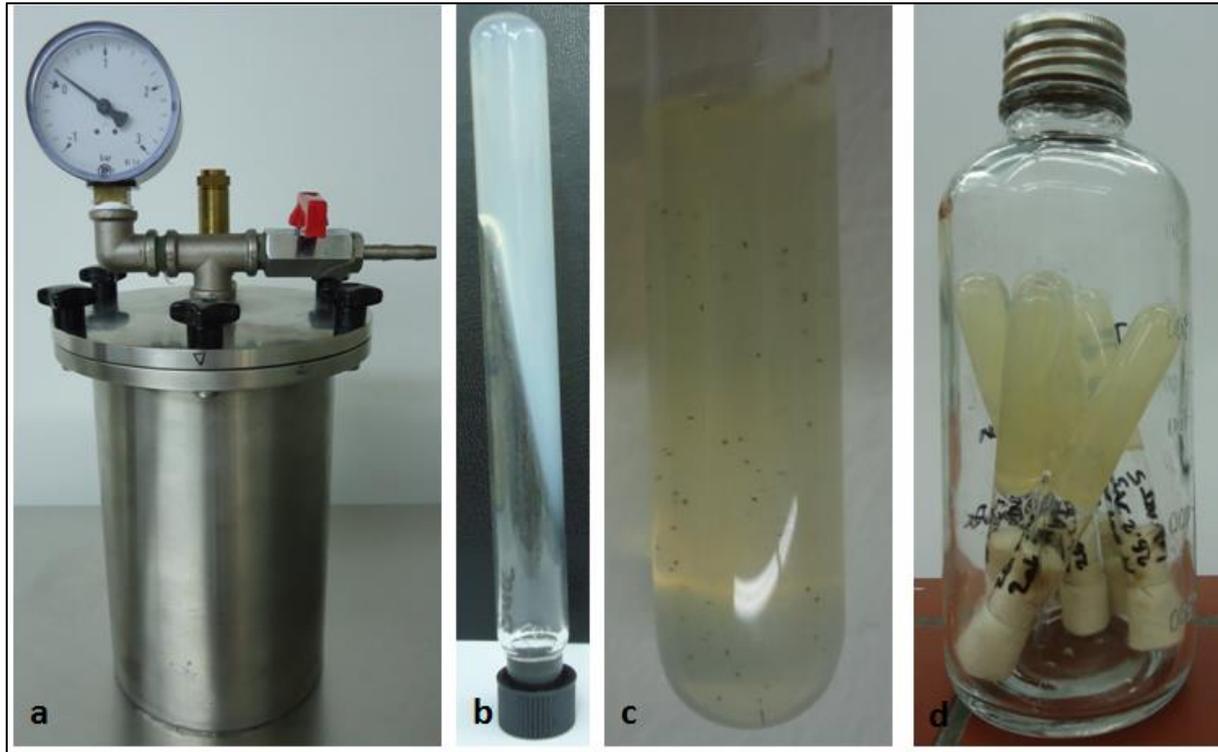
#### Verdünnung in flüssigem Nährmedium

Diese Isolierungsmethode ist für Bakterien geeignet, welche nicht auf oder in festen Nährböden wachsen können und in einer Mischkultur zahlenmäßig überwiegen. Die Verdünnung der Anreicherungskulturen erfolgte dekadisch: Zu 4,5 ml bzw. 9 ml Nährlösung wurden 500 µl bzw. 1 ml pipettiert. Es wurden Verdünnungsreihen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  hergestellt. Mit diesen Verdünnungsreihen konnten die anderen Vereinzelmethode beimpft werden.

#### Anaerobes Ausplattieren und Koch'sches Plattenguss-Verfahren

Für das anaerobe Ausplattieren und den Koch'schen Plattenguss wurde das Nährmedium 287a mit jeweils einer Kohlenstoffquelle und 1,5% Agar unter Formiergasatmosphäre hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde die Nährlösung unter Formiergasatmosphäre für das anaerobe Ausplattieren in sterile Petrischalen mit Belüftungsnocken gegossen. Nach Aushärten der Platten wurden 50 - 100 µl einer Verdünnungsstufe mit sterilen Einmalspateln ausplattiert. Durch die Belüftungsnocken wurde ein Gasaustausch der ausplattierten Mikroorganismen mit der Umgebung gewährleistet. Die auf den Nährmedien ausplattierten Mikroorganismen wurden in speziellen Anaerobentöpfen bei 54°C inkubiert. Hierbei handelt es sich um V2A-Edelstahlzylinder (Johannes Gutenberg-Universität Mainz Eigenbauten, **Abbildung 4a**). Mit Hilfe dieser Anaerobentöpfe war es möglich, die Formiergasatmosphäre gegen eine andere Atmosphäre auszutauschen und einen bestimmten Atmosphären-Druck einzustellen.

Beim Koch'schen Plattenguss wurde das Nährmedium 287a mit einer C-Quelle und 1,5% Agar nach dem Autoklavieren in eine Petrischale mit Belüftungsnocken gegossen, in welche zuvor 500 µl oder 1 ml einer Verdünnung der Anreicherungskultur vorgelegt wurden. Durch leichtes Schwenken wurde das Medium mit der Bakteriensuspension vermischt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls in einem V2A-Edelstahlzylinder (Johannes Gutenberg-Universität Mainz Eigenbauten, **Abbildung 4a**) bei 54°C.



**Abbildung 4:** Verschiedene Vereinzelmethode.

(a) Anaerobtopf (Eigenbau Johannes Gutenberg-Universität Mainz): Für die anaerobe Kultivierung von Nährmedien in Petrischalen. In den Anaerobtopfen konnte die Gasatmosphäre ausgetauscht werden. Das Manometer zeigte den gegenwärtigen Innendruck an.

(b) Schrägagar-Röhrchen: Zum Aushärten des Verfestigungsmittels wurden die Nährmedien nach Autoklavieren schräggestellt. Nach Abkühlen konnten Bakterien suspensionen mit einer Einmal-Impföse auf dem Medium ausgestrichen werden.

(c) Tiefagar-Verdünnungsmethode: Tiefagar-Röhrchen, in welchem dunkle Kolonien gewachsen waren.

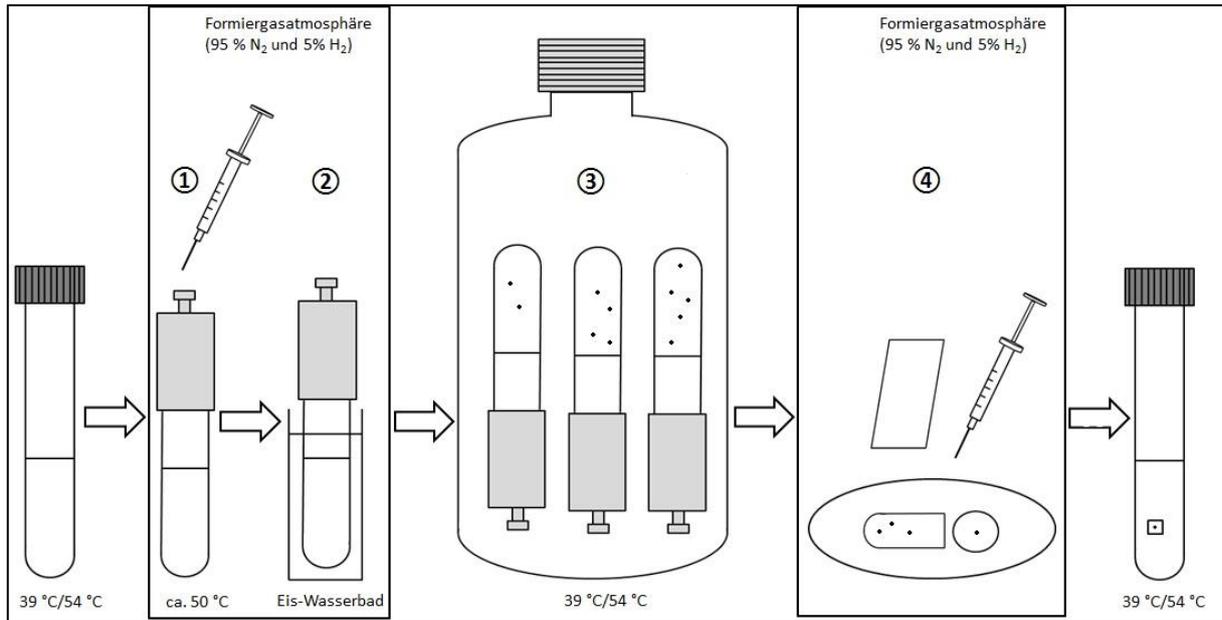
(d) Tiefagar-Verdünnungsmethode: Tiefagar-Röhrchen in einer Transfusionsflasche als „Anaerobtopf“.

### Schrägagar in gasdichten Kulturröhrchen

Bei dieser Methode wurde flüssiges Nährmedium unter Formiergasatmosphäre in gasdichte Kulturröhrchen aliquotiert (10 ml), in welche zuvor 1,5% Agar eingewogen wurden. Nach dem Autoklavieren wurden diese Gefäße zum Aushärten des Verfestigungsmittels schräggestellt (**Abbildung 4b**). Mit Hilfe einer Einmalimpföse konnte eine Verdünnung der Anreicherungskultur ausgestrichen werden.

### Tiefagar-Verdünnungsmethode

**Abbildung 5** zeigt die einzelnen Arbeitsschritte bei der Tiefagar-Verdünnungsmethode.



**Abbildung 5:** Tiefagar-Verdünnungsmethode. Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte. ① Aus einer Kultur/Anreicherungskultur wurde ein bestimmtes Volumen unter Formiergasatmosphäre entnommen und in etwa 50°C heißen Tiefagar (Nährmedium mit 1,5% Agar) pipettiert, durchmischt und der flüssige Agar sofort in einem Eis-Wasser-Bad abgekühlt (②). ③ Nach Aushärten des Agars wurden die Kulturen kopfüber in einer Transfusionsflasche inkubiert, die als „Anaerobentopf“ diente. ④ Mit Hilfe eines sterilen Deckgläschens und sterilen Kanülen wurden diese beim Wachstum von Kolonien unter Formiergasatmosphäre isoliert und in flüssiges Nährmedium überführt.

Zur Durchführung der Tiefagar-Verdünnungsmethode wurde zunächst das Flüssignährmedium 287a mit einer spezifischen C-Quelle hergestellt. Unter Formiergasatmosphäre wurden je 5 ml Nährmedium in kurze Reagenzgläser mit 1,5% (w/v) Agar aliquotiert. Die Gefäße wurden anschließend mit einer Kappe verschlossen und in eine Transfusionsflasche (0,5 l oder 1 l) überführt, welche mit einem Septum und einem Aluminiumverschluss gasdicht verschlossen wurden. Die Transfusionsflasche diente somit als „Anaerobentopf“, es wurde ein Überdruck von 0,5 bar N<sub>2</sub> in der Flasche eingestellt. Zur Herstellung von Anreicherungskulturen in Tiefagar wurden 0,1 - 0,5 ml flüssige Anreicherungskultur in die noch flüssigen Nährmedien pipettiert, welche nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121°C) auf ca. 50°C abgekühlt wurden. Anschließend wurden die Kulturen gemischt (**Abbildung 5** ①), um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen im Nährmedium zu gewährleisten. Das Abkühlen der Tiefagar-Röhrchen in einem Eis-Wasser-Bad sollte verhindern, dass die Mikroorganismen lange dem heißen Nährmedium ausgesetzt waren (**Abbildung 5** ②). Die Inkubation der so hergestellten Tiefagar-Röhrchen erfolgte kopfüber in einer Transfusionsflasche (**Abbildung 5** ③). Die Agarstücke wurden beim Wachstum von Kolonien unter Formiergasatmosphäre mit Hilfe einer sterilen Kanüle in eine sterile Petrischale überführt und anschließend mit sterilen Deckgläsern (24 mm x 60 mm) in Scheiben geschnitten. Die Kolonien wurden mit Hilfe von Kanülen herauspräpariert und in flüssige Nährmedien

überführt (**Abbildung 5** ④). Die Inkubation erfolgte bei entsprechender Temperatur (39°C bzw. 54°C). Zur Herstellung von Reinkulturen wurden die Isolate mindestens dreimal mit dieser Methode vereinzelt.

Während bei thermophilen Isolaten die in diesem Kapitel aufgeführten Methoden teilweise in Kombination angewendet wurden, wurde zur Isolierung von Bakterien aus mesophilen Biogasanlagen sowie aus den Hochdruck-Biogas-Laborfermentern nur die Tiefagar-Verdünnungsmethode angewendet, da sich diese Methode als am erfolgreichsten herausgestellt hatte.

Im Laufe des Projektes wurde die Tiefagar-Verdünnungsmethode modifiziert, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

#### Modifizierung der Tiefagar-Verdünnungsmethode

Die Tiefagar-Verdünnungsmethode wurde zunächst in Rollrand-Reagenzgläsern durchgeführt. Die Öffnung dieser Gefäße war im Vergleich zum restlichen Gefäß schmaler. Diese Gefäße mussten wegen der Verengung mit Hilfe eines Hammers zerschlagen werden, um an das Agarstück zu gelangen. Um den Verbrauch an Rollrand-Reagenzgläsern zu reduzieren, wurde nach einer Alternative zur Herstellung von Tiefagar-Kulturen gesucht: Ideal waren Gefäße, deren Öffnung nicht schmaler als der Rest des Gefäßes ist. Als neue Möglichkeit wurden kürzere Reagenzgläser getestet. Diese waren wiederverwertbar und das Agarstück konnte mit Hilfe einer Kanüle leicht aus dem Glas entnommen werden. Da diese Gefäße allerdings nicht gasdicht sind, mussten diese in Transfusionsflaschen überführt werden, welche gasdicht verschlossen werden konnten und somit als „Anaerobentopf“ dienten. Als Verschluss der kürzeren Reagenzgläser wurden Kapsenbergkappen verwendet. Bei den Kapsenbergkappen erwies sich als vorteilhaft, dass die Gefäße durch den Griff leicht mit Hilfe einer Pinzette aus den Transfusionsflaschen herausgenommen werden konnten. Die Deckel konnten zudem gespült und wiederverwertet werden. Aufgrund der leichten Durchführbarkeit wurden die Bakterien mit der so etablierten Methode isoliert.

Für die Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäure-bildenden Bakterien musste in den Anreicherungs- und Vereinzeltungskulturen überprüft werden, ob Säuren in den Kulturen gebildet wurden. Als geeignete Methode erwies sich hierbei die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).

#### II.1.2.5 Nachweis von Säuren

Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie können kleine Stoffmengen getrennt, anhand eines Vergleichs von Retentionszeiten mit Standards identifiziert und quantifiziert werden. Zu Beginn des Verbundprojektes (Jahr 2012) wurden die Säuren mit folgender Säule nachgewiesen: Spheribond ODS 2 (Größe: 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) der Firma Bischoff, Leonberg. Diese Säule enthält als stationäre Phase ein Octadecylsilan, ein Silan substituiert mit einem n-Alkan mit 18 C-Atomen. Dadurch

wird die stationäre Phase extrem apolar. Somit werden von der Säule apolare Stoffe später eluiert als polare (MEYER 2009). Als mobile Phase diente ein  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ -Puffer (7,3 mM, pH 2,3), welcher mit MilliQ-Wasser hergestellt und mit Hilfe eines 0,2  $\mu\text{m}$ -Cellulose-Acetat-Filter filtriert wurde. Im Anschluss erfolgte eine Entgasung des Puffers in einem Exsikkator unter Vakuum. Die Substanzen wurden mittels eines UV-VIS-Detektors (SPD-10A VP) der Firma Shimadzu, Duisburg, analysiert. Ein solcher Detektor registriert Substanzen, welche ultraviolettes Licht (Wellenlänge  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ) absorbieren. Mit Hilfe dieser Säule und dem verwendeten Laufmittel konnten Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, Succinat und Buttersäure in Nährmedien detektiert werden.

Innerhalb des Projektjahres 2013 wurde die Methode zur Analyse der Säulen weiterentwickelt. Die Proben wurden mit der Säule Hpx87 (Größe: 300 x 7,8 mm, 9  $\mu\text{m}$  Partikelgröße) der Firma BioRad (München) und dem RI-Detektor (RID-10A, Shimadzu, Duisburg) analysiert. Die verwendete Säule war ein Kationenaustauscher auf Styrol-Divinyln-Basis in H-Form. Die Trennprinzipien dieser Säule sind folgende: Die Trennung erfolgt aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen sowie unterschiedlicher Größe und Ladung der Substanzen. Mit Hilfe dieser Säule konnten folgende Substanzen (Substrate, Stoffwechselprodukte) analysiert werden: Arabinose, Buttersäure, Essigsäure, Ethanol, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerin, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Milchsäure, Propionsäure, Rhamnose, Ribose, Trehalose und Xylose.

Puffer und Lösungen für die HPLC wurden mit MilliQ angesetzt. Hierfür wurde das MilliQ-Wasser zunächst mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen 0,2  $\mu\text{m}$ -Cellulose-Acetat-Filter filtriert und im Anschluss im Exsikkator unter Vakuum entgast. Für die mobile Phase wurde 0,005 M Schwefelsäure mit MilliQ-Wasser hergestellt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese zunächst 2 Minuten bei 14300 x g zentrifugiert und anschließend durch einen Filter (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße, Chromatofil<sup>®</sup>Xtra RC-20/25, Macherey und Nagel, Düren) filtriert. Folgende Parameter wurden bei der HPLC eingestellt: Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$ , Flussrate der Pumpe 0,6 ml/min. Die Temperatur des Säulenofens betrug 65°C.

#### II.1.2.6 Isolate aus Fermentersubstrat

Im Folgenden wird ein Überblick über die gewonnenen Isolate gegeben sowie über deren gebildete Produkte in den entsprechenden Nährmedien. Aus den untersuchten Biogasanlagen und Laborfermentern wurden 30 Isolate aus Anreicherungskulturen mit Laktat als Kohlenstoffquelle isoliert. **Tabelle 9** zeigt eine Zusammenfassung.

**Tabelle 9:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Laktat als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Stoffwechselprodukte
LG1.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
LG1.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Buttersäure
LG2.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LG2.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LG2.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LG2.5 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Ethanol
LG2.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LW3.1A <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LW3.1B <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LW3.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
LW3.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LW3.5 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
LW3.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure, Propionsäure
L1 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L2 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L3 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L4 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L5 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L6 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L12 <sup>2</sup>	Plattenguss, Tiefagar	Laktat	Essigsäure
L14 <sup>2</sup>	Plattenguss, Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V1 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V2 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V3 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V4 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V5 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
V6 <sup>2</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
Lak SH53A <sup>3</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure
Lak SH53B <sup>3</sup>	Tiefagar	Glucose <sup>4</sup>	Essigsäure
Lak SH101 <sup>3</sup>	Tiefagar	Laktat	Essigsäure

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

<sup>2</sup> Isolate stammen aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

<sup>3</sup> Isolate wurden aus den Laborfermentern der Universität Hohenheim isoliert

<sup>4</sup> Bildung von Essigsäure in DSMZ-Medium 104b mit 0,5% Glucose (DSMZ 2014).

Aus den drei mesophilen Biogasanlagen konnten neun Kulturen isoliert werden, welche Essigsäure und Propionsäure in Laktat-haltigem Medium bildeten. Bei zwei Kulturen konnte Essigsäure detektiert werden, bei einer Kultur Ethanol und bei einem Isolat Buttersäure. Bei 14 untersuchten thermophilen Isolaten wurde qualitativ Essigsäure nachgewiesen. Aus den Laborfermentern der Universität Hohenheim stammten die Isolate

LakSH53A, LakSH53B sowie LakSH101. Alle drei Isolate waren in der Lage, aus dem angebotenen Substrat Laktat Essigsäure zu bilden.

Aus Anreicherungskulturen, welche die Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin als Kohlenstoffquelle enthielten, konnten elf mesophile Isolate, 12 thermophile Isolate sowie zwei Isolate aus den zusätzlich beprobten Hochdruck-Biogas-Laborfermentern gewonnen werden. In **Tabelle 10** ist zusammengefasst, welche Produkte von den Isolaten gebildet wurden.

**Tabelle 10:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Aminosäuren als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Stoffwechselprodukte
ASG1.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASG1.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure
ASG2.1A <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Buttersäure, Glycerin
ASG2.1B <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Glycerin
ASG2.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Glycerin
ASG2.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure
ASG2.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure
ASW3.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASW3.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Buttersäure
ASW3.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASW3.5 <sup>1</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
AS22 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
AS23 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Succinat
AS32 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Succinat
AS34 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure
AS36 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
AS40 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
AS43 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure, Succinat
AS44 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	
AS45 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
AS46 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure, Propionsäure
ASV2 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASV4 <sup>2</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASSH51 <sup>3</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure
ASSH103 <sup>3</sup>	Tiefagar	Aminosäuren <sup>4</sup>	Essigsäure

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

<sup>2</sup> Isolate stammen aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

<sup>3</sup> Isolate wurden aus den Laborfermentern der Universität Hohenheim isoliert

<sup>4</sup> Das Medium enthielt als Substrat die Aminosäuremischung Alanin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin.

Sechs mesophile und drei thermophile Isolate bildeten in dem Aminosäure-haltigen Medium Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure. Bei fünf mesophilen und neun thermophilen Isolaten konnte Essigsäure in den Medien nachgewiesen werden. Die beiden Isolate (AS SH51 und AS SH 103) aus Fermentern der Universität Hohenheim bildeten aus den angebotenen Aminosäuren ebenfalls Essigsäure.

Aus Anreicherungskulturen mit Succinat als Kohlenstoffquelle existierten sieben mesophile Isolate und ein thermophiles Isolat, welche in **Tabelle 11** wiedergegeben sind. Bei sieben der acht analysierten Isolate konnte in den Succinat-haltigen Medien als Produkt Essigsäure nachgewiesen werden, bei einem Isolat Milchsäure.

**Tabelle 11:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Succinat als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Stoffwechselprodukte
SG1.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
SG1.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
SG1.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
SG2.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Milchsäure
SG2.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
SW3.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
SW3.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure
Succ22 <sup>2</sup>	Tiefagar	Succinat	Essigsäure

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

<sup>2</sup> Isolate stammen aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

Aus Glycerin-haltigen Anreicherungskulturen stammten sieben mesophile Isolate sowie ein thermophiles Isolat. **Tabelle 12** zeigt, welche Säuren die Isolate bilden.

**Tabelle 12:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Stoffwechselprodukte
GlyG1.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Succinat, Glucose, Milchsäure
GlyG1.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Succinat, Glucose, Milchsäure
GlyW3.1 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Succinat, Milchsäure
GlyW3.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure
GlyW3.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Succinat, Propionsäure, Milchsäure
GlyW3.5 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Essigsäure, Succinat
GlyW3.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Glycerin	Succinat, Propionsäure, Milchsäure
GlyV3 <sup>2</sup>	Tiefagar	Glycerin	Essigsäure

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

<sup>2</sup> Isolate stammen aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

Aus **Tabelle 12** wird ersichtlich, dass drei der untersuchten Isolate Propionsäure, Succinat und Milchsäure in einem Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle bildeten. Bei den anderen Isolaten konnten Succinat, Glucose, Milchsäure oder Essigsäure qualitativ nachgewiesen werden.

Aus einer mesophilen Anreicherungskultur mit Ethanol und CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquellen gab es sieben Isolate, welche Essigsäure bildeten (siehe **Tabelle 13**).

**Tabelle 13:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Ethanol und CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquellen.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Gasatmosphäre	Stoffwechselprodukte
EG1.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EG1.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EG1.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EG2.3 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EG2.4 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EW3.2 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure
EW3.6 <sup>1</sup>	Tiefagar	Ethanol	CO <sub>2</sub>	Essigsäure

<sup>1</sup> Isolate stammen aus den Biogasanlagen Glahn, Gebel und Wagner.

Aus der thermophilen Biogasanlage Butschen wurden vier Isolate gewonnen, welche durch das anaerobe Ausplattieren (vgl. Abschnitt II.1.2.4) isoliert wurden. Bei zwei der vier Isolate konnten als Produkte Milchsäure, Essigsäure und Ethanol nachgewiesen werden. Bei den anderen beiden Kulturen wurde Milchsäure und Buttersäure detektiert. Ein Propionsäure-bildendes Isolat wurde aus dem Laborfermenter isoliert (**Tabelle 14**).

**Tabelle 14:** Isolate aus Anreicherungskulturen mit Glucose als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Isoliermethoden	Substrat	Stoffwechselprodukte
Gluc1 <sup>1</sup>	Platte	Glucose	Milchsäure, Essigsäure, Ethanol
Gluc2 <sup>1</sup>	Platte	Glucose	Milchsäure, Buttersäure
Gluc4 <sup>1</sup>	Platte	Glucose	Milchsäure, Buttersäure
Gluc5 <sup>1</sup>	Platte	Glucose	Milchsäure, Essigsäure, Ethanol
GlucSH51 <sup>2</sup>	Tiefagar	Glucose	Essigsäure
GlucSH52 <sup>2</sup>	Tiefagar	Glucose	Essigsäure, Propionsäure
GlucSH101 <sup>2</sup>	Tiefagar	Glucose	Essigsäure

<sup>1</sup> Isolate stammen aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

<sup>2</sup> Isolate wurden aus den Laborfermentern der Universität Hohenheim isoliert.

Zur Identifizierung der Isolate wurde zunächst aus den erhaltenen Reinkulturen die DNA isoliert. Anschließend wurde zur Identifizierung die 16S rDNA amplifiziert und sequenziert.

### II.1.2.7 Isolierung der DNA aus Bakterienisolaten und Reaktorsubstrat

Die Isolierung der DNA aus Bakterien-Isolaten erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kits nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien (Qiagen, Hilden). Das Prinzip dieses DNA-Isolierungskits ist, dass zunächst die Bakterienzellen mit Hilfe der Enzyme Lyticase und Proteinase K lysiert werden. Im Anschluss daran wird durch Zentrifugation die DNA an eine Silika-Membran gebunden. Proteine, Polysaccharide und Salze werden mit Hilfe von Ethanol-haltigen Puffern entfernt. Nach den Reinigungsschritten wird die DNA von der Silika-Membran eluiert. Für die Isolierung wurden ca. 600 µl einer Kultur 5 Minuten bei 7500 x g abzentrifugiert, in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in Lysepuffer nach Herstellerangaben lysiert. Entgegen der Angaben des Herstellers wurde die DNA in 180 µl statt 200 µl AE-Puffer eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

DNA aus Reaktorproben der Biogasanlagen Butschen, Glahn, Gebel und Wagner wurde mit Hilfe des „GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx“ (Roboklon, Berlin) isoliert. Von jeder Biogasanlage wurden je 200 mg Reaktorsubstrat in einem Eppendorfgefäß 10 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend zweimal in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde das Zellpellet im Puffer der „Bead-Tubes“ des DNA-Isolierungskits aufgenommen. Die DNA wurde entsprechend der Herstellerangaben isoliert und in 120µl „Elution Buffer“ aufgenommen.

Für die Identifizierung der Organismen wurde zunächst das 16S rRNA-Gen mittels der Polymerasen Kettenreaktion amplifiziert.

### II.1.2.8 Amplifizierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens

Die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens zur Art-Identifizierung nach Sequenzierung und Sequenzierungsvergleich der Bakterien mit Datenbanken erfolgte mittels der Polymerasen Kettenreaktion (PCR). In **Tabelle 15** ist das PCR-Programm angegeben.

**Tabelle 15:** PCR-Programm für die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95°C	15 min
2	Denaturierung	94°C	1 min
3	Annealing	56°C	1 min
4	Elongation	72°C	1,5 min
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72°C	10 min

Für die Polymerase Kettenreaktion wurde ein Mastermix zusammenpipettiert, welcher die für die Amplifizierung der DNA nötigen Komponenten enthielt (Magnesiumchlorid, dNTP, Primer, PCR-Wasser und DNA-Polymerase ).

PCR-Ansatz (1x, 50 µl)

Forward-Primer: PurEubak5 (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer: PurEubak3 (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Enhancer Solution (5x)	5 µl
PCR-Wasser	32,6 µl
Taq-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen) (5 U/µl)	0,4 µl
Template-DNA	2 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Für die PCR wurden die Primer PurEubak3 und PurEubak5 verwendet, welche in **Tabelle 16** aufgeführt sind.

**Tabelle 16:** Verwendete Primer für die Amplifizierung der 16S rRNA-Gene.

Primer	Basensequenz (5' → 3')	Länge	GC-Gehalt	Tm	Literatur
PurEubak3	AGAAAGGAGGTGATCC	16 bp	50%	54,1°C	PFANNEBE-
PurEubak5	AGAGTTTGATCMTGGCT	17 bp	44%	53,5°C	CKER 2008

Tm = Schmelztemperatur, bp = Basenpaar

II.1.2.9 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte

In 1,5%igen Agarosegelen wurden die erhaltenen PCR-Fragmente der 16S rDNA analysiert (bei 120 Volt). Als Elektrophoresepuffer wurde TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer verwendet:

TBE-Puffer (10x)

Tris	108 g/l
Borsäure	55 g/l
Na <sub>2</sub> EDTA	7,44 g/l
pH	8,3

Zur Herstellung von TBE-Puffer (1x) wurde TBE-Puffer (10x) 1:10 in entionisiertem Wasser verdünnt. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte die Anfärbung der Gele mit Ethidiumbromid. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen organischen Farbstoff, welcher in die DNA interkalieren kann. Seine aromatischen Ringe interagieren dabei mit den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäure-Basen. Durch UV-Licht

(254-366 nm) kann Ethidiumbromid angeregt werden, was zu einer Emitierung von Licht im orange-roten Bereich (590 nm) führt. Als Größenmarker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl) und als Ladepuffer der DNA-Ladepuffer (6x) verwendet (beide Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot).

Konnte auf dem 1,5%igen Agarosegel durch Vergleich mit dem mitgelaufenen DNA-Ladder eine Bande in Höhe des zu erwarteten PCR-Fragments (1536 bp) detektiert werden, wurden die PCR-Amplifikate zunächst aufgereinigt. Seit August 2014 wurde anstelle des "PCR-Aufreinigungskit „GenElute™ PCR CleanUp Kit“ der Firma Sigma, Steinheim, das PCR-Aufreinigungskit USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet. Hierbei wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP-IT-Reagenz 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 25 Minuten bei 80°C erhitzt.

Die Sequenzierung der PCR-Fragmente erfolgte bei der Firma LGC in Berlin nach der Sanger-Methode. Für die Sequenzierung wurden 2 µl je eines Primers zu dem aufgereinigten PCR-Produkt hinzugefügt.

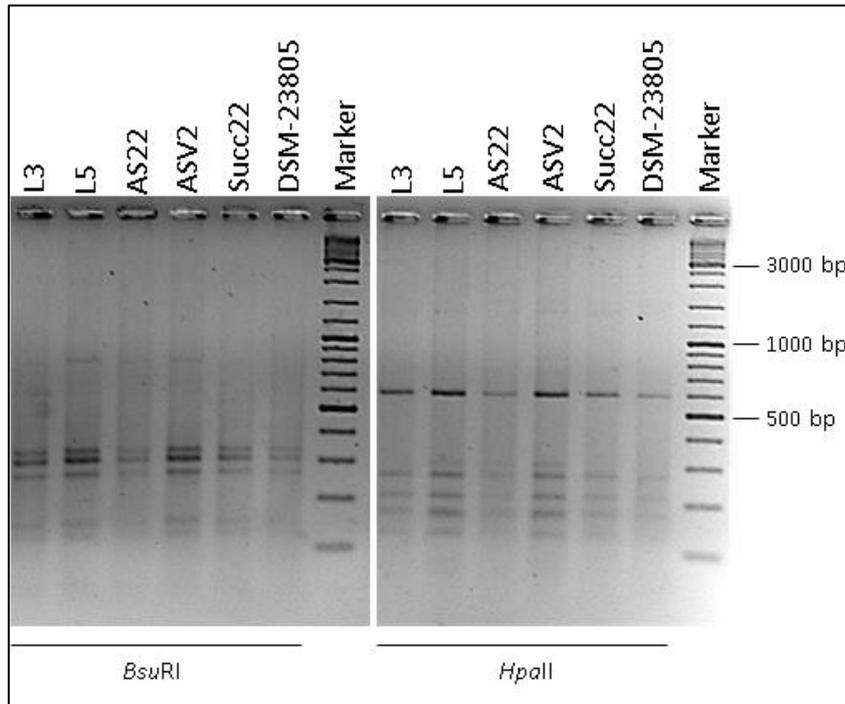
Die Auswertung der Sequenziererergebnisse der 16S rDNA erfolgte mit dem Programm FinchTV (Version 1.4.0) der Firma Geospiza (Seattle, USA). Wurde das PCR-Fragment mit beiden Primern sequenziert, musste das Sequenziererergebnis eines Primers zunächst revers komplementär umgeschrieben werden ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html); Stand: 16.08.2015). Die Sequenzen wurden anschließend zusammengeführt und mit der Datenbank BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990) oder der Datenbank EzTaxon (KIM *et al.* 2012) verglichen.

Nach Isolierung der DNA aus Reinkulturen wurden manche Isolate molekularbiologisch miteinander mit Hilfe des Restriktionsverdau (Abschnitt II.1.2.10) und der Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR, Abschnitt II.1.2.11) verglichen.

#### II.1.2.10 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau handelt es sich um eine sehr sensitive Fingerprint-Methode. An genau definierten, meist pallindromen Erkennungssequenzen wird die DNA eines Gens durch Restriktionsenzyme geschnitten. Durch den Restriktionsverdau entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, welche gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das 16S rRNA-Gen mittels PCR amplifiziert (Abschnitt II.1.2.8). Danach wurden die entstandenen PC-Produkte mit den Restriktionsenzymen *BsuRI* (Schnittstelle 5'-GG<sup>^</sup>CC-3') bzw. *HpaII* (Schnittstelle 5'-C<sup>^</sup>CGG-3') verdaut. Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. 8,7 µl PCR-Produkt wurden mit 0,3 µl Restriktionsenzym und 1 µl Puffer vereinigt. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 30°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Restriktionsenzym 15 Minuten bei 65°C inaktiviert. Der Restriktionsverdau wurde auf einem 2,5%igem Agarosegel bei 60 Volt für

drei Stunden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung wurde wie in Abschnitt II.1.2.9 beschrieben durchgeführt. **Abbildung 6** zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Restriktionsverdau der thermophilen Isolate L3, L5, AS22, ASV2 und Succ22 im Vergleich mit dem DSMZ-Typstamm *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805.



**Abbildung 6:** Restriktionsmuster der 16S rDNA von thermophilen Isolaten (L3, L5, AS22, ASV2 und Succ22) und dem DSMZ-Typstamm *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805. Der Restriktionsverdau wurde mit den Enzymen *Bsu*RI und *Hpa*II durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2,5%igem Agarosegel bei 60 Volt für drei Stunden. Marker: Gene-Ruler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl) der Firma Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot.

#### II.1.2.11 Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR

Die Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) ist eine weitere Fingerprint-Methode (PFANNEBECKER & FRÖHLICH 2008). Die bei dieser Methode verwendeten Primer sind von der Erkennungssequenz des *Not*I-Restriktionsenzym abgeleitet. Im PCR-Programm ist eine „Rampe“ im PCR-Programm integriert, ein schrittweiser Temperaturanstieg zwischen Annealing und Elongation des eingesetzten Primers. Dieser soll eine reproduzierbare Bindung des Primers an die Template-DNA gewährleisten. In **Tabelle 17** ist das Programm für die SAPD-PCR aufgeführt.

**Tabelle 17:** Programm für die SAPD-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	35	1 min
4	Rampe	35 (+ 0,5)	12 s
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4		
6	Annealing	42,5	1 min
7	Rampe	42,5 (+ 0,5)	12 s
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7		
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Elongation	72	10 min

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die SAPD-PCR war folgendermaßen:

PCR-Ansatz (1x, 25 µl)

Primer: A-Not (50 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
PCR-Wasser	12,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen) (5 U/µl)	1 µl
Template-DNA	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

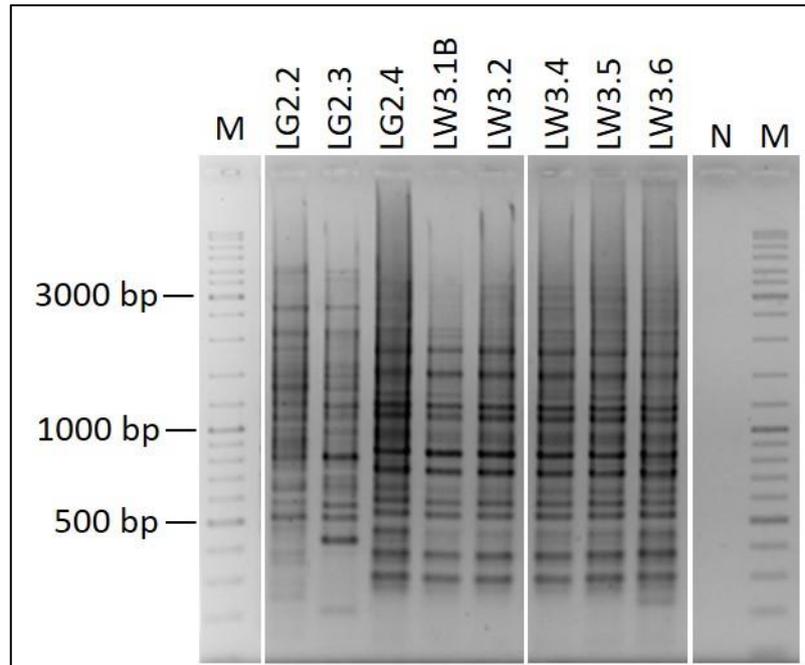
Für die PCR wurden der Primer A-Not verwendet, welcher in **Tabelle 18** aufgeführt ist.

**Tabelle 18:** Verwendeter Primer für die SAPD-PCR.

Primer	Basensequenz (5' → 3')	Länge	GC-Gehalt	T <sub>m</sub>	Literatur
A-Not	AGC GGC CGC A	10 bp	80%	47,6°C	PFANNEBECKER & FRÖHLICH 2008

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur, bp = Basenpaar

Die Auswertung der SAPD-PCR erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel bei 60 Volt für ca. 2,5 Stunden. **Abbildung 7** zeigt beispielhaft das Bandenmuster einer SAPD-PCR mit DNA von mesophilen Isolaten einer Laktat-Anreicherungskultur.



**Abbildung 7:** SAPD-PCR mit genomischer DNA von mesophilen Isolaten. Die PCR-Amplifikate wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. M = Marker (: GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl) der Firma Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot), N = Negativkontrolle.

#### II.1.2.12 Identifizierung der Isolate

Durch Vergleich der DNA-Sequenzen der 16S rDNA mit den Datenbanken EzTaxon und BLAST konnten aus den mesophilen Biogasanlagen 16 Isolate identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 19** zusammengefasst. Dargestellt sind die verwerteten Substrate, die in den Kulturen mittels HPLC nachgewiesenen Produkte, die GenBank-Accession-Nummern, die mit der Datenbank verglichene Sequenzlänge sowie der Name des Organismus, welcher die größte Ähnlichkeit mit der DNA-Sequenz aufwies.

**Tabelle 19:** Säure-bildende Isolate aus den mesophilen Biogasanlagen Glahn, Gebel und Wagner.

Stamm <sup>6</sup>	GenBank Accession-Nr.	Substrate	Gebildete Säuren	Fragmentlänge [bp] <sup>1</sup>	Ähnlichkeit [%] <sup>1</sup>	Nächster Verwandter <sup>1</sup>	Familie	Ordnung	Phylum
SG1.4	KT274739	Succinat	E	1181 (1181)	100	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM-555	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
ASG1.4B	KT274730	Glucose <sup>3</sup>	B, E, P	990 (990)	99	<i>Clostridium cochlearium</i> JCM 1396			
				990 (990)	99	<i>Clostridium tetani</i> E88			
LW3.3B	KT274725	Glucose <sup>2</sup>	E	783 (783)	99	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> DSM-13106	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis		
LG2.2	-	Milchsäure	E, P	-	5	<i>Clostridium aminovalericum</i> JCM 11016	Lachnospiraceae		
LG2.3	KT274719	Milchsäure	E, P	743 (742)	99				
SG1.1	KT274738	Succinat	E	1278 (1277)	100	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> DSM-4024			
				1278 (1276)	100	<i>Clostridium celerecrescens</i> DSM-5628			
				1278 (1272)	100	<i>Clostridium sphenoides</i> DSM-632			
EG2.4	KT274742	Ethanol	E	981 (981)	93	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> SEBR 3139	Peptococcaceae		
SG1.4B	KT274740	Glucose <sup>3</sup>	E	1183 (1183)	89	<i>Gaicola bamesae</i> DSM-3244	Peptoniphilaceae		
ASG2.1A	-	AS <sup>4</sup>	B, E	-	5	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> DSM-1294	Ruminococcaceae		
ASG2.1B	-	AS <sup>4</sup>	B, E, P	-	5				
ASG2.2	-	AS <sup>4</sup>	E	-	5				
AG2.3	KT274731	AS <sup>4</sup>	B, E, P	1255 (1235)	99				
ASW3.1	-	AS <sup>4</sup>	E	-	5				
ASW3.2	KT274732	AS <sup>4</sup>	E	1312 (1288)	98				
ASW3.3	KT274733	AS <sup>4</sup>	B, E	1239 (1238)	99				
ASW3.5	KT274734	AS <sup>4</sup>	E	1287 (1266)	99				
ASW3.6	KT274735	AS <sup>4</sup>	E	918 (902)	98				
ASG1.4	KT274729	AS <sup>4</sup>	B, E, P	1288 (1288)	96,11	<i>Proteiniborus ethanoligenes</i> GW	Unclassified Clostridiales		
LG2.4	KT274720	Milchsäure	E, P	981 (978)	100	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i> DSM-1736	Veillonellaceae		
LW3.1B	-	Milchsäure	E, P	-	5				
LW3.2	-	Milchsäure	E, P	-	5				
LW 3.4	KT274721	Milchsäure	E, P	906 (906)	96				
LW3.5	KT274722	Milchsäure	E, P	1011 (1011)	95				
LW3.6	KT274723	Milchsäure	E, P	663 (663)	97				
GlyW3.4	KT274741	Glycerin	M, P, S	1353 (1353)	97	<i>Selenomonas bovis</i> WG			
LW3.3	KT274724	Milchsäure	E	718 (715)	99	<i>Deffluvitoga tumiensis</i> Sulflac1	Petrogaceae	Petrogales	Thermotogae

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

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

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

<sup>3</sup> Bildung von Essigsäure in Medium DSMZ 104b.

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

<sup>5</sup> Identifizierung mit Hilfe der Fingerprintmuster der SAPD-PCR.

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

Die Isolate ASG2.3, ASW3.2, ASW3.3, ASW3.5 und ASW3.6 stammten aus zwei verschiedenen Biogasanlagen (BGA Gebel und BGA Wagner) und wurden aus Anreicherungskulturen isoliert, welchen die Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin als Kohlenstoffquellen hinzugegeben wurden. Bei diesen Isolaten wurde qualitativ Essigsäure und Buttersäure mit Hilfe der HPLC nachgewiesen. Ein Vergleich mit der EzTaxon-Datenbank ergab eine 97 - 98%ige Ähnlichkeit zu *Clostridium sporosphaeroides*. Mit Hilfe der SAPD-PCR konnten weiterhin die Isolate ASG2.1A, ASG2.1B, ASG2.2 und ASW3.1 als *Clostridium sporosphaeroides* identifiziert werden.

Isolat ASG1.4 wurde ebenfalls aus einer Anreicherungskultur mit Aminosäuren als Kohlenstoffquelle isoliert. Mit Hilfe der HPLC konnten Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure als Produkte detektiert werden. Auf Basis der 16S rDNA bestand eine 96%ige Ähnlichkeit zu *Proteiniborus ethanolicus*. Mit Laktat als Kohlenstoffquelle konnten sechs Isolate gewonnen werden, welche in der Lage waren, aus Laktat Essigsäure und Propionsäure zu bilden. Davon besaßen vier Isolate (LG2.4, LW3.4, LW3.5, LW3.6) eine 96 - 99%ige Ähnlichkeit zu *Dendrosporobacter quercicolus*. Die beiden anderen Isolate (LW3.1B und LW3.2) zeigten ein sehr ähnliches Fingerprintmuster wie die vier genannten Isolate ebenfalls.

Ein weiteres Propionsäure-bildendes Isolat (LG2.3) konnte als *Clostridium aminovalericum* identifiziert werden. Das Isolat GlyW3.4 besaß auf Basis der 16S rDNA eine 97%ige Übereinstimmung zu *Selenomonas bovis*. Dieses Isolat wurde aus einer Anreicherungskultur mit Glycerin als Kohlenstoffquelle isoliert. Qualitativ konnte Essigsäure und Propionsäure mittels HPLC nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Isolate gewonnen, welche eine Verwandtschaft zu *Clostridium kluyveri* (SG1.4), *Clostridium cochlearium/Clostridium tetani* (ASG1.4B), *Sporanaerobacter acetigenes* (LW3.3B) und *Defluviitoga tunisiensis* (LW3.3) aufwiesen. Isolat SG1.1 wies eine 100%ige Ähnlichkeit auf Basis der 16S rDNA zu *Desulfotomaculum guttoideum*, *Clostridium celerecrescens* und *Clostridium sphenoides* auf. Zwei Isolate zeigten nur geringe Ähnlichkeiten zu ihrem nächsten Verwandten: Isolat EG2.4 (93% *Desulfotomaculum halophilum*) und Isolat SG1.4B (89% *Gallicola barnesae*) wiesen

Aus den Hochdruck-Biogas-Laborfermentern konnten acht Isolate gewonnen werden, welche in **Tabelle 20** aufgeführt sind.

**Tabelle 20:** Säurebildende Isolate aus den Hochdruck-Biogas-Laborfermentern.

Stamm	GenBank Accession-Nr.	Substrate	Gebildete Säuren	Fragmentlänge [bp] <sup>1</sup>	Ähnlichkeit [%] <sup>1</sup>	Nächster Verwandter <sup>1</sup>	Familie	Ordnung	Phylum
GlucSH52	KT274744	Glucose	E, P	753 (752)	100	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> BHK67	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
GlucSH101	KT274745	Glucose	E	776 (776)	99	<i>Bacillus firmus</i> SS3			
				776 (776)	99	<i>Bacillus sibiralis</i> 171544			
				776 (776)	99	<i>Bacillus circulans</i> WRB-10			
LakSH53A	KT274726	Milchsäure	E	801 (801)	99	<i>Soehngenia saccharolytica</i> DSM-12858	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	Clostridiales	
ASSH103	KT274737	AS <sup>3</sup>	E	586 (586)	97	<i>Tissierella creatinini</i> DSM-9508			
				586 (586)	97	<i>Tissierella praecuta</i> E064			
GlucSH51	KT274743	Glucose	E	738 (736)	99	<i>Enterococcus casseliflavus</i> RTCL14	Enterococcaceae	Lactobacillales	
				738 (736)	99	<i>Enterococcus gallinarum</i> RTCL13			
LakSH53B	KT274727	Glucose <sup>2</sup>	E	741 (741)	100	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> JL	Thermoanaerobacteriaceae	Thermoanaerobacterales	
LakSH101	KT274728	Milchsäure	E	780 (780)	100	<i>Tepidanaerobacter acetatolydans</i> Re1			
ASSH51	KT274736	AS <sup>3</sup>	E	596 (596)	92	<i>Acholeplasma morum</i> T2-043	Acholeplasmataceae	Acholeplasmatales	Tenericutes

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

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

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

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

Die Isolate GlucSH51, GlucSH52, ASSH51, LakSH53A und LakSH53B stammten aus dem Hochdruck-Biogas-Laborfermenter, welcher einen Überdruck von 50 bar aufwies. Diese Isolate waren in der Lage, aus den angebotenen Substraten Essigsäure zu bilden, wobei GlucSH52 auch Propionsäure aus Glucose gebildet hat. Die Isolate GlucSH101, ASSH103 und LakSH101 wurden aus dem Hochdruck-Biogas-Laborfermenter mit 100 bar Überdruck gewonnen und waren alle zur Essigsäurebildung aus den angebotenen Substraten fähig. Isolat ASSH51 besaß eine 92%ige Ähnlichkeit auf Basis der 16S rDNA mit *Acholeplasma morum*. Da es sich hierbei um einen S2-Organismus handelte, wurde die weitere Arbeit mit diesem Organismus eingestellt. Das Isolat ASSH103 zeigte eine 97%ige Ähnlichkeit zur Gattung *Tissierella*. Es konnten zwei Arten aus der Gattung *Tepidanaerobacter* gewonnen werden: *Tepidanaerobacter syntrophicus* (LakSH53B, 99%ige Übereinstimmung) und *Tepidanaerobacter acetoxydans* (LakSH101, 100%ige Übereinstimmung).

Aus der thermophilen Biogasanlage wurden 11 Isolate identifiziert. **Tabelle 21** zeigt die Substratverwertung, die verglichene Sequenzlänge der 16S rDNA sowie den Organismus mit der größten Ähnlichkeit zum Isolat.

**Tabelle 21:** Säurebildende Isolate aus der thermophilen Biogasanlage Butschen.

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

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

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

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

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

<sup>4</sup> Identifizierung der Isolate mit Hilfe der Fingerprintmuster des Restriktionsverdaus (**Abbildung 6**).

Die Isolate AS34 und AS46 stammten aus Anreicherungskulturen mit Aminosäuren als Kohlenstoffquelle und bildeten aus den im Medium angebotenen Aminosäuren Essigsäure und Propionsäure. Ein Vergleich mit der Datenbank EzTaxon zeigte eine 96%ige Ähnlichkeit beider Isolate zu *Tepidanaerobacter syntrophicus* und *Tepidanaerobacter acetatoxydans*. Während es zu *Tepidanaerobacter syntrophicus* keine Angaben zur Verwertung von Aminosäuren bzw. zur Bildung von Säuren gibt (SEKIGUCHI *et al.* 2006), beschreiben WESTERHOLM *et al.* (2011b) die Fähigkeit von *Tepidanaerobacter acetatoxydans* zur Verwertung der Aminosäuren Methionin, Cystein und Serin. Aus Methionin kann *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Propionsäure bilden.

Das Isolat L14 verwertete Laktat zu Essigsäure. Ein Vergleich der 16S rDNA zeigte eine 99%ige Ähnlichkeit zu *Desulfotomaculum australicum* und eine 98%ige Ähnlichkeit zu *Desulfotomaculum thermocisternum*. Beide Organismen können laut VOS *et al.* (2009) und NILSEN *et al.* (1996) Milchsäure zu Essigsäure zu oxidieren. NILSEN *et al.* (1996) beschreiben weiterhin, dass *Desulfotomaculum thermocisternum* zusammen mit hydrogentrophen Methanogenen Propionsäure abbauen kann.

Die Isolate Gluc2 und Gluc4 verwerteten Glucose zu Essigsäure und Buttersäure. Es bestand eine 100%ige Sequenzähnlichkeit auf Basis der 16S rDNA zu *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Ein Vergleich mit der Literatur bestätigte die Beobachtung der Säurebildung aus Glucose (VOS *et al.* 2009). Ein weiteres Isolat (D1) konnte als *Tepidimicrobium xylanilyticum* identifiziert werden.

Das mesophile Isolat LakW3.3 (**Tabelle 19**) sowie die thermophilen Isolate AS22, ASV2, L3, L5 und Succ22 besaßen eine 100%ige Übereinstimmung auf Basis der 16S rDNA mit *Defluviitoga tunisiensis*. Dieser Organismus ist im Jahr 2012 von BEN HANIA *et al.* (2012) beschrieben worden. *Defluviitoga tunisiensis* ist ein Vertreter des Phylums Thermotogae.

Zusammenfassend gibt **Tabelle 22** einen Überblick über die Phylogenie der identifizierten Arten. Es konnten 24 Arten aus drei verschiedenen Phyla (Thermotogae, Firmicutes und Tenericutes) gewonnen werden, welche wiederum sechs verschiedenen Ordnungen zugeteilt werden können (Thermotogales, Thermoanaerobacterales, Clostridiales, Bacillales, Lactobacillales und Acholeplasmatales).

**Tabelle 22:** Phylogenetischer Überblick über die gewonnenen Isolate.

Phylum	Ordnung	Familie	Art <sup>1</sup>	Ähnlichkeit <sup>1</sup>	Beispiel-Isolat
<b>Thermotogae</b>	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>Defluvitoga tunisiensis</i>	100%	L3
	<b>Firmicutes</b>	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	100%
			<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	99%	LakSH53B
			<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	96%	AS34
	Thermoanaerobacteriales		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	100%	Gluc4
	Family III. Incertae Sedis				
	Clostridiales	Peptococcaceae	<i>Desulfotomaculum australicum</i>	99%	L14
			<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	93%	EG2.4
		Ruminococcaceae	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	98%	ASG2.3
		unclassified Clostridiales	<i>Proteiniborus ethanolicigenes</i>	96%	ASG1.4
		Clostridiaceae	<i>Clostridium kluveri</i>	99%	SG 1.4
			<i>Clostridium cochlearium/Clostridium tetani</i>	99%/99%	ASG1.4B
			<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	96%	D1
		Lachnospiraceae	<i>Clostridium aminovalericum</i>	99%	LG2.3
			<i>Desulfotomaculum guttoideum</i>	99%	SG1.1
		Clostridiales Family XI.	<i>Soehingia saccharolytica</i>	99%	LakSH53A
		Incertae Sedis	<i>Tissierella</i> sp.	97%	ASSH103
			<i>Sporoanaerobacter acetigenes</i>	99%	LW3.3B
		Peptoniphilaceae	<i>Gallicola barnesae</i>	89%	SG1.4B
		Veillonellaceae	<i>Selenomonas bovis</i>	97%	GlyW3.4
			<i>Dendrosporobacter quercicolus</i>	100%	LG2.4
	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	100%	GlucSH52
			<i>Bacillus</i> sp.	99%	GlucSH101
	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> sp.	99%	GlucSH51
<b>Tenericutes</b>	Acholeplasma-tales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma morum</i>	92%	ASSH51

<sup>1</sup> Nächster Verwandter zu den Isolaten durch Vergleich der 16S rDNA der Isolate mit den Datenbanken EzTaxon bzw. BlastN (vgl. Tabellen 19 bis 21).

### II.1.2.13 Entwicklung Isolat-spezifischer Primer

Mit Hilfe des Programms Primer-Blast (YE *et al.* 2012) wurden zur Detektion in Biogasanlagen sowie zu deren Quantifizierung mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR) Primer ausgewählter Isolate entwickelt. Die Primerpaare wurden hierbei von den 16S rDNA-Sequenzen der Isolate GlyW3.4, ASG2.3, ASG1.4, SG1.4, LG2.4 und L3 abgeleitet. Des Weiteren wurden Primer aus 16S rDNA-Sequenzen konstruiert, welche bei GenBank hinterlegt sind: *Desulfotomaculum australicum* (Accession-Nr. M96665.1), *Proteiniborus ethanoligenes* (Accession-Nr. NR\_044093.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Accession-Nr. EU563362.1) und *Tepidanaerobacter syntrophicus* (Accession-Nr. NR\_040966.1).

Zur Überprüfung der Primer auf ihre Spezifität wurden diese zunächst über das Programm Primer-Blast mit der Datenbank „Nucleotide collection (nt)“ und der Datenbank „Nucleotide collection (nt) - (Organism limited to Bacteria)“ abgeglichen. **Tabelle 24** gibt einen Überblick über die generierten Primer und die Spezifität der einzelnen Primerpaare. In einem weiteren Schritt wurde mittels PCR geprüft, ob die Isolat-spezifischen Primer an die DNA der jeweiligen Isolate bzw. der DSMZ-Typstämme binden und ob das mittels Primer-Blast vorausgesagte PCR-Produkt entstanden ist. Weiterhin sollte durch diese PCR untersucht werden, ob die Isolate in Biogasanlagen detektiert werden können und ob in Biogasanlagen unspezifische PCR-Produkte entstehen. **Tabelle 23** zeigt das verwendete PCR-Programm. Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 23:** PCR-Programm für die Amplifizierung der Isolat-spezifischen Primer.

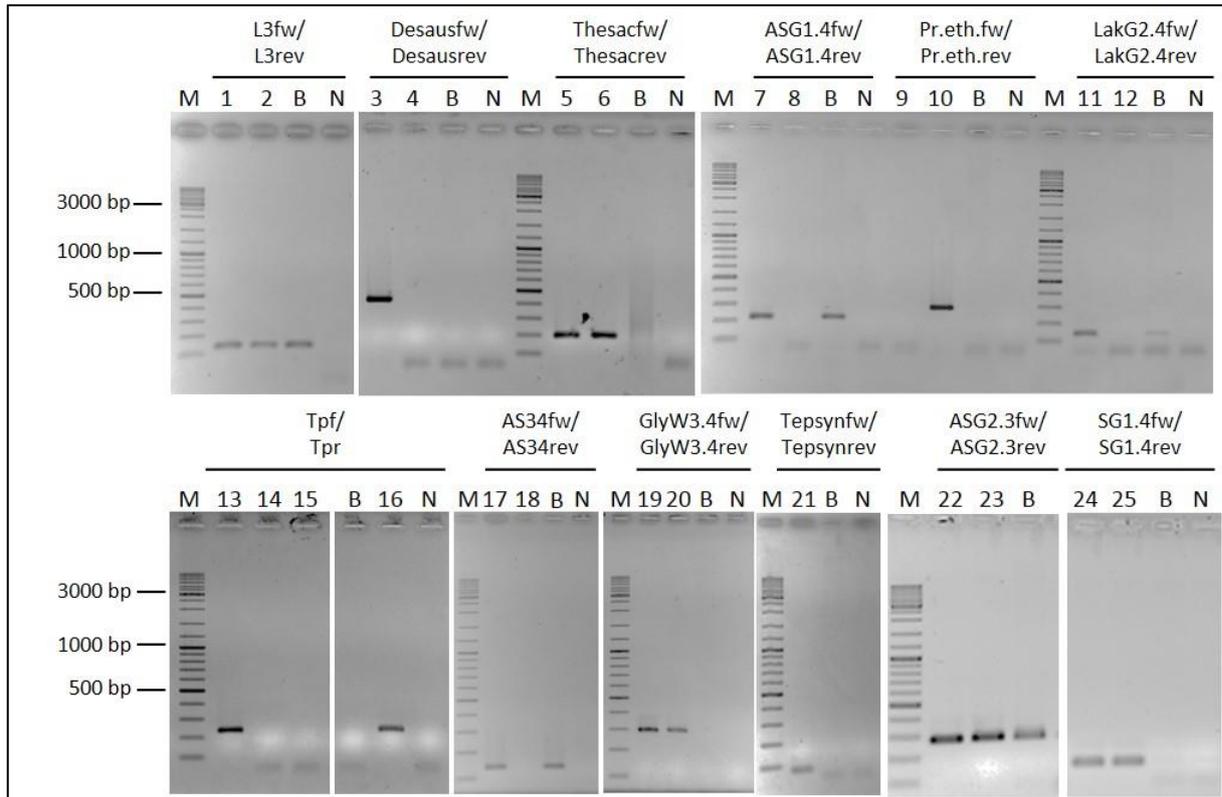
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	94°C	1 min
3	Annealing	59°C	0,5 min
4	Elongation	72°C	0,5 min
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72°C	10 min

Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich folgendermaßen zusammen.

PCR-Ansatz (1x, 50 µl)

Forward-Primer: Isolat-spezifischer Primer (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer: Isolat-spezifischer Primer (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Enhancer Solution (5x)	5 µl
PCR-Wasser	32,6 µl
Taq-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen) (5 U/µl)	0,4 µl
Template-DNA	2 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Die Auswertung der PCR erfolgte wie in Abschnitt II.1.2.9 beschrieben. **Abbildung 8** zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen der Isolate, Referenzstämmen und Biogasanlagen mit den entwickelten Primerpaaren.



**Abbildung 8:** PCR-Amplifikate zur Detektion spezifischer Bereiche des 16S rRNA-Gens. Getestet wurden mit dieser PCR die für Isolate und Referenzstämme entwickelten spezifischen Primerpaare. Die PCR wurde mit DNA der Isolate, der Referenzstämme oder der Biogasanlagen durchgeführt. Verwendete Primerpaare (Tabellen 24 und 25) sind über den Gelbildern markiert.

1 = Stamm L3, 2 = *Defluviitoga tunisiensis* DSM-23805, 3 = Stamm L14, 4 = Stamm SG1.1 (als Negativkontrolle), 5 = Stamm Gluc4, 6 = Stamm Gluc2, 7 = Stamm ASG1.4, 8 = *Proteiniborus ethanoligenes* DSM-21650, 9 = Stamm ASG1.4, 10 = *Proteiniborus ethanoligenes* DSM-21650, 11 = Stamm LG2.4, 12 = *Dendrosporobacter quercicolus* DSM-1736, 13 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804, 14 = Stamm AS34, 15 = Stamm AS46, 16 = Stamm LakSH101, 17 = Stamm AS34, 18 = *Tepidanaerobacter acetatoxydans* DSM-21804, 19 = Stamm GlyW3.4, 20 = *Selenomonas bovis* DSM-23594, 21 = Stamm LakSH53B, 22 = Stamm ASG2.3, 23 = *Clostridium sporosphaeroides* DSM-1294, 24 = Stamm SG1.4, 25 = *Clostridium kluverii* DSM-555, B = Biogasanlage, M = Marker (vgl. Abschnitt 2.7.3), N = Negativkontrolle.

Wie aus **Abbildung 8** deutlich wird, konnten entsprechende PCR-Produkte mit DNA der Isolate und ihren nächsten Verwandten mit den Primerpaaren L3fw/rev (Amplifikatlänge: 130 bp), GlyW34fw/rev (Amplifikatlänge: 297 bp), ASG2.3fw/rev (Amplifikatlänge: 282 bp) und SG14fw/rev (Amplifikatlänge: 146 bp) amplifiziert werden. Des Weiteren konnten die Isolate L14 (99% *Desulfotomaculum australicum*) und LakSH53B (100% *Tepidanaerobacter syntrophicus*) in Amplifikationen mit den Primerpaaren Desausfw/Desausrev (Amplifikatlänge: 419 bp) bzw. Tepsynfw/Tepsynrev (Amplifikatlänge: 75 bp) jeweils ein PCR-Produkt in entsprechender Größe bilden. Mit dem gruppenspezifischen Primerpaar Thesacfw/rev (Amplifikatlänge: 198 bp) und mit DNA der Isolate Gluc2 und Gluc4 konnten in den PCR-Reaktionen Amplifikate in erwarteter Größe festgestellt.

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

Zusammenfassend gibt **Tabelle 24** einen Überblick über die verwendeten Primer, die Zielorganismen und die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte. Weiterhin ist aufgeführt, ob die Isolat-spezifischen Primer auch an die DNA der jeweils nächstverwandten Typstämme der DSMZ banden. In der letzten Spalte ist vermerkt, welche Organismen durch die Primer detektiert werden können. Im Falle des Primerpaares Thesacfw/rev wird eine sehr große Gruppe getroffen, in der neben der Gattung *Thermoanaerobacterium* auch viele Arten der Gattungen *Bacillus*, *Paenibacillus* und viele weitere unterschiedliche Arten getroffen werden. Jedoch muss hierbei erwähnt werden, dass laut der oben genannten Datenbanken die Primer mit der DNA überlappende Sequenzen aufweisen. Ob ein PCR-Produkt mit den Primern entsteht, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden.

**Tabelle 24:** Spezifität der mittels Primer-Blast entwickelten Isolat-spezifischen Primer.

Zielorganismus (% nächster Verwandter)	Isolat-spezifische Primer <sup>1</sup>	PCR- Produkt [bp]	PCR-Produkt mit DSMZ- Typstamm	Abgleich mit Datenbank
Bacteria	Bac338f <sup>2</sup>	468	n.d.	n.d.
	Bac805R <sup>2</sup>			
L14 (99% <i>Desulfotomaculum australicum</i> )	Desausfw	419	n.d.	<i>Desulfotomaculum australicum</i>
	Desausrev			
GlyW3.4 (97% <i>Selenomonas bovis</i> )	GlyW34fw	297	+ (DSM-23594)	<i>Selenomonas bovis</i>
	GlyW34rev			
<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	Pr.eth.fw	284	+ (DSM-21650)	<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>
	Pr.eth.rev			
ASG2.3 (98,7% <i>Clostridium sporosphaeroides</i> )	ASG2.3fw	282	+ (DSM-1294)	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>
	ASG2.3rev			
<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	Tpf <sup>3</sup>	237	+ (DSM-21804)	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>
	Tpr <sup>3</sup>			
ASG1.4 (96% <i>Proteiniborus ethanoligenes</i> )	ASG1.4fw	220	- (DSM-21650)	nur Isolat
	ASG1.4rev			
Gluc4 (99% <i>Thermoanaerobact. thermosaccharolyticum</i> )	Thesacfw	198	n. d.	5
	Thesacrev			
SG1.4 (99% <i>Clostridium kluyveri</i> )	SG14fw	146	+ (DSM-555)	<i>Clostridium kluyveri</i>
	SG14rev			
LG2.4 (99% <i>Dendrosporobacter quercicolus</i> )	LakG2.4fw	138	- (DSM-1736)	nur Isolat
	LakG2.4rev			
AS34 (96% <i>Tepidanaerobacter sp.</i> )	AS34fw	137	- (DSM-21804)	nur Isolat
	AS34rev			
L3 (100% <i>Defluviitoga tunisiensis</i> )	L3fw	130	+ (DSM-23805)	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>
	L3rev			
<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	Tepsynfw	75	n.d.	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>
	Tepsynrev			

+ PCR-Produkt mit Primerpaar, - kein PCR-Produkt mit Primerpaar, n.d. nicht durchgeführt  
Verwendete DSMZ-Typstämme: DSM-23594 (*Selenomonas bovis*), DSM-21650 (*Proteiniborus ethanoligenes*), DSM-1294 (*Clostridium sporosphaeroides*), DSM-21804 (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*), DSM-555 (*Clostridium kluyveri*), DSM-1736 (*Dendrosporobacter quercicolus*), DSM-23805 (*Defluviitoga tunisiensis*)

<sup>1</sup> Die Sequenzen zu den Primern sind der **Tabelle 25** aufgeführt.

<sup>3</sup> YU *et al.* 2005

<sup>4</sup> WESTERHOLM *et al.* 2011a

<sup>5</sup> überlappende Sequenzen der Primer mit der DNA folgender Arten: [*Clostridium*] *cellulolyticum*, [*Clostridium*] *cellulosi*, [*Clostridium*] *clariflavum*, [*Clostridium*] *stercorarium*, [*Clostridium*] *sticklandii*, [*Flavobacterium*] *thermophilum*, *Acetobacterium woodii*, *Advenella kashmirensis*, *Advenella mimigardefordensis*, *Aeribacillus pallidus*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alkalibacillus almalla-hensis*, *Alkalibacillus haloalkaliphilus*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Alkaliphilus oremlandii*, *Alteromonas australica*, *Ammoniiibacillus agariperforans*, *Anaerobranca horikoshii*, *Anaerococcus prevotii*, *Anaerolinea thermophila*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus* [Fortsetzung der Tabelle 24 auf Seite 214]

[Fortsetzung der Tabelle 24] *kualawohkensis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus alveayuensis*, *Bacillus badius*, *Bacillus baekryungensis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus foraminis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus horneckiae*, *Bacillus jeotgali*, *Bacillus lehensis*, *Bacillus methanolicus*, *Bacillus niacini*, *Bacillus oceanisediminis*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus subterraneus*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Clostridium acidurici*, *Clostridium stercorarium* subsp. *stercorarium*, *Clostridium thermocellum*, *Cohnella formosensis*, *Cohnella xylanilytica*, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfosporosinus meridiei*, *Desulfotomaculum gibsoniae*, *Desulfotomaculum thermocisternum*, *Desulfurispirillum indicum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Ethanoligenens harbinense*, *Eubacterium acidaminophilum*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium siraeum*, *Exiguobacterium antarcticum*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Fictibacillus barbaricus*, *Filifactor alocis*, *Finegoldia magna*, *Gottschalkia acidurici*, *Halobacillus halophilus*, *Halobacillus karajiensis*, *Helcococcus seattlensis*, *Kurthia gibsonii*, *Kyrpidia tusciae*, *Lactococcus garvieae*, *Mahella australiensis*, *Methylobacillus flagellatus*, *Moorella thermoacetica*, *Paenibacillus beijingensis*, *Paenibacillus borealis*, *Paenibacillus campinasensis*, *Paenibacillus durus*, *Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus lentus*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus sabiniae*, *Paenibacillus stellifer*, *Paenibacillus terrae*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *Parvimonas micra*, *Pectinatus frisingensis*, *Pellicola europaea*, *Pelosinus fermentans*, *Peptoniphilus lacrimalis*, *Planococcus halocryophilus*, *Ruminiclostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bicirculans*, *Ruminococcus champanellensis*, *Selenomonas ruminantium* subsp. *Lactilytica*, *Selenomonas sputigena*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Terribacillus aidingensis*, *Tetragenococcus halophilus*, *Tetragenococcus solitarius*, *Thermacetogenium phaeum*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *Mathranii*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Thermobacillus composti*, *Thiomonas intermedia*, *Trichococcus pasteurii*, *Virgibacillus halodenitrificans*, *Virgibacillus proomii*

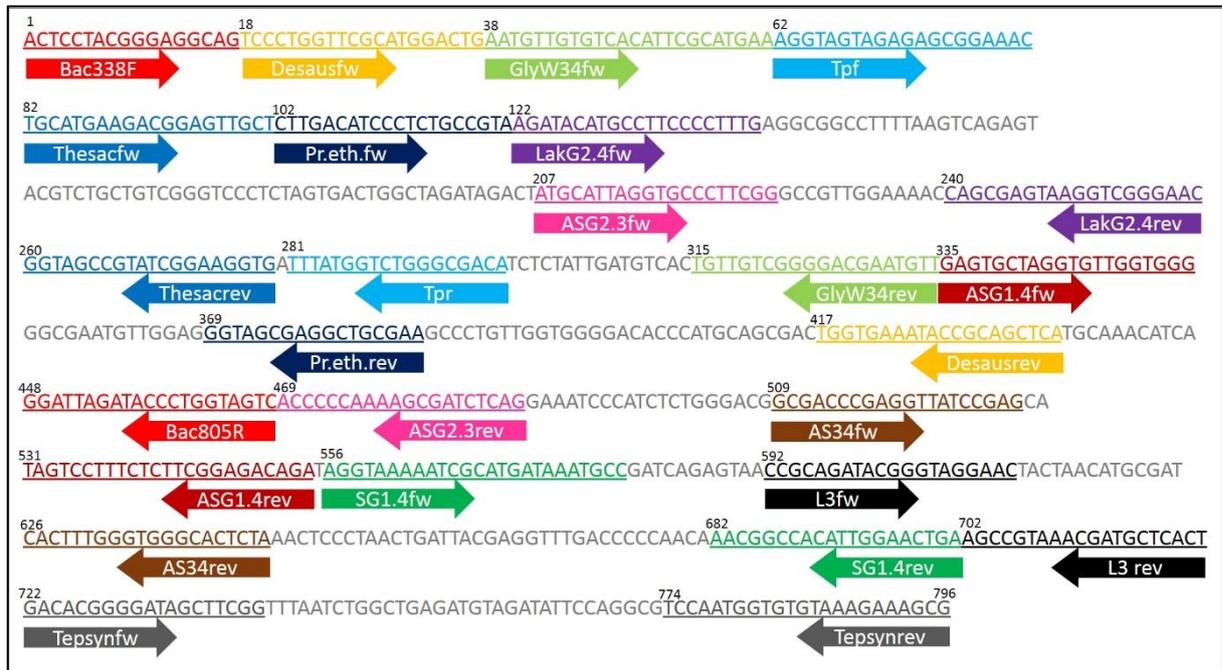
#### II.1.2.14 Titerbestimmung der Isolate in Biogasanlagen mittels qPCR

Die Quantifizierung der Isolate in Biogasanlagen wurde mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR nach der Methode von MAY *et al.* (2015) durchgeführt. Gemäß dieser Methode wurden die Primer, welche bei der Realtime-PCR verwendet werden sollten, in einer synthetischen DNA-Sequenz zusammengefasst. Diese Sequenz wurde anschließend für die Quantifizierung verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in **Tabelle 25** entwickelten Isolat-spezifischen Primer und die beiden Primer aus der Literatur (YU *et al.* 2005, WESTERHOLM *et al.* 2011a) für die Konstruktion einer solchen synthetischen DNA-Sequenz verwendet.

Die Konstruktion dieser synthetischen DNA-Sequenz erfolgte in 5'-3'-Richtung. Die forward-Primer konnten für die Konstruktion verwendet werden, dagegen mussten die revers-Primer eines Primer-Paares zunächst revers-komplementär mit dem Programm „Reverse complement“ ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html); Stand: 16.08.2015) umgeschrieben werden. Anschließend wurde mit dem Programm Word (Microsoft Office, 2010) eine synthetische DNA-Sequenz zusammengestellt, welche die Isolat-spezifischen Primer enthält. Bei der Erstellung der Sequenz wurde berücksichtigt, dass die Länge der mittels Primer-Blast vorhergesagten und durch PCR bestätigten PCR-Produktlänge entsprach. Für das Auffüllen von Lücken zwischen den Primern wurde mit Hilfe des Programms „Random DNA Sequence Generator“ (<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>; Stand: 16.08.2015) willkürliche DNA-Sequenzen generiert und in die Sequenz eingefügt.

**Abbildung 9** zeigt die konstruierte synthetische DNA-Sequenz für die 13 Primerpaare (**Tabelle 26**), welche eine Länge von 796 bp besaß.



**Abbildung 9:** Synthetische DNA-Sequenz (796 bp) für die Herstellung eines Standards für die quantitative Realtime-PCR. Die Sequenzen der Primerpaare sind in der entsprechenden Farben markiert. Basenpaare, die als Spacer zwischen den Primer-Sequenzen dienen, sind grau gefärbt. Informationen zu den Primern sind in der **Tabelle 25** aufgeführt.

Die in **Abbildung 9** dargestellte synthetische DNA-Sequenz wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert und in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pEX-A2 kloniert. Die konstruierte DNA-Sequenz war in dem Plasmid von den Schnittstellen des *NotI*-Restriktionsenzym flankiert. Bei der Konstruktion der DNA-Sequenz wurde daher darauf geachtet, dass in dieser Sequenz die *NotI*-Schnittstelle (Schnittstelle 5'-GC<sup>^</sup>GGCCGC-3') nicht vorkam.

**Tabelle 25** gibt einen zusammenfassenden Überblick über die bei der quantitativen qPCR verwendeten Primer sowie über deren Länge, Schmelztemperatur und GC-Gehalt. Weiterhin ist aufgeführt, welche zum Primer passende Sequenz im Plasmid vorlag und welche Länge das zu erwartende PCR-Produkt hatte.

**Tabelle 25:** Überblick über die bei der quantitativen Realtime-PCR verwendeten Isolatspezifischen Primer, welche an das 16S rRNA-Gen binden.

Zielorganismus	Primer	Primersequenz (5'-3')	Länge [bp]	Tm [°C]	GC-Gehalt [%]	Sequenz im Plasmid	PCR-Produkt [bp]	Literatur
Bacteria	Bac338F	ACTCTACGGAGGCGAG	17	63,4	64,7	ACTCTACGGAGGCGAG	468	Yu et al. 2005
	Bac805R	GACTACAGGGTATCTAATCC	20	60,7	47,6	GGATTAGATACCCTGGTAGTGC		
L14	Desausfw	TCCCTGGTTCGATGGACTG	20	61,4	60	TCCCTGGTTCGATGGACTG	419	diese Arbeit
	Desausrev	TGAGCTCGGGTATTTACCA	20	57,3	50	TGGTGAATACCGCAGCTCA		
Gly Wagner 3.4	GlyW34fw	AATGTTGTGCACATTCGCATGAA	24	57,6	37,5	AATGTTGTGCACATTCGCATGAA	297	diese Arbeit
	GlyW34rev	AACATTCGTCCTCCGACAACA	20	57,3	50	TGTTGTCGGGGAGCAATGTT		
<i>Proteithorbus ethanoliigenes</i>	Pr.eth.fw	CTTGACATCCCTCTGCCCGTA	20	59,4	55	CTTGACATCCCTCTGCCCGTA	284	diese Arbeit
	Pr.eth.rev	TTCGCAGCCTCGCTACC	17	57,6	64,7	GGTAGCGAGGCTGGCAA		
AS Gebel 2.3	ASG2.3fw	ATGCATTAGGTGCCCTTCGG	20	59,4	55	ATGCATTAGGTGCCCTTCGG	282	diese Arbeit
	ASG2.3rev	CTGAGATCGCTTTTGGGGGT	20	59,4	55	ACCCCAAAAGCGATCTCAG		
<i>Teplidanaerobacter acetatoxydans</i>	Tpf	AGGTAGTAGAGAGCGGAAAC	20	57,3	50	AGGTAGTAGAGAGCGGAAAC	237	Westerholm et al. 2011a
	Tpr	TGTCGCCCGAGACATAAA	18	53,7	50	TTTTATGGTCTGGCGCACA		
AS Glahn 1.4	ASG1.4fw	GAGTGTAGGTGTTGGTGGG	20	61,4	60	GAGTGTAGGTGTTGGTGGG	220	diese Arbeit
	ASG1.4rev	TCTGTCTCCGAAAGAAAAGGACTA	24	61	45,8	TAGTCCCTTTCTCTCCGAGACAGA		
Gluc4	Thesacfw	TGCATGAAGACGGAGTTGCT	20	57,3	50	TGCATGAAGACGGAGTTGCT	198	diese Arbeit
	Thesacrev	CACCTCCGATACGGCTACC	20	61,4	60	GGTAGCCGTATCGGAAGGTG		
SG14	SG1.4fw	AGGTAATAATCGCATGATAAATGCC	28	58,1	36	AGGTAATAATCGCATGATAAATGCC	146	diese Arbeit
	SG1.4rev	TCAGTTCCAATGTGGCCGTT	20	57,3	50	AACGGCCACATTTGMACTGA		
Lak Gebel 2.4	LakG2.4fw	AGATACATGCCCTCCCCCTTTG	21	57,9	47,6	AGATACATGCCCTCCCCCTTTG	138	diese Arbeit
	LakG2.4rev	GTTCGCCGACCTTACTCGCTG	20	61,4	60	CAGCGAGTAAGGTCGGGAAC		
AS34	AS34fw	GCGACCCGAGGTTATCCGAG	20	63,5	65	GCGACCCGAGGTTATCCGAG	137	diese Arbeit
	AS34rev	TAGAGTGCCCAACCCAAAGTG	20	59,4	55	CACCTTTGGGTGGGCACCTTA		
L3	L3fw	CCGCAGATACGGGTAGGAAC	20	61,4	60	CCGCAGATACGGGTAGGAAC	130	diese Arbeit
	L3rev	AGTGAGCATCGTTTACGGCT	20	57,3	50	AGCCGTAACCGATGCTCACT		
<i>Teplidanaerobacter syntrophicus</i>	Tepsynfw	GACACGGGGATAGCTTCGG	19	61	63,2	GACACGGGGATAGCTTCGG	75	diese Arbeit
	Tepsynrev	CGCTTTCTTTACACACCACTTGA	23	58,9	43,5	TCCAATGGTGTGTAAGAAGGCG		

bp = Basenpaare, Tm = Schmelztemperatur

Nach Erhalt des Plasmids mit der konstruierten Sequenz, wurde das Plasmid zunächst in 30 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, um die synthetische DNA-Sequenz mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem Plasmid zu schneiden: 16 µl PCR-Wasser, 2 µl Buffer O 10x, 0,5 µl Plasmid-DNA und 1,5 µl *NotI*-Restriktionsenzym wurden zu einem 20 µl Restriktionsansatz vereinigt. Die Inkubation erfolgte 1,5 Stunden bei 37°C und die Inaktivierung des Restriktionsenzymes 20 Minuten bei 80°C. Das Restriktionsenzym und der dazugehörige Puffer wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Anschließend wurde das Insert des Plasmids mit Hilfe der *pfu*-Taq-Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) amplifiziert. Hierzu wurden als Primer der erste Primer (Bac338F) und der letzte Primer (Tepsynrev) der synthetischen DNA-Sequenz verwendet (vgl. **Abbildung 8**), um das gesamte DNA-Fragment zu amplifizieren. Das verwendete PCR-Programm ist in **Tabelle 26** wiedergegeben.

**Tabelle 26:** PCR-Programm für die Amplifizierung der synthetischen DNA-Sequenz.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95°C	3 min
2	Denaturierung	95°C	0,5 min
3	Annealing	58°C	0,5 min
4	Elongation	72°C	1,5 min
5	30 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72°C	10 min

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz (1x, 50 µl)

Forward-Primer: Bacfw (10 µM)	2,5 µl
Reverse-Primer: Tepsynrev (10 µM)	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,25 µl
10x Pfu Buffer with MgSO <sub>4</sub>	5 µl
PCR-Wasser	37,75 µl
Pfu-Taq-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	2,5 µl
Template-DNA (Produkt aus Restriktionsverdau)	3 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel bei 100 Volt für 60 Minuten. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die Bande in der erwarteten Größe von ca. 800 bp mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „GenElute™ GelExtraktion“-Kit von Sigma (St. Louis, USA) extrahiert. Danach wurde das PCR-Amplifikat mit dem Gerät BioPhotometer Plus (Eppendorf,

Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Mit der ermittelten DNA-Konzentration (45 ng/ $\mu$ l) und der Gleichung nach GODORNES *et al.* (2007) konnte die Anzahl der Kopien/ml bestimmt werden. Eine dekadische Verdünnungsreihe des Standards von  $10^{11}$  bis  $10^4$  Kopien/ml wurde in Nuklease-freiem PCR-Wasser hergestellt. Die quantitative Realtime-PCR wurde in einem realplex<sup>2</sup> ep gradient S Mastercycler der Firma Eppendorf und der dazugehörigen Software zur Quantifizierung realplex 2.2 durchgeführt. Die PCR wurden mit iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Biorad, Hercules, USA) in weißen EasyStrip snap tubes der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Das PCR-Programm ist in **Tabelle 27** aufgeführt.

**Tabelle 27:** Programm der quantitativen Realtime-PCR

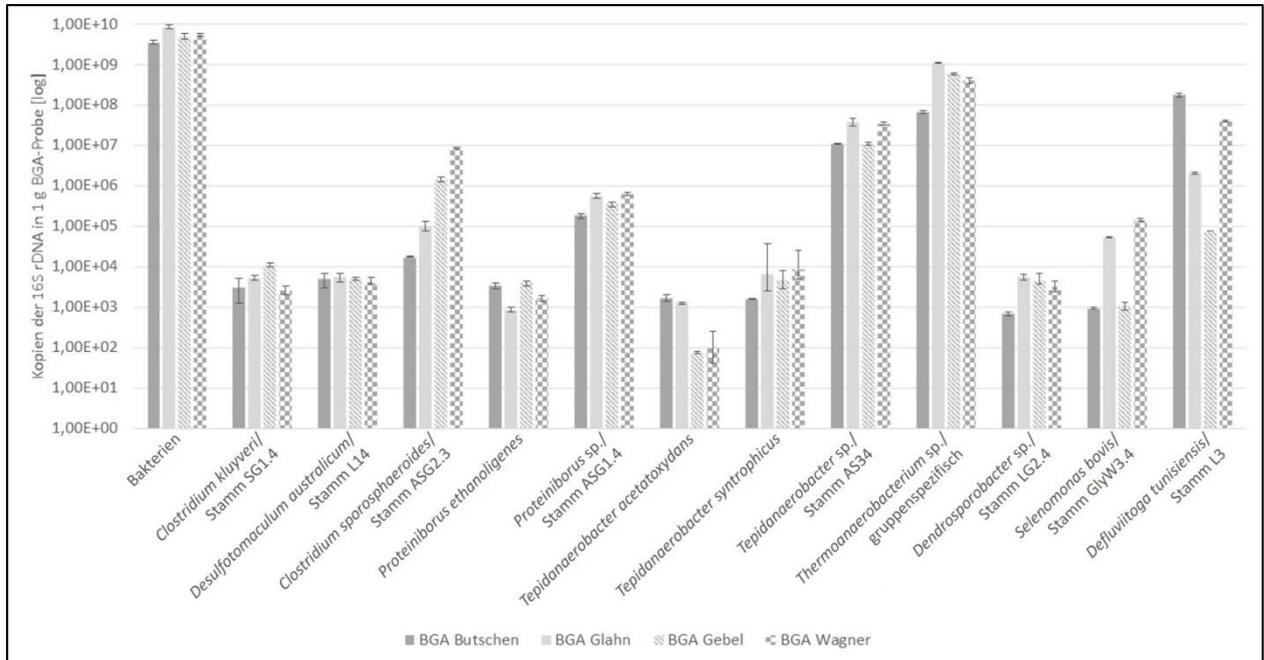
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	95°C	15 s
3	Annealing	59°C	30 s
4	Elongation	72°C	20 s
5	40 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Schmelzkurve	95°C	15 s
7		60°C	15 s
8	Temperaturanstieg	60°C (+ 1°C)	1 min
9	35 Zyklen beginnend bei Nr. 8		
10		95°C	15 s

PCR-Ansatz (1x, 20  $\mu$ l)

Forward-Primer: (10 $\mu$ M)	0,75 $\mu$ l
Reverse-Primer: (10 $\mu$ M)	0,75 $\mu$ l
Puffer SYBR Green	7 $\mu$ l
PCR-Wasser	37,75 $\mu$ l
Template-DNA	1,5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Bei der Quantifizierung wurden pro Primerpaar der Standard und die Negativkontrolle in einer Vierfachbestimmung, die einzelnen Biogasanlagen in einer Dreifachbestimmung mitgeführt. Nach der Amplifizierung wurde mit dem Programm Excel (Microsoft Office, 2010) Kalibrierungsgeraden erstellt. Dazu wurden die durch die Realtime-PCR erhaltenen cycle-treshold (ct)-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl/ml aufgetragen. Mit der daraus resultierenden Geradengleichung konnte die Kopienzahl/ml in den einzelnen Biogasanlagen für jedes Primerpaar berechnet werden. Bei der Geradengleichung wurde darauf geachtet, dass das Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,99$  war.

Abbildung 10 und Tabelle 28 zeigen die Ergebnisse, welche mittels der quantitativen Realtime-PCR erzielt werden konnten.



**Abbildung 10:** Quantifizierung verschiedener Isolate und Arten in Biogasanlagen. Verwendet wurden spezifische Primerpaare, welche Teilbereiche der 16S rDNA amplifizieren. Mit Hilfe der qPCR wurden DNA-Proben der BGA Butschen, Glahn, Gebel und Wagner untersucht. Verwendete Primerpaare sind in **Tabelle 25** zusammengefasst. Fehlerbalken zeigen die Minimal- und Maximalwerte von zwei oder drei PCR-Reaktionen an. Die Werte zu dieser Abbildung sind in **Tabelle 28** aufgeführt.

**Tabelle 28:** Rohdaten der bestimmten Kopien des 16S rDNA-Gens in 1 g Biogasanlagen-Probe.

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

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

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

Bei den folgenden Werten handelt es sich um die berechneten Kopien der 16S rDNA, welche in 1 g Biogasanlagen-Probe enthalten waren. In den vier untersuchten Biogasanlagen Butschen, Glahn, Gebel und Wagner konnten mit dem Primerpaar Bac338F/Bac805R (Yu *et al.* 2005) zwischen  $3,45 \times 10^9$  und  $8,15 \times 10^9$  Kopien der 16S rDNA an Gesamtbakterien ermittelt werden. *Desulfotomaculum australicum* (Isolat L14), *Proteiniborus ethanolicus*, *Clostridium kluyveri* (Isolat SG1.4) und *Tepidanaerobacter syntrophicus* wiesen in den vier untersuchten Biogasanlagen Werte im Bereich von ca.  $10^3$  Kopien der 16S rDNA auf. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Primer Tpf/Tpr; WESTERHOLM *et al.* 2011a) zeigte in den Biogasanlagen Butschen und Glahn  $10^3$  Kopien der 16S rDNA und in den anderen beiden Biogasanlagen geringere Mengen ( $10^1$  bis  $10^2$  Kopien). Im Gegensatz dazu wurde Isolat AS34 (96% *Tepidanaerobacter* sp.) mit höheren Werten in allen vier Biogasanlagen detektiert (ca.  $10^7$  Kopien der 16S rDNA). Isolat ASG1.4 zeigte in den untersuchten Biogasanlagen höhere Kopienzahlen (ca.  $10^5$  Kopien) im Vergleich zu dessen nächsten Verwandten *Proteiniborus ethanolicus* (ca.  $10^3$  Kopien). Mit dem gruppenspezifischen Primer Thesacfw/rev wurden Werte zwischen  $6,55 \times 10^7$  und  $1,07 \times 10^9$  Kopien der 16S rDNA detektiert.

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

#### II.1.2.15 Genomannotation von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3

Isolat L3 (100% *Defluviitoga tunisiensis*) wurde für die Gesamtgenomsequenzierung durch das CeBiTec der Universität Bielefeld ausgewählt. Dieses Bakterium wurde aus der thermophilen Biogasanlage in Viersen isoliert und gehört dem Phylum der Thermotogae an. Die Art *Defluviitoga tunisiensis* wurde aus einem Molke-Fermenter isoliert und erst im Jahr 2012 beschrieben (BEN HANIA *et al.* 2012). Da bisher noch kein Gesamtgenom für diese Art vorliegt und mit dem Isolat L3 aus einer thermophilen Biogasanlage nun ein zweiter biotechnologischer Prozess bekannt ist, in welchem dieser Organismus eine Rolle spielt, wurde dieses Isolat für die Gesamtgenomsequenzierung ausgesucht. Das Isolat L3 wurde in dem DSMZ-Medium 1328 (DSMZ 2012b) kultiviert. Die DNA wurde mit dem Blood and Tissue-Kit (Abschnitt II.1.2.7) isoliert. Das Isolat L3 *Defluviitoga tunisiensis* wurde in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) als DSM-29926 hinterlegt und dessen Genomse-

quenz bei der Datenbank EMBL (EBI) unter der Accession-Nr. LN824141. Das Gesamtgenom wurde inzwischen analysiert und wurde in diesem Jahr in einem Genome-Announcement veröffentlicht: MAUS *et al.* (2015a) Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. J Biotechnol 203:17-18.

In Zusammenarbeit mit Irena Maus vom CeBiTec wurde das Genom von Isolat L3 manuell annotiert. Die Genomannotation wurde mit dem Programm GenDB, einem automatischen Genomannotationssystem für prokaryotische Genome, durchgeführt.

Bei der Annotation wurden die Aminosäure-Sequenz eines Gens mit verschiedenen Datenbanken verglichen (Stand: 16.08.2015):

BLASTP: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

MetaCyc: <http://metacyc.org/>

Pfam: <http://pfam.xfam.org/search>

Priam: [http://prodomweb.univ-lyon1.fr/priam/BLAST\\_SERVER/rpsblast.html](http://prodomweb.univ-lyon1.fr/priam/BLAST_SERVER/rpsblast.html)

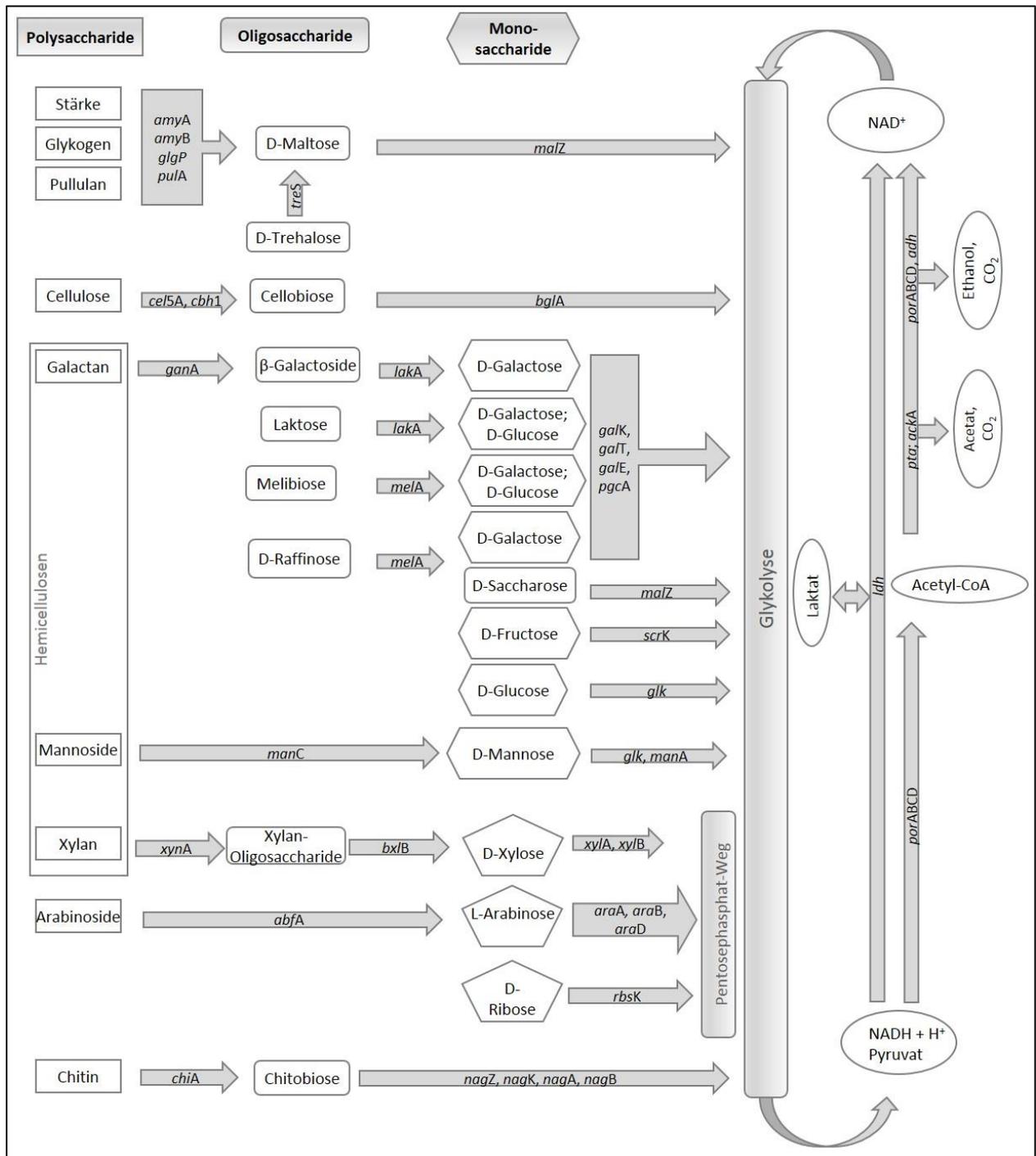
ENZYME: <http://enzyme.expasy.org>

Für die Annotation der Proteine wurden folgende Kriterien gewählt: der Schwellenwert für den E-Wert der verwendeten Datenbanken wurde als e-20 festgelegt und die Proteinsequenzen sollten mindestens eine Identität von 30% aufweisen (ROST 1999).

Bei der manuellen Genomannotation konnten viele Gene identifiziert werden, welche am Abbau von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Oligosaccharide, Monosaccharide) beteiligt sein könnten. Diese und weitere Gene sind in **Tabelle 29** zusammengefasst. Für verschiedene Kohlenhydrate konnten Stoffwechselwege rekonstruiert werden. In **Abbildung 11** ist schematisch dargestellt, welche Gene für den Abbau von Polysacchariden, Disacchariden und Monosacchariden im Genom von Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 gefunden wurden. Es konnten Gene identifiziert werden, welche in den Abbau von Strukturpolysacchariden der pflanzlichen Zellwand (Cellulose, Pectin und Hemicellulosen wie Xylan, Galactan und Mannan), des Strukturpolysaccharids Chitin und von Speicherpolysacchariden (Stärke, Glycogen, Pullulan und Lichenin) involviert sein könnten. In der Glycolyse können die beim Abbau entstehenden Kohlenhydrate weiter abgebaut werden (**Abbildung 11**). Alle an der Glycolyse beteiligten Gene konnten im Genom von Stamm L3 gefunden werden. Die gebildeten Reduktionsäquivalente könnten bei der Bildung von Acetat und Kohlenstoffdioxid oder durch die Bildung von Ethanol regeneriert werden. Vermutlich kann Pyruvat durch eine bifunktionale Pyruvatferredoxin-Oxidoreductase (PorABCD) zu Acetaldehyd oder Acetyl-CoA decarboxyliert werden (ERAM *et al.* 2015).

Der Citratzyklus konnte nicht vollständig rekonstruiert werden, da nur drei Gene des Citratzyklus im Genom identifiziert werden konnten (Gen *idh*, Isocitrat-Dehydrogenase; Gen *korAB*, 2-Oxoglutarat-Oxidoreductase; Gen *fumA*, Fumarat-Hydratase). Des Weiteren

ren wurden Gene gefunden, welche einen unvollständigen Methylmalonyl-CoA-Weg kodieren. Hierbei wurden die Gene *mcm* (Methylmalonyl-CoA-Mutase), *mmcE* (Methylmalonyl-CoA-Epimerase), *mmc* (Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase), *pduL* (Phosphat-Propanoyltransferase) und *tdcD* (Propionat-/Acetatkinase) detektiert.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Kohlenhydrat-Metabolismus von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3. Angegeben sind die Gene, welche im Genom für die Verwertung von Oligosacchariden, Disacchariden und Monosacchariden gefunden werden konnten. Weitere Informationen zu den Genen sind in **Tabelle 29** gegeben.

**Tabelle 29:** Annotierte Gene im Genom von *Defluviitoga tunisiensis* L3. Aufgeführt sind Gene, welche im Abbau von Kohlenhydraten eine Rolle spielen sowie Gene des Propionsäuremetabolismus und Citratzyklus.

Gen	Genprodukt	EC- Nummer	Locus tag
<b>Abbau von Glucose/Glykolyse</b>			
<i>xy/EFK</i> <sup>1</sup>	Glucose/Xylose-Transporter		DTL3_1318, DTL3_1319, DTL3_1320
<i>glk</i>	Glucokinase	2.7.1.2	DTL3_1850
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	5.3.1.9	DTL3_0517
<i>pfk</i>	Phosphofruktokinase	2.7.1.11	DTL3_1375, DTL3_1428, DTL3_1758
<i>fba</i>	Fructose-1,6-bisphosphat- Aldolase	4.1.2.13	DTL3_0485
<i>tpi</i>	Triosephosphat-Isomerase	5.3.1.1	DTL3_1281
<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	1.2.1.12	DTL3_1279
<i>pgk</i>	3-Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	DTL3_1280
<i>gpm</i>	Phosphoglycerat-Mutase	5.4.2.11	DTL3_0933, DTL3_1207
<i>eno</i>	Enolase	4.2.1.11	DTL3_1441
<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	2.7.1.40	DTL3_1376
<b>Abbau von Cellulose/Cellobiose</b>			
<i>dpp/opp</i> ABCDF <sup>2</sup>	Cellobiose-Transporter		DTL3_1189, DTL3_1190, DTL3_1191, DTL3_1192, DTL3_1193
<i>cel5A</i>	Cellulase (Endo-1,4- $\beta$ -D- Glucanase)	3.2.1.4	DTL3_1188
<i>cbh1</i>	Cellulose 1,4- $\beta$ -Cellobiosidase	3.2.1.91	DTL3_1330
<i>bglA</i>	$\beta$ -Glucosidase (cytosolisch)	3.2.1.21	DTL3_1194
<b>Abbau von Galactan, Laktose, Galactose, Stachyose, Melibiose</b>			
<i>ganA</i>	Arabinogalactan-endo-1,4- $\beta$ - Galactanase	3.2.1.89	DTL3_1072
<i>ganEFG</i>	Galactosid-Transporter		DTL3_0430, DTL3_0431, DTL3_0432
<i>malEFG</i> <sup>5</sup>	Maltose/Oligosaccharid- Transporter		DTL3_0899, DTL3_0900, DT3_0901, DTL3_1091, DTL3_1092, DT3_1093 DTL3_1287, DTL3_1288, DT3_1289
<i>lacA</i>	$\beta$ -Galactosidase	3.2.1.23	DTL3_1070
<i>galK</i>	Galaktokinase	2.7.1.6	DTL3_1073
<i>galT</i>	Galactose-1-phosphat- Uridyltransferase	2.7.7.12	DTL3_1074
<i>galE</i>	UDP-Glucose-4-Epimerase	5.1.3.2	DTL3_0236, DTL3_0519
<i>pgcA</i>	Phosphoglucomutase	5.4.2.2	DTL3_1435
<i>melA</i> <sup>3</sup>	$\alpha$ -Galactosidase	3.2.1.22	DTL3_0119
<i>malZ</i>	$\alpha$ -Glucosidase	3.2.1.20	DTL3_0809, DTL3_1214
<i>scrK</i>	Fructokinase	2.7.1.4	DTL3_0557

[Fortsetzung der Tabelle 29 auf Seite 225]

[Fortsetzung Tabelle 29]

<b>Abbau von Mannose/Mannoside</b>			
<i>mtpEFGKL</i>	Mannosid-Transporter		DTL3_1510, DTL3_1511, DTL3_1512, DTL3_1513, DTL3_1514
<i>manC</i>	Glycosylase (GH32)		DTL3_0702
<i>glk</i>	Glucokinase	2.7.1.2	DTL3_1850
<i>manA</i>	Mannose-6-phosphat- Isomerase	5.3.1.8	DTL3_1173
<b>Abbau von Xylan, Xylose, Arabinose und Ribose</b>			
<i>xynA</i>	Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase	3.2.1.8	DTL3_1324
<i>xtpELKGF</i>	Xylan-Oligosaccharid- Transporter		DTL3_1331, DTL3_1332, DTL3_1333, DTL3_1334, DTL3_1335
<i>xloELKGF</i>	Xylan-Oligosaccharid- Transporter		DTL3_1337, DTL3_1338, DTL3_1339, DTL3_1340, DTL3_1341
<i>bxIB</i> <i>xy/EFK</i> <sup>1</sup>	$\beta$ -Xylosidase Glucose/Xylose- Transporter	3.2.1.37	DTL3_1036, DTL3_1342 DTL3_1318, DTL3_1319, DTL3_1320
<i>xylA</i>	Xylose-Isomerase	5.3.1.5	DTL3_1317, DTL3_1321
<i>xyIB</i>	Xylulokinase	2.7.1.17	DTL3_1049, DTL3_1162, DTL3_1315
<i>araEFG</i>	Arabinosid-Transporter		DTL3_0419, DTL3_0420, DTL3_0421, DTL3_0422, DTL3_0423
<i>abfA</i>	$\alpha$ -L- Arabinofuranosidase	3.2.1.55	DTL3_0418
<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase	5.3.1.4	DTL3_0424
<i>araB</i>	Ribulokinase	2.7.1.16	DTL3_0425
<i>araD</i>	L-Ribulose-5-phosphat- 4-Epimerase	5.1.3.4	DTL3_0426
<i>araM</i>	Aldose-1-Epimerase	5.1.3.3	DTL3_0509
<i>rbsK</i>	Ribokinase	2.7.1.15	DTL3_0427, DTL3_0929
<b>Pentosephosphat-Weg</b>			
<i>rpe</i>	Ribulose-phosphat-3- Epimerase	5.1.3.1	DTL3_1367
<i>rpi</i>	Ribose-5-phosphat- Isomerase	5.3.1.6	DTL3_1868
<i>tkt</i>	Transketolase	2.2.1.1	DTL3_1405
<i>mipB</i>	Transaldolase	2.2.1.2	DTL3_0553
<b>Abbau Rhamnose</b>			
<i>rhaB</i>	Rhamnulokinase	2.7.1.5	DTL3_1047
<b>Pyruvat-Metabolismus</b>			
<i>porABCD</i> <sup>4</sup>	Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase	1.2.7.1	DTL3_0627, DTL3_0628, DTL3_0629, DTL3_0630
<i>pta</i>	Phosphotransferase	2.3.1.8	DTL3_1573
<i>ack</i>	Acetat-/Propionatkinase	2.7.2.15	DTL3_0486
<i>adh</i>	Alkoholdehydrogenase	1.1.1.2	DTL3_0951
<i>ldh</i>	Laktat-Dehydrogenase	1.1.1.27/1.1.1.28	DTL3_0053, DTL3_1163

[Fortsetzung Tabelle 29 auf Seite 226]

[Fortsetzung Tabelle 29]

<b>Abbau von Stärke, Glycogen, Pullulan, Trehalose und Maltose</b>			
<i>glgP</i>	Glycogen- Phosphorylase	2.4.1.1	DTL3_1223
<i>amyA</i>	$\alpha$ -Amylase (extrazellulär)	3.2.1.1	DTL3_0037, DTL3_1688
<i>amyB</i>	$\alpha$ -Amylase (cytoplasmatisch)	3.2.1.1	DTL3_1450
<i>pulA</i> <i>malEFG</i> <sup>5</sup>	Pullulanase Maltose/Oligosaccharid-Transporter	3.2.1.41	DTL3_0950 DTL3_0899, DTL3_0900, DT3_0901, DTL3_1091, DTL3_1092, DT3_1093 DTL3_1287, DTL3_1288, DT3_1289
<i>treS</i>	Trehalosesynthase	5.4.99.16	DTL3_0967
<b>Abbau Chitin/Chitobiase</b>			
<i>chiEFG</i>	Chitobiase-Transporter		DTL3_1738, DTL3_1739, DTL3_1740
<i>chiA</i>	Chitinase	3.2.1.14	DTL3_1090
<i>nagZ</i>	$\beta$ -N-Acetyl-Hexosaminidase	3.2.1.52	DTL3_1094, DTL3_1494
<i>nagK</i>	N-Acetylglucosaminkinase	2.7.1.59	DTL3_0811
<i>nagA</i>	N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase	3.5.1.25	DTL3_1521
<i>nagB</i>	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Transaminase	2.6.1.16	DTL3_1520, DTL3_0868
<b>Lichenin-Fermentation</b>			
<i>dpp/oppABCD</i> <i>E</i>	Lichenin-Transporter		DTL3_0239, DTL3_0240, DTL3_0241, DTL3_0242, DTL3_0243
<i>licB</i>	Licheninase	3.2.1.73	DTL3_1187
<i>bgfB</i>	Thermostabile $\beta$ -Glucosidase	3.2.1.21	DTL3_1195, DTL3_1036
<b>Unvollständiger Citratzyklus</b>			
<i>idh</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.41	DTL3_1456
<i>korAB</i>	2-Oxoglutarat-Oxidoreduktase	1.2.7.3	DTL3_0268, DTL3_1175, DTL3_1243
<i>fumA</i>	Fumarat-Hydratase	4.2.1.2	DTL3_0326
<b>Produktion von Wasserstoff</b>			
<i>hydABG</i>	[Fe-Fe]-Hydrogenase	1.12.1.4	DTL3_0797, DTL3_0798, DTL3_0799, DTL3_0213, DTL3_0215, DTL3_0216

[Fortsetzung Tabelle 29 auf Seite 227]

[Fortsetzung Tabelle 29]

<b>Propionsäure-Metabolismus</b>			
<i>mcm</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase	5.4.99.2	DTL3_0596, DTL3_0597
<i>mmcE</i>	Methylmalonyl-CoA-Epimerase	5.1.99.1	DTL3_0599
<i>mmc</i>	Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase	2.1.3.1	DTL3_0600, DTL3_0601, DTL3_0602
<i>pduL</i>	Phosphat-Propanoyltransferase	2.3.1.222	DTL3_0787
<i>tdcD</i>	Propionat-/Acetatkinase	2.7.2.15	DTL3_0486
<b>Galacturonsäure-Fermentation</b>			
<i>aguEFG</i>	Oligogalacturonsäure-Transporter		DTL3_0331, DTL3_0332, DTL3_0333
<i>agu4A</i>	$\alpha$ -Glucosidase	3.2.1.20	DTL3_0809, DTL3_1214
<i>uxaC</i>	Glucuronat-Isomerase	5.3.1.12	DTL3_0810
<i>uxuB</i>	D-Mannonat-Oxidoreduktase	1.1.1.57	DTL3_1165, DTL3_1328
<i>uxuA</i>	Mannonat-Dehydratase	4.2.1.8	DTL3_1329
<i>kdgK</i>	2-keto-3-deoxy-Deoxygluconat-Kinase	2.7.1.178	DTL3_0817

<sup>1</sup> Das Transportsystem XylEFK importiert Xylose und Glucose (FROCK *et al.* 2012)

<sup>2</sup> Diese Gene kodieren für ein nicht weiter charakterisiertes Dpp/Opp-Transportsystem, welches für den Transport von Cellobiose vorgeschlagen wird (CONNERS *et al.* 2006).

<sup>3</sup> Das Gen *meIA* wird als multifunktionale  $\alpha$ -Galactosidase (EC 3.2.1.22) beschrieben.

<sup>4</sup> Das Enzyme PorABCD wird als bifunktionales Enzym beschrieben (ERAM *et al.* 2015)

<sup>5</sup> Das Substratbindeprotein MalE des MalEFG-Transportsystems ist als Substratbindeprotein für mehrere Kohlenhydrate beschrieben (WASSENBERG *et al.* 2000 und CONNERS *et al.* 2006)

### II.1.2.16 Analyse ausgewählter Isolate mittels MALDI-TOF

Zur weiteren Analyse wurden verschiedene Isolate ausgewählt und an das RIPAC-Labor zur MALDI-TOF-Analyse gegeben. Die Spektren folgender Isolate zeigten keine Ähnlichkeit zur Datenbank des RIPAC-Labors: Stämme AS46, Gluc1, Gluc2, D1, L3, GlyW3.4, ASG1.4, SG1.4, GlucSH52, GlucSH101, GlucSH51, LakSH53 und der Referenzstamm DSM-21804 *Tepidanaerobacter acetatoxydans*. Die Isolate ASG2.1B, ASG2.2, ASG2.3, ASW3.1, ASW3.6 zeigten ein ähnliches MALDI-TOF-Spektrum. Diese Isolate wiesen auch ein sehr ähnliches Fingerprintmuster der SAPD-PCR auf. Durch Sequenzierung der 16S rDNA der Isolate ASG2.3 und ASW3.6 konnten diese Isolate als *Clostridium sporosphaerodites* identifiziert werden. Das Sequenzierergebnis von Isolat Gluc4 als *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* konnte durch das MALDI-TOF-Spektrum laut RIPAC bestätigt werden.

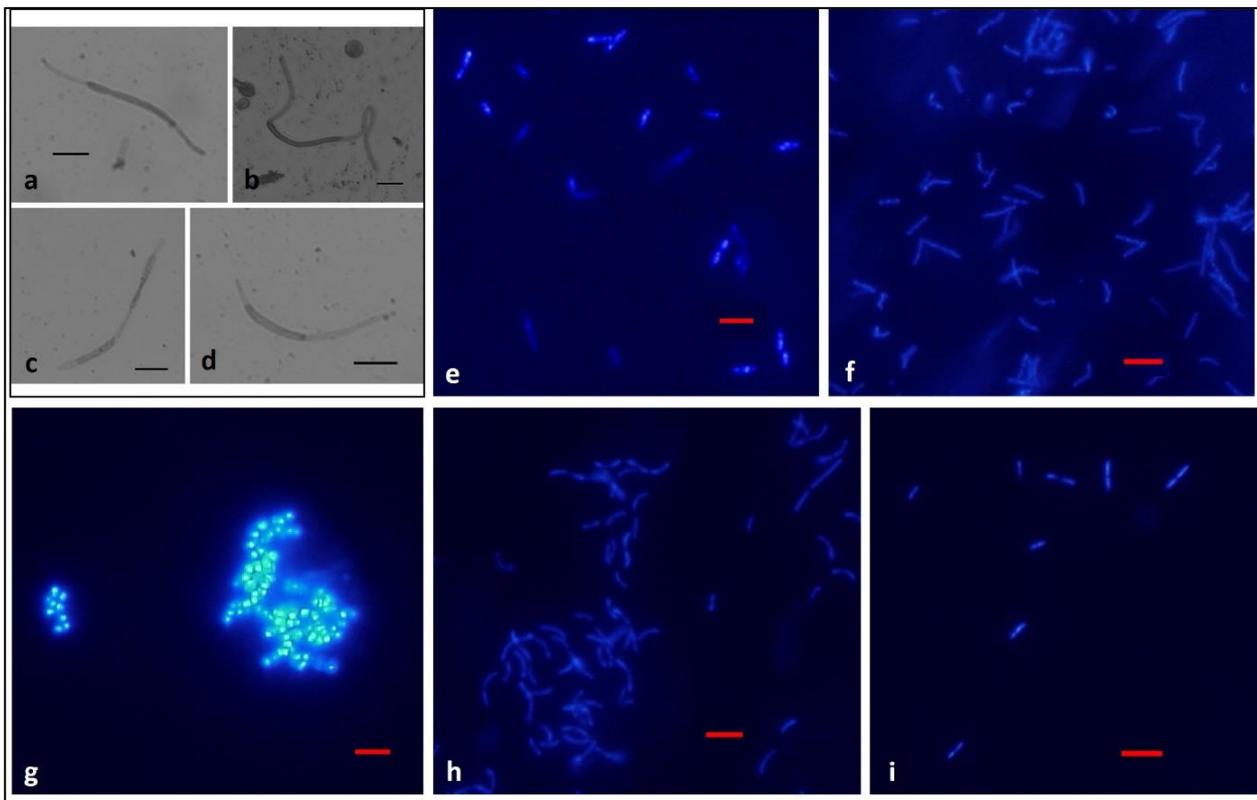
### II.1.2.17 Physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate

Um einen Einblick zu bekommen, welche Rolle die gewonnenen Isolate in Biogasanlagen spielen könnten, wurden sechs verschiedene Isolate ausgewählt (L3, L14, Gluc4, SG1.4B, GlyW3.4 und ASG2.3). Diese Isolate wurden mikroskopiert und in Substrat-

verwertungsversuchen physiologisch charakterisiert. Mit Hilfe von Substratverwertungsversuchen wurde untersucht, an welchen Stufen des anaeroben Abbaus die Isolate beteiligt sein können.

### Zellmorphologie

Mikroskopische Untersuchungen der Isolate wurden mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops Zeiss Axiophot2 (Zeiss, Oberkochen) und dem Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence, Neu-Isenburg) durchgeführt. Das letztgenannte Mikroskop besaß ein Filterset für 4'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ( $\lambda_{\text{Absorption,max}} = 359 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission,max}} = 461 \text{ nm}$ ). Für die Anfärbung von Zellen mittels DAPI wurden 100 - 300  $\mu\text{l}$  einer Flüssigkultur 2 Minuten bei 9600 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 300  $\mu\text{l}$  steriler 0,9% (w/v) NaCl gewaschen, anschließend in 300  $\mu\text{l}$  steriler 0,9% (w/v) NaCl aufgenommen und mit 1  $\mu\text{l}$  einer DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Dunkeln wurden 30 - 50  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf einen Objektträger pipettiert und luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die mittels DAPI angefärbten Zellen mikroskopiert. In **Abbildung 12** sind die Morphologien der untersuchten Isolate dargestellt.



**Abbildung 12:** Mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Isolate. (a - d) Stamm *Defluviitoga tunisiensis*; (e) Stamm *Desulfotomaculum australicum* L14; (f) Stamm *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc4; (g) Stamm *Gallicola* sp. SG1.4B; (h) Stamm *Selenomonas bovis* GlyW3.4; (i) Stamm *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3. (a - d) Phasenkontrastaufnahmen; (e - i) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Zellen angefärbt mit DAPI. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass es sich bei Stamm *Defluviitoga tunisiensis* L3 um ein stäbchenförmiges Bakterium handelt, welches eine hüllenartige äußere Struktur (Toga) besaß (**Abbildung 12a - d**). Die Zellen traten einzeln, in Paaren oder in längeren Ketten in der hüllenartigen Struktur auf und besaßen eine Länge von 2 - 10 µm. In Kulturen von Stamm *Desulfotomaculum australicum* L14 (2 - 3 µm) und Stamm Gluc4 (3 - 5 µm) wurden einzeln auftretende stäbchenförmig Zellen beobachtet (**Abbildung 12e, f**). Stamm *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3 bildete einzelne Stäbchen oder Stäbchen in Paaren (1 - 2 µm; **Abbildung 12i**) und Stamm *Selenomonas bovis* GlyW3.4 leicht gekrümmte Stäbchen (ca. 4 µm), welche einzeln oder in Paaren auftraten (**Abbildung 12h**). Wie in **Abbildung 12g** zu erkennen ist, besaßen die Zellen des Isolates *Gallicola* sp. SG1.4B eine kokkenförmige Morphologie. Die Kokken wurden einzeln oder in Zellpaketen beobachtet. Die Zellpakete zeigten eine Größe von bis zu 15 - 20 µm.

### Substratverwertung

Für die Untersuchungen der Substratverwertung wurde das Nährmedium 287a mit verschiedenen Kohlenstoffquellen hergestellt (Abschnitt II.1.2.3). Als Substrate wurden H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (1,5 bar), Buttersäure, Propionsäure, Milchsäure, Essigsäure, Glucose, Cellulose (mikrokristallin), Cellobiose, Stärke, Polygalacturonsäure, Saccharose, Glycerin, Arabinose, Laktose, Raffinose, Rhamnose, Trehalose, Maltose, Mannose und Xylose mit einer Konzentration von 0,3 - 0,5%(w/v) in den Nährmedien eingesetzt. Die Substratverwertung bzw. die Bildung von Produkten wie Glucose oder Essigsäure wurde mit Hilfe der HPLC (Abschnitt II.1.2.5) analysiert.

Die Ergebnisse der Substratverwertung sind in **Tabelle 30** zusammengefasst.

**Tabelle 30:** Physiologische Charakteristika der untersuchten Isolate im Vergleich mit Referenzstämmen.

Referenzstämme: 1 = *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1 (BEN HANIA *et al.* 2012), 2= *Desulfotomaculum australicum*, 3 = *Desulfotomaculum thermocisternum* (NILSEN *et al.* 1996), 4 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM-571, 5 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* FH1, 6 = *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 (O-THONG *et al.* 2008), 7 = *Gallicola barnesae* (EZAKI *et al.*,2001), 8 = *Selenomonas bovis* WG (ZHANG & DONG 2009), 9 = *Clostridium sporosphaeroides* DSM-1496<sup>a</sup> (VOS *et al.* 2009)

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

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

<sup>1</sup> Verwertung von Carboxymethyl-Cellulose.

<sup>2</sup> Pektin wurde getestet.

<sup>3</sup> Gramfärbung: + positiv, - negativ.

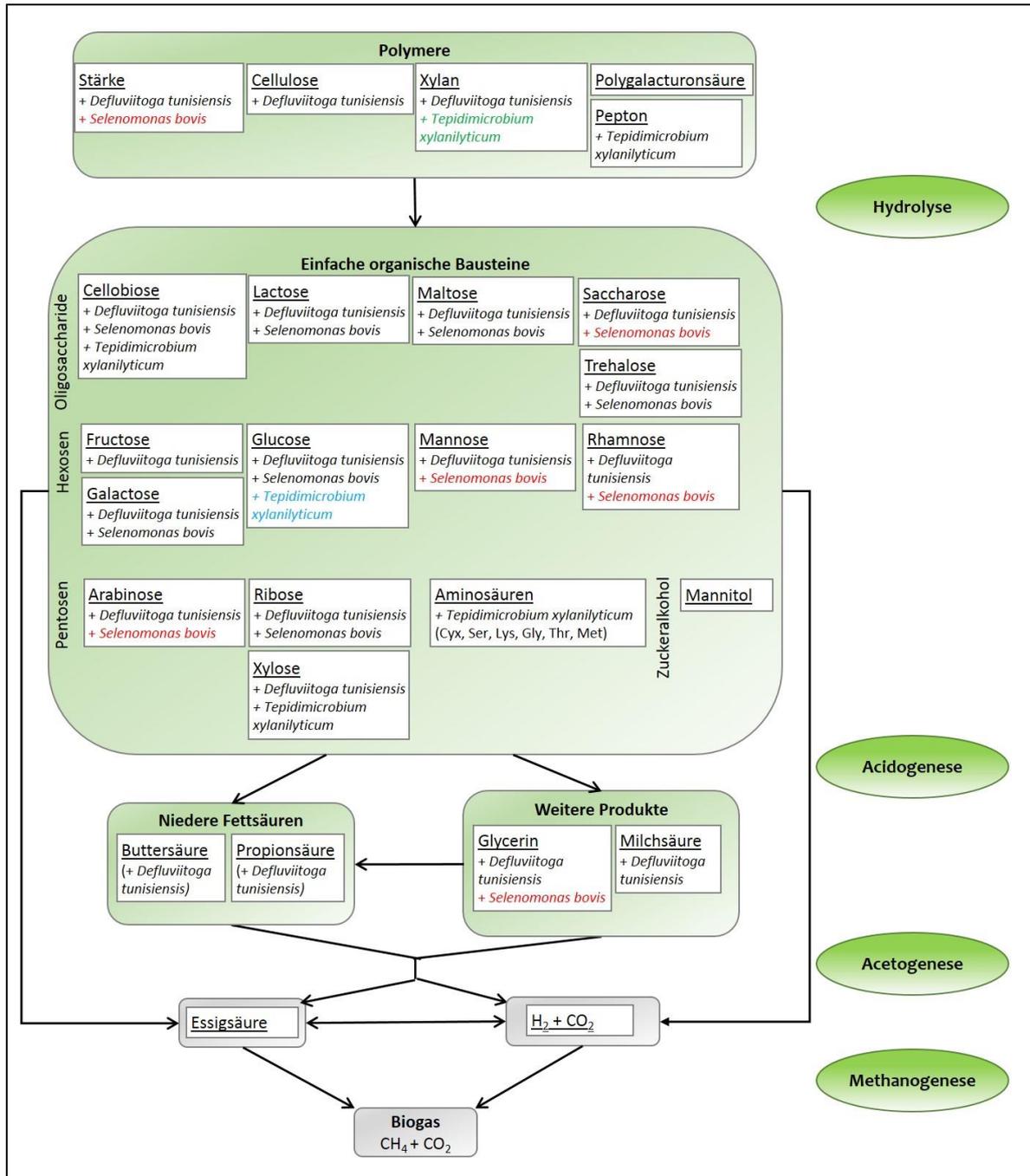
Die Ergebnisse der Substratverwertungsversuche und vergleiche mit der Literatur zeigten, dass die Isolate in verschiedene Gruppen in der anaeroben Abbaukette eingeordnet werden können (**Abbildung 9**):

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

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

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sowie ein Vergleich mit der Literatur zeigten, dass *Defluviitoga tunisiensis* und *Selenomonas bovis* in der Lage sind, Polysaccharide (z.B. Stärke, Xylan oder Cellulose), Oligosaccharide (z.B. Cellobiose, Saccharose, Trehalose) und Monosaccharide (z.B. Glucose, Arabinose) sowie primäre Gärprodukte (z.B. Glycerin, Laktat) zu verwerten (ZHANG & DONG 2009, BEN HANIA *et al.* 2012). In **Abbildung 13** ist anhand eines anaeroben Abbauschemas gezeigt, welche Kohlenhydrate beide Organismen verwerten können. Zusätzlich zu den Substratverwertungsversuchen von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3 konnten im Rahmen der Genomannotation viele Stoffwechselwege im Abbau von Kohlenhydraten rekonstruiert werden (**Abbildung 11**). Möglicherweise könnte die Fähigkeit, viele Kohlenhydrate zu verwerten, ein Grund für die hohen Abundanzen von *Defluviitoga tunisiensis* in den beprobten Biogasanlagen sein, wie sie mit Hilfe der qPCR festgestellt wurden (Abschnitt II.1.2.14). Die mikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass *Defluviitoga tunisiensis* eine hüllenartige Togastruktur aufwies, wie sie auch für *Thermotoga maritima* beschrieben wurde. Eine solche Struktur führt zu einer vergrößerten Oberfläche und erleichtert die Nährstoffaufnahme (HUBER *et al.* 1986, JIANG *et al.* 2006). Die beobachtete Togastruktur könnte möglicherweise für *Defluviitoga tunisiensis* vorteilhaft in Biogasanlagen sein.

*Tepidimicrobium xylanilyticum* verwertet ebenfalls eine Reihe von Kohlenhydraten (Xylan, Xylose, Glucose und Cellobiose) und proteinartige Komponenten wie Pepton und einige Aminosäure. Daher könnte diese Art ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden. Bei der Verwertung von Glucose und Xylan wurde die Bildung von Buttersäure bzw. Propionsäure festgestellt (NIU *et al.* 2009). Da sowohl *Selenomonas bovis* als auch *Tepidimicrobium xylanilyticum* Propionsäure bzw. Buttersäure aus verschiedenen Substraten bilden können, könnten sie in Fermentern mit erhöhtem Substratangebot zu einer Versäuerung führen.



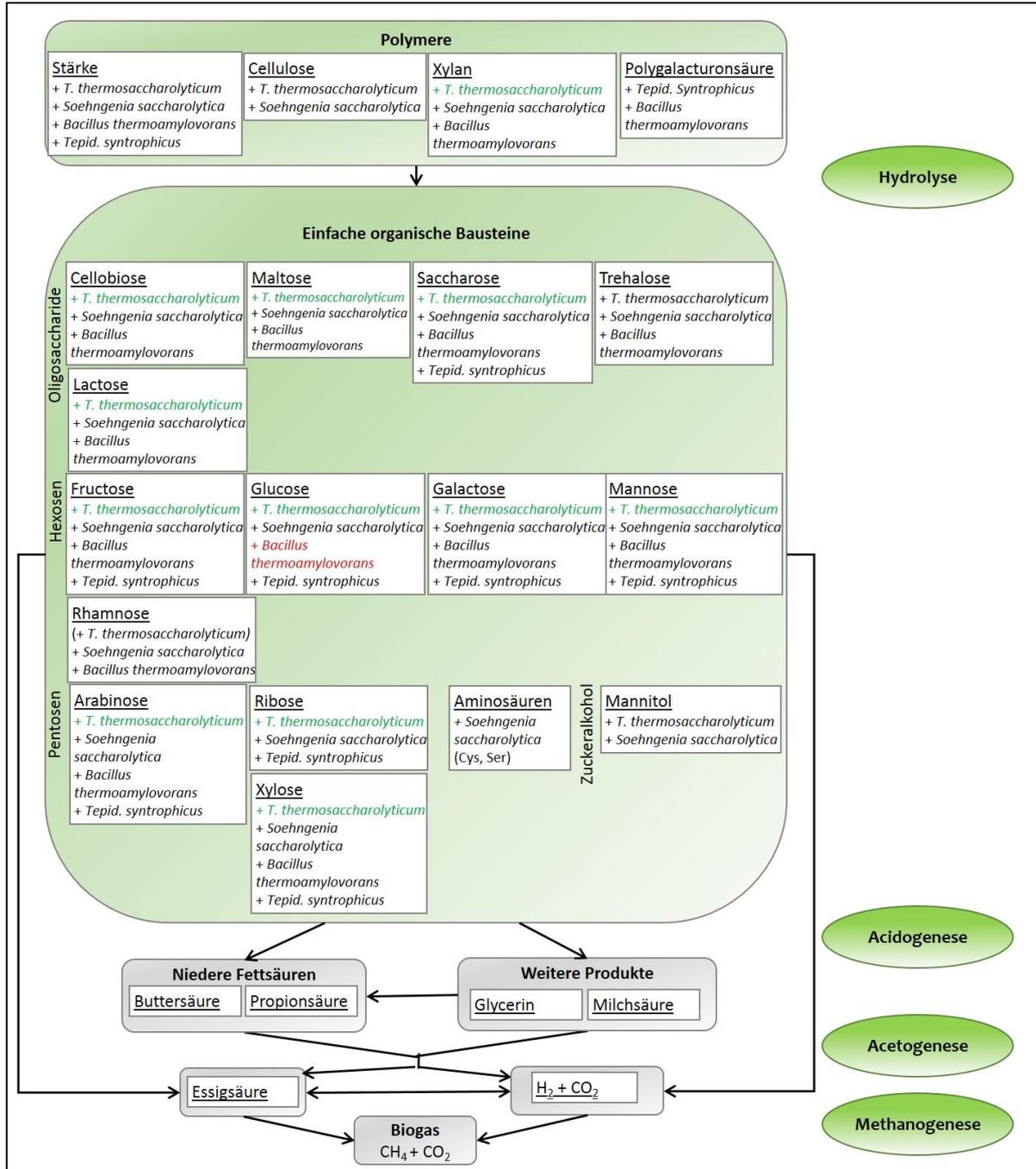
**Abbildung 13:** Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 1: Verwertung von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide) und zusätzlich primären Gärprodukten. Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure; blau markiert: Bildung von Buttersäure und geringen Mengen Propionsäure.

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

In die zweite Gruppe können Bakterien zugeteilt werden, welche die Fähigkeit besitzen Kohlenhydrate zu fermentieren, aber keine primären Gärprodukte (**Abbildung 14**). *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* könnte ein Vertreter der zweiten Gruppe darstellen, da diese Art hauptsächlich Kohlenhydrate verwertet, allerdings keine

primären Gärprodukte. Bei den Substratverwertungsversuchen wurde deutlich, dass Isolat *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Gluc4 Arabinose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Ribose, Saccharose, Xylose und Xylan zu Buttersäure vergären konnte. O-THONG *et al.* (2008) beschreiben in ihrer Studie, dass dieser Organismus hohe Erträge an Wasserstoff produziert. In Kulturen des Isolates Gluc4 konnte ebenfalls ein großer Gasüberdruck festgestellt werden. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* könnte somit als Verwerter von Polysacchariden und Produzent von Wasserstoff und Buttersäure eine große Bedeutung in thermophilen Biogasanlagen haben, da er beispielsweise auch in hohen Abundanzen molekularbiologisch in Laborfermentern (Substrate Stroh und Heu) von LEBUHN *et al.* (2014) detektiert werden konnte.

Aus den Hochdruck-Biogas-Laborfermentern konnten die Arten *Bacillus thermoamylovorans*, *Soehngenia saccharolytica* und *Tepidanaerobacter syntropicus* isoliert werden, welche laut Literatur ebenfalls hauptsächlich Polysaccharide, Oligosaccharide und Monosaccharide zu vergären. In **Abbildung 14** ist dargestellt, welche Kohlenhydrate durch die Organismen verwertet werden können (PARSHINA *et al.* 2003, SEKIGUCHI *et al.* 2006, Vos *et al.* 2009).

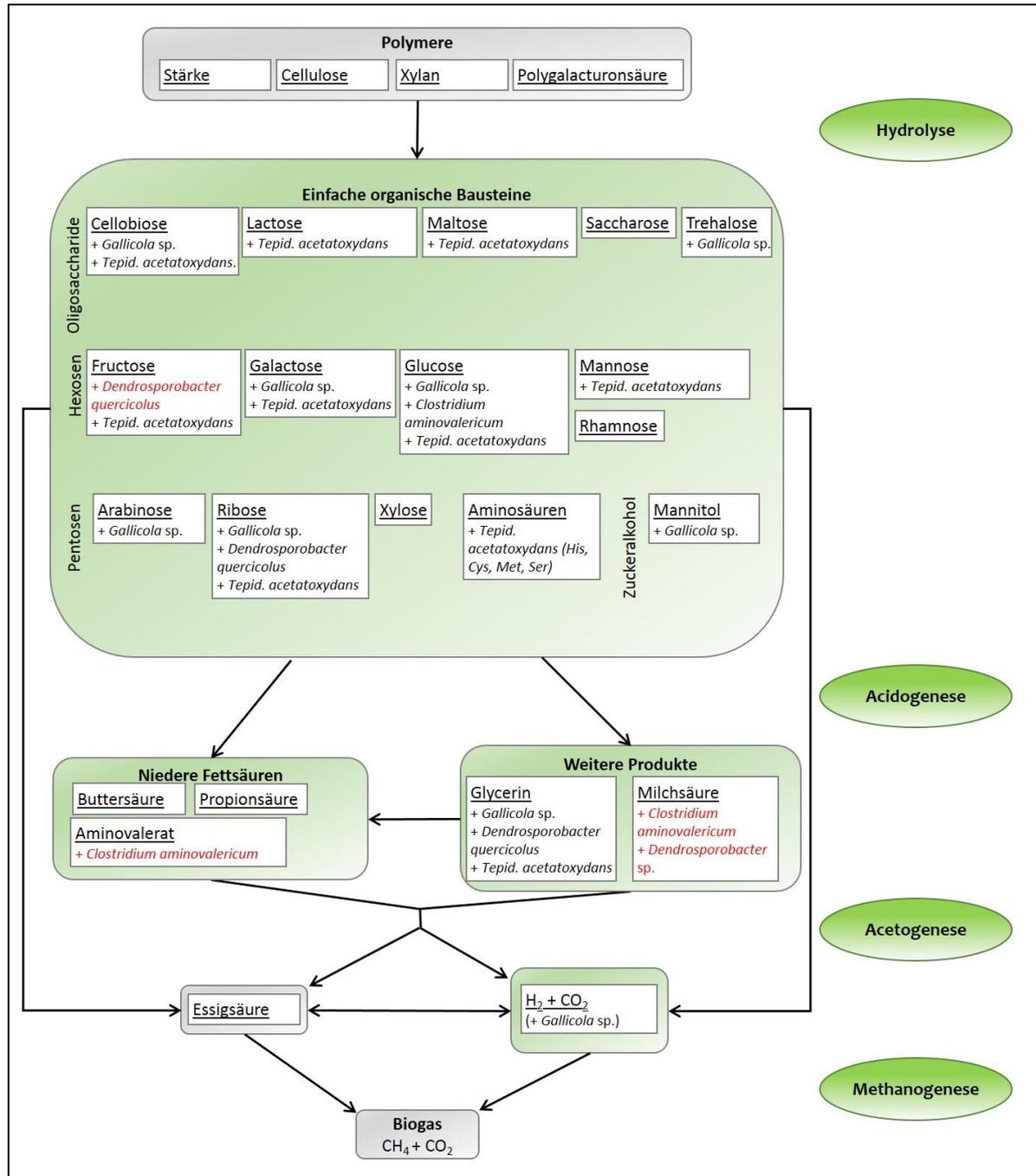


**Abbildung 14:** Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 2: Verwertung von Kohlenhydraten (Polymere, Oligomere und Monosaccharide). Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure. *T.* = *Thermoanaerobacterium*; *Tepid.* = *Tepidanaerobacter*.

### 3) Verwertung von Oligosacchariden bzw. Monosacchariden sowie primären Gärprodukten

In den durchgeführten Substratverwertungsversuchen und einem Vergleich mit der Literatur wurde deutlich, dass manche Mikroorganismen keine Polymere verwerten können, sondern vereinzelt Zucker (meist Monosaccharide) und primäre Gärprodukte. Dieser

Gruppe kann beispielsweise Isolat *Gallicola* sp. SG1.4B zugeordnet werden, welches Cellobiose, Trehalose, Galactose, Glucose, Arabinose, Ribose und Glycerin als Substrat nutzen konnte. Weiterhin könnten dieser Gruppe *Clostridium aminovalericum*, *Dendrosporobacter* sp., *Tepidanaerobacter acetatoxydans* zugeordnet werden. In der Literatur ist für diese Organismen die Verwertung verschiedener Oligosaccharide, Monosaccharide und primärer Gärprodukte beschrieben, allerdings nicht die Verwertung von Polysacchariden (STRÖMPL *et al.* 2000, VOS *et al.* 2009, WESTERHOLM *et al.* 2011b). In **Abbildung 15** ist dargestellt, welche Substrate die genannten Organismen verwerten können. Während für *Clostridium aminovalericum* bisher keine weiteren Isolate bzw. molekularbiologischen Nachweise in Biogasanlagen beschrieben sind, wurde *Dendrosporobacter quercicolus* molekularbiologisch nur in einem Laborfermenter mittels DGGE nachgewiesen, welcher mit Pepton und Glucose gefüttert war (LI *et al.* 2010). *Tepidanaerobacter acetatoxydans* wurde von WESTERHOLM *et al.* (2011b) aus einem Laborfermenter mit hohem Ammoniumgehalt isoliert. Weiterhin wurde in deren Studien festgestellt, dass *Tepidanaerobacter acetatoxydans* in Syntrophie mit *Methanoculleus* sp. Acetat oxidieren kann.



**Abbildung 15:** Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 3: Verwertung von Oligosacchariden bzw. Monosacchariden sowie primären Gärprodukten. Rot markiert: Bildung von Propionsäure. *Tepid.* = *Tepidanaerobacter*.

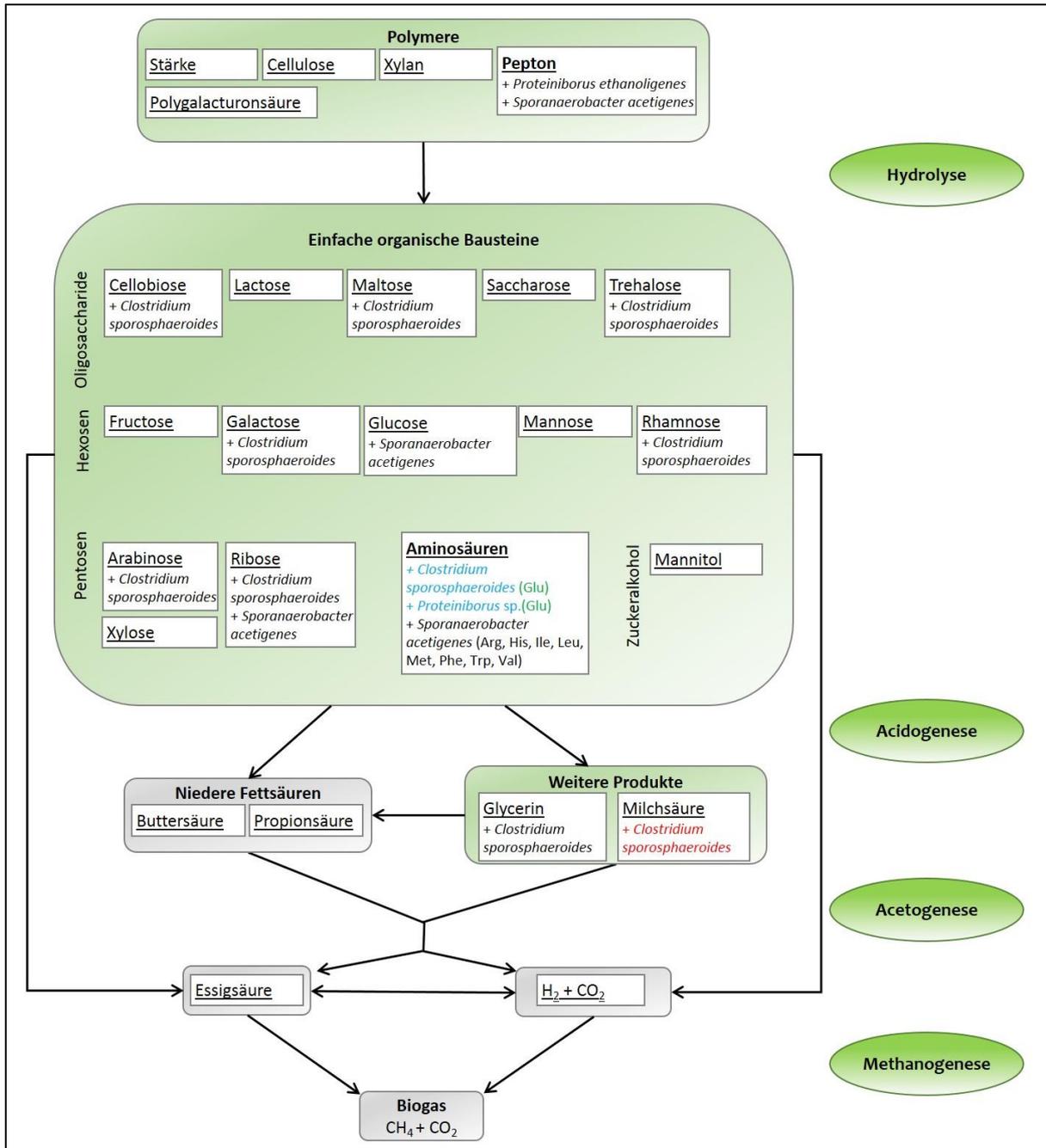
#### 4) Verwertung von Aminosäuren

In die vierte Gruppe können Mikroorganismen eingeteilt werden, welche hauptsächlich Proteine oder Aminosäuren abbauen (**Abbildung 16**). Isolat *Clostridium sporosphaeroides* ASG2.3 könnte in diese Gruppe eingeordnet werden. Die Versuche zur Substratverwertung zeigten, dass Isolat ASG2.3 keine Polymere verwerten konnte und nur ein sehr schwaches Wachstum mit Zuckern (**Tabelle 30**) zeigte. Aus den angebotenen

Aminosäuren konnte dieses Isolat Essigsäure und Buttersäure bilden. *Clostridium sporosphaeroides* konnte in den mesophilen Biogasanlagen mit  $10^5$  –  $10^6$  Kopien der 16S rDNA/g BGA-Probe detektiert werden. Molekularbiologisch konnte diese Art sowohl in einem Laborfermenter (MERLINO *et al.* 2013) als auch in einer mesophilen Biogasanlage nachgewiesen werden (KRÖBER *et al.* 2009).

Weiterhin könnten die Isolate aus der *Clostridium* sp. ASG1.4B und *Tepidanaerobacter* sp. AS34 und AS46, welche aus Aminosäure-haltigen Anreicherungskulturen isoliert wurden, in diese Gruppe eingeteilt werden. Auch diese Isolate waren in der Lage, aus Aminosäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure bzw. Essigsäure und Propionsäure zu bilden. Die Gattung *Proteiniborus* wurde molekularbiologisch in einem Laborfermenter detektiert, in welchem Schlamm einer Kläranlage bei pH 8 und 9 vergoren wurde (MASPOLIM *et al.* 2015). Möglicherweise spielt der aus der Biogasanlage Glahn isolierte Stamm *Proteiniborus* sp. ASG1.4 in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, welche keine Prozessstörungen aufweisen, aufgrund seiner größeren Abundanz eine bedeutendere Rolle (ca.  $10^5$  Kopien der 16S rDNA/g Probe aller vier beprobten Biogasanlagen) als der nächste Verwandte *Proteiniborus ethanoligenes* ( $10^2$  -  $10^3$  Kopien).

Aus der mesophilen Biogasanlage Wagner wurde Stamm *Sporanaerobacter acetigenes* LW3.3B isoliert. HERNANDEZ-EUGENIO *et al.* (2002) isolierten diese Art aus einem anaeroben Fermenter und beschrieben, dass sie nur die Zucker Glucose und Fructose sowie Pepton und einige Aminosäuren (z. B. Arginin, Histidin, Methionin) verwerten kann. Aus diesem Grund könnte diese Art auch in diese Gruppe eingeordnet werden.

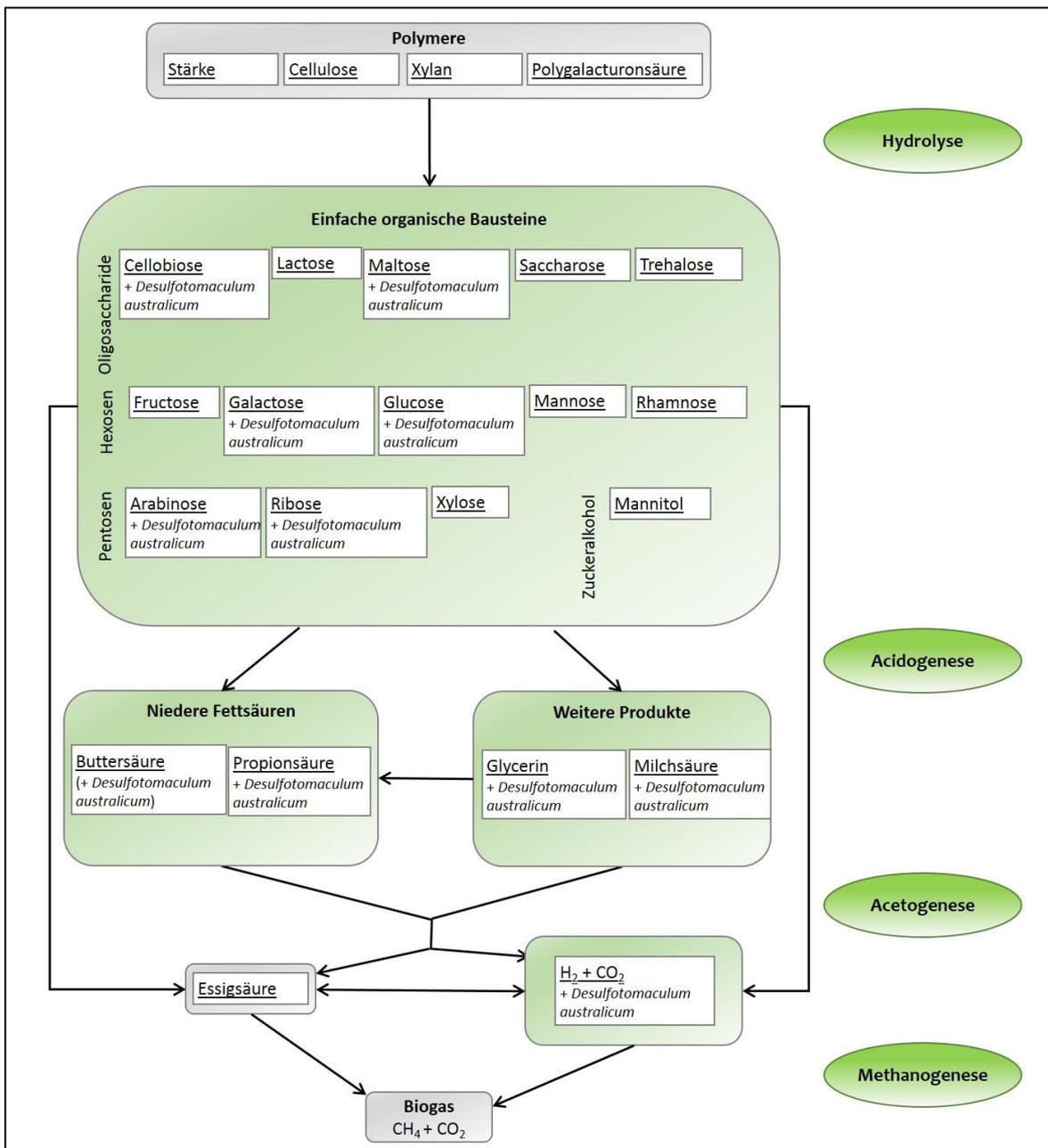


**Abbildung 16:** Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. *Gruppe 4: Verwertung von Aminosäuren.* Rot markiert: Bildung von Propionsäure; grün markiert: Bildung von Buttersäure; blau markiert: Bildung von Buttersäure und Propionsäure.

5) Verwertung von Säuren und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

In diese Gruppe kann das thermophile Isolat *Desulfotomaculum australicum* L14 eingeordnet werden. Die physiologischen Versuche zeigten, dass dieses Isolat Milchsäure, Propionsäure und Buttersäure sowie lediglich ein paar Zucker verwerten konnte (**Tabelle 30**). Die Fähigkeit zum Abbau von kurzen Fettsäuren wie Propionat, Butyrat, Lactat oder Acetat durch die sulfatreduzierende Gattung *Desulfotomaculum* wird bei NILSEN *et al.* (1996) beschrieben. Durch Sulfatreduzierer kann im anaeroben Abbau die Methano-

genese beeinflusst werden. Einerseits können sie beispielsweise Fettsäuren wie Propionsäure und Buttersäure verwerten, wobei Essigsäure als wichtiges Substrat für die acetoklastische Methanogenese gebildet wird. Für *Desulfotomaculum thermocisternum* ist beispielsweise beschrieben, dass er in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors wie z. B. Sulfat mit einem hydrogenotrophen Archaeon Propionsäure abbauen konnte. Andererseits können Sulfatreduzierer allerdings bei ausreichendem Sulfatgehalt mit hydrogenotrophen Methanogenen in Konkurrenz um Wasserstoff stehen, welcher für die Sulfatreduktion benötigt wird (DAR *et al.* 2008, PLUGGE *et al.* 2011).



**Abbildung 17:** Einteilung der Isolate in die anaerobe Abbaukette. Gruppe 5: Verwertung von Säuren und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

Zusammenfassend konnten somit die Ergebnisse der Isolierungsarbeiten und der physiologischen Charakterisierungen neue Einblicke in Acidogenese geben. Alle Isolate zeigten die Fähigkeit der Essigsäurebildung, bei welchem es sich um ein wichtiges Substrat der Methanogenese handelt. Zusätzlich konnten einige Isolate identifiziert werden, welche Propionsäure und Buttersäure aus Produkten der Hydrolyse und primären Gärprodukten bilden konnten. Diese Organismen könnten somit bei Prozessstörungen potentiell zu einer Versäuerung des Fermenters führen. In weiterführenden Studien müsste untersucht werden, ob diese Organismen in Anlagen mit Prozessstörungen vorkommen und welche Rolle sie spielen.

Weiterhin sollte die Bedeutung von *Defluviitoga tunisiensis* in Biogasanlagen weiter untersucht werden. Dieser Organismus wurde sowohl in der Biogasanlage Butschen in hohen Abundanzen detektiert als auch in weiteren Studien (SASAKI *et al.* 2013, GUO *et al.* 2014, LEBUHN *et al.* 2014, RÖSKE *et al.* 2014). Möglicherweise spielt sein breites Substratspektrum (**Tabellen 29** und **30**) hierbei eine große Rolle.

## II.2 Verwertung

Im Rahmen dieses Projektes ist es zusammen mit den Verbundpartner gelungen, wichtige Mikroorganismen, die am Abbau von organischem Material in den vier anaeroben Abbaustufen beteiligt sind, in Reinkultur zu bringen, physiologisch zu charakterisieren und von ausgewählten Stämmen das Gesamtgenom zu bestimmen. Damit war es nun möglich, anhand der physiologischen und molekularbiologischen Daten einen Überblick über das Abbaupotential der Mikrobiota in Biogasanlagen zu gewinnen und Einblicke in zentrale Abbauewege zu erhalten. Diese Erkenntnisse können bei Problemen in Biogasanlagen gewinnbringend für eine Problembehebung bei mikrobiell verursachten Schwierigkeiten durch gezielten Nachweis und Titerbestimmung einzelner Species oder deren Optimierung genutzt werden. Außerdem könnten einzelne Isolate zur Verbesserung der Abbauleistung in Problemfällen als Starterkulturen eingesetzt werden.

In diesem Verbundvorhaben bestand die Aufgabe der Johannes Gutenberg-Universität Mainz darin, Essigsäure-, Propionsäure und Buttersäure-bildende Bakterien aus der gemeinsam untersuchten Biogasanlage Butschen zu isolieren. Weiterhin wurden drei mesophile Biogasanlagen (BGA Glahn, BGA Gebel und BGA Wagner) sowie zwei mesophile Hochdruck-Biogas-Laborfermenter beprobt. Aus allen untersuchten Anlagen konnten erfolgreich Anreicherungskulturen von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Bakterien gewonnen werden. Frau Katharina Cibis hat über diese Thematik ihre Dissertation angefertigt.

Insgesamt konnten 85 Isolate aus Anreicherungskulturen mit Laktat, Aminosäuren, Succinat, Glycerin, Glucose bzw. Ethanol gewonnen und deren Substratverwertung mittels HPLC analysiert werden. Die Tiefagar-Verdünnungsmethode erwies sich als erfolgreichste Isoliermethode der Säure-bildenden Bakterien. Insgesamt konnten 24 verschiedene Arten in Biogasanlagen identifiziert werden, welche Essigsäure, Propionsäu-

re oder Buttersäure bilden und zu den drei Phyla Firmicutes, Tenericutes und Thermotogae gehören. Die Bildung von Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure wurde in Kulturen von Isolaten festgestellt, welche als folgende Arten identifiziert wurden: *Bacillus thermoamylovorans*, *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium cochlearium*/*Clostridium tetani*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Dendrosporobacter* sp., *Proteinioborus* sp., *Selenomonas bovis* und *Tepidanaerobacter* sp. Zwei Isolate, verwandt zu *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, konnten Buttersäure und Milchsäure bilden. In Kulturen von *Defluviitoga tunisiensis* wurde die Bildung von Essigsäure festgestellt. Mit Hilfe der entwickelten Isolat-spezifischen Primer konnten die Isolate hauptsächlich in einem Bereich zwischen  $10^3$  bis  $10^8$  Kopien der 16S rDNA/g Biogasprobe detektiert werden.

Die 16S rDNA-Sequenzen der erhaltenen Isolate wurden in der Datenbank GenBank hinterlegt und stehen somit weiteren wissenschaftlichen Arbeiten zur Verfügung. Die Accession-Nummern sind in den **Tabellen 19 bis 21** aufgeführt. Ebenfalls wurde die Gesamtgenomsequenz von Isolat *Defluviitoga tunisiensis* L3 bei GenBank hinterlegt (Accession-Nr.: LN824141).

### II.3 Erkenntnisse von Dritten

Während der Durchführung des Vorhabens gab es verschiedene Veröffentlichungen zur mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen, aber keine über die Isolierung und spezielle Charakterisierung von Säurebildnern in NawaRO-Biogasanlagen, die Gegenstand dieser Untersuchungen waren.

Hierbei gab es vor allem Veröffentlichungen zu molekularbiologischen Studien, in welchen die mikrobielle Diversität in Biogasanlagen (z. B. WIRTH *et al.* 2012, STOLZE *et al.* 2015, THEUERL *et al.* 2015) oder Laborfermentern (z.B. HANREICH *et al.* 2013, WAGNER *et al.* 2013, GUO *et al.* 2014, SOLLI *et al.* 2014) untersucht wurde. Weiterhin gab es Metaproteom-Studien von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen (HEYER *et al.* 2015). In Propionsäure-abbauenden Anreicherungskulturen aus Biogasanlagen konnten *Pelotomaculum* sp., *Syntrophobacter sulfatireducens* und *Candidatus „Cloacamonas“* sp. als Schlüsselspezies identifiziert werden (AHLERT 2015).

Aus einer Kompostieranlage konnte ein thermophiles cellulolytisches Konsortium isoliert werden, welches den anaeroben Abbau von Cellulose-haltiger Biomasse verbessern konnte (KINET *et al.* 2015).

Zum anderen gab es auch Veröffentlichungen zu Isolaten aus Biogasanlagen: Mit Hinblick auf die Gattung *Methanobacterium* wurden methanogene Archaea aus Biogasanlagen, bei welchen nachwachsende Rohstoffen als Substrate eingesetzt wurden, isoliert und differenziert (MAUS *et al.* 2013, STANTSCHIEFF *et al.* 2014, MAUS *et al.* 2015b). Ein neues hydrogenotrophes methanogenes Archaeon, *Methanobacterium aggregans*, wurde aus einer Biogasanlage isoliert (KERN *et al.* 2015). Von HAHNKE *et al.* (2014) wur-

de als neue Art *Clostridium bornimense* beschrieben, welche aus einem Laborfermenter isoliert wurde. Verschiedene Stämme von *Clostridium thermocellum* wurden aus verschiedenen Biogasanlagen von KOECK *et al.* (2014) isoliert.

Weiterhin gab es Veröffentlichungen zu Genome-Announcements von Isolaten, welche in diesem Verbundprojekt aus Biogasanlagen isoliert wurden. Hierbei ist beispielsweise das bereits in Abschnitt II.1.2.16 erwähnte Genome-Announcement über das Isolat L3 *Defluviitoga tunisiensis* (MAUS *et al.* 2015a) zu nennen.

Veröffentlichungen zur gezielten Isolierung von Säure-bildenden Isolaten aus Biogasanlagen sind nach derzeitigem Kenntnisstand nicht bekannt.

## II.4 Veröffentlichungen

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

### Posterpräsentationen:

**CIBIS K.G.**, KÖNIG H. (2014a): Isolation of acetic acid, propionic acid and butyric acid producing bacteria from biogas plants. Poster. Gemeinsame Jahrestagung der DGHM der VAAM, 05.10.2014- 08.10.2015, Dresden

**CIBIS K.G.**, KÖNIG H. (2014b): Isolation of acetic acid, propionic acid and butyric acid producing bacteria from biogas plants. Poster. Biogas Science 2014 - International Scientific Conference on Anaerobic Digestion, 26.10.2014 – 30.10.2014, Wien

### Publikationen:

**CIBIS K.G.**, GNEIPEL A., KÖNIG H. (2015): Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. J Biotech (eingereicht)

MAUS I., **CIBIS K.G.**, WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015a): Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. J Biotechnol. 3:17-18

MAUS I., **CIBIS K.G.**, BREMGES A., STOLZE Y., WIBBERG D., TOMAZETTO G., BLOM J., SCZYRBA, KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015b): Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key player in a thermophilic biogas plant. PloS One (eingereicht)

Des Weiteren ist eine gemeinsame Publikation aller Verbundpartner über die gemeinsam beprobte, thermophile Biogasanlage Butschen unter dem Titel „Shedding light into the black box: Comprehensive polyphasic characterization of the microbial consortium in a thermophilic full-scale biogas plant“ in Vorbereitung.

### III Literatur

- AHLERT S. (2015):** Propionsäureabbau in NawaRo-Biogasanlagen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- AHRING B.K., SANDBERG M., ANGELIDAKI I. (1995):** Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:559-565
- ALLEN S.H.G., LINEHAN B.A. (1977):** Presence of transcarboxylase in *Arachnia propionica*. *Int J Systb Bacteriol* 27:291-292
- BARBIRATO F., CHEDAILLE D., BORIES A. (1997):** Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:441-446
- BEN HANIA W., GODBANE R., POSTEC A., HAMD I., OLLIVIER B., FARDEAU M.L. (2012):** *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1377-1382
- BRAUN M., MAYER F., GOTTSCHALK G. (1981):** *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch Microbiol.* 128:288-293
- BUCKEL W. (2001):** Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:263-273
- BUCKEL W., BARKER H.A. (1974):** Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol* 117:1248-1260
- COLLINS G., KAVANAGH S., MCHUGH S., CONNAUGHTON S., KEARNEY A., RICE O., CARRIGG C., SCULLY C., BHREATHNACH N., MAHONY T., MADDEN P., ENRIGHT A.M., O'FLAHERTY V. (2006):** Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through polyphasic experiments. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41:897-922
- CONNERS S.B., MONGODIN E.F., JOHNSON M.R., MONTERO C.I., NELSON K.E., KELLY R.M. (2006):** Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiol Rev* 30:872-905
- DAR S.A., KLEEREBEZEM R., STAMS A.J., KUENEN J.G., MUYZER G. (2008):** Competition and co-existence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:1045-1055
- DEHNING I., SCHINK B. (1989):** *Malonomonas rubra* gen. nov. sp. nov., a microaerotolerant anaerobic bacterium growing by decarboxylation of malonate. *Arch Microbiol* 151:427-433
- DEHNING I., STIEB M., SCHINK B. (1989):** *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Arch Microbiol* 151:421-426
- DIMROTH P., SCHINK B. (1998):** Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch Microbiol* 170:69-77
- DUNCAN S.H., LOUIS P., FLINT H.J. (2004):** Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 70:5810-5817
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2007):** Medium 287. [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium287.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium287.pdf) (Stand: 28.04.2013)
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2012a):** Medium 141. [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium141.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf) (Stand: 28.04.2013)

- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2012b):** Medium 1328. [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium1328.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1328.pdf). (Stand: 08.11.2013)
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2014):** Medium 104b: PY + X. [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium104b.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104b.pdf). (Stand: 21.05.2014)
- ERAM M.S., WONG A., ODUARAN E., MA K. (2015):** Molecular and biochemical characterization of bifunctional pyruvate decarboxylases and pyruvate ferredoxin oxidoreductases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga hypogea*. *J Biochem* (doi:10.1093/jb/mvv058)
- EZAKI T., KAWAMURA Y., LI N., LI Z.Y., ZHAO L., SHU S. (2001):** Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1521-1528
- FONKNECHTEN N., CHAUSSONNERIE S., TRICOT S., LAJUS A., ANDREESSEN J.R., PERCHAT N., PELLETIER E., GOUYVENOUX M., BARBE V., SALANOUBAT M., LE PASLIER D., WEISENBACH J., COHEN G.N., KREIMEYER A. (2010):** *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics* 11:1-12
- FROCK A.D., GRAY S.R., KELLY R.M. (2012):** Hyperthermophilic *Thermotoga* species differ with respect to specific carbohydrate transporters and glycoside hydrolases. *Appl Environ Microbiol* 8:1978-1986
- FUCHS G. (2007):** Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- GODORNES C., LEADER B.T., MOLINI B.J., CENTURION-LARA A., LUKEHART S.A. (2007):** Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 38:1-7
- GOTTSCHALK G. (1979):** Bacterial Metabolism, 1. Auflage, Springer-Verlag, New York
- GUO X., WANG C., SUN F., ZHU W., WU W. (2014):** A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings *Bioresour Technol* 152: 420-428
- 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. *Arch Microbiol* 157:169-175
- HAHNKE S., STRIESOW J., ELVERT M., MOLLAR X.P., KLOCKE M. (2014):** *Clostridium bornimense* sp. nov., isolated from a mesophilic, two-phase, laboratory-scale biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64:2792-2797
- HANREICH A., SCHIMPF U., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., BENNDORF D., HEYER R., RAPP E., PÜHLER A., REICHL U., KLOCKE M. (2013):** Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol* 36:330-338
- Hernandez-Eugenio G., Fardeau M.L., Cayol J.L., Patel B.K., Thomas P., Macarie H., Garcia J.L., Ollivier B. (2002):** *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1217-1223
- HEYER R., KOHRS F., REICHL U., BENNDORF D. (2015):** Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microb Biotechnol* doi: 10.1111/1751-7915.12276.
- HUBER R., LANGWORTHY T.A., KÖNIG H., THOMM M., WOESE C.R., SLEYTR U.B., STETTER K.O. (1986):** *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144:324-333
- JANSSEN P.H., LIESACK W. (1995):** Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. *Arch Microbiol* 164:29-35

- JIANG Y., ZHOU Q., WU K., LI X.Q., SHAO W.L. (2006):** A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. FEMS Microbiol Lett 259:254-259
- KAISER F., METZNER T., EFFENBERGER M., GRONAUER A. (2007):** Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe. LfL (ed.) Freising-Weihenstephan. Lerchl-Druck, Freising.
- KERN T., LINGE M., ROTHER M. (2015):** *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. Int J Syst Evol Microbiol 65:1975-1980
- KINET R., DESTAIN J., HILIGSMANN S., THONART P., DELHALLE L., TAMINIAU B., DAUBE G., DELVIGNE F. (2015):** Thermophilic and cellulolytic consortium isolated from composting plants improves anaerobic digestion of cellulosic biomass: Toward a microbial resource management approach. Bioresour Technol 189:138-144
- KOECK D.E., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2014):** Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. Syst Appl Microbiol 37:311-319
- KRAUSE L., DIAZ N.N., EDWARDS R.A., GARTEMANN K.H., KRÖMEKE H., NEUWEGER H., PÜHLER A., RUNTE K.J., SCHLÜTER A., STOYE J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., GOESMANN A. (2008):** Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. J Biotechnol 136:91-101
- KRÖBER M., BEKEL T., DIAZ N.N., GOESMANN A., JAENICKE S., KRAUSE L., MILLER D., RUNTE K.J., VIEHÖVER P., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2009):** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. J. Bacteriol 142:38-49
- LEBUHN M., HANREICH A., KLOCKE M., SCHLÜTER A., BAUER C., PÉREZ C.M. (2014):** Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. Anaerobe 29:10-21
- LI S.L., WHANG L.M., CHAO Y.C., WANG Y.H., WANG Y.F., HSIAO C.J., TSENG I.C., BAI M.D., CHENG S.S. (2010):** Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. Int J Hydrogen Energy 35:61-70
- LOUIS P., DUNCAN S.H., MCCRAE S.I., MILLAR J., JACKSON M.S., FLINT H.J. (2004):** Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. J Bacteriol 186:2099-2106
- LOUIS P., MCCRAE S.I., CHARRIER C., FLINT H.J. (2007):** Organization of butyrate synthetic genes in human colonic bacteria: phylogenetic conservation and horizontal gene transfer. FEMS Microbiol Lett 269:240-247
- MACY J.M., LJUNGDAHL L.G., GOTTSCHALK G. (1978):** Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. J. Bacteriol 134:84-91
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J. (2001):** Brock Mikrobiologie, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- MASPOLIM Y., ZHOU Y., GUO C., XIAO K., NG W.J. (2015):** The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. Bioresour Technol 190:289-298
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., CIBIS K., EIKMEYER F.G., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2013):** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. J Biotechnol 168:734-736

- MAUS I., CIBIS K.G., WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015a):** Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J Biotechnol* 3:17-18
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., STOLZE Y., BLOM J., EIKMEYER F.G., FRACOWIAK J., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015b):** Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *J Biotechnol* 10;201:43-53
- MAY T., KOCH-SINGENSTREU M., EBLING J., STANTSCHIEFF R., MÜLLER L., JAKOBI F., POLAG D., KEPPLER F., KÖNIG H. (2015):** Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analyses of microbial communities in anaerobic biogas digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6855-6863
- MECHICHI T., FARDEAU M.L., LABAT M., GARCIA J.L., VERHÉ F., PATEL B.K. (2000):** *Clostridium peptidivorans* sp. nov., a peptide-fermenting bacterium from an olive mill wastewater treatment digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1259-1264
- MERLIN CHRISTY P., GOPINATH L.R., DIVYA D. (2014):** A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev* 34:167-173
- MERLINO G., RIZZI A., SCHIEVANO A., TENCA A., SCAGLIA B., OBERTI R., ADANI F., DAFFONCHIO D. (2013):** Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Res* 47:1983-1995
- MEYER V.R. (2009):** Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 10. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- NILSEN R.K., TORSVIK T., LIEN T. (1996):** *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a Sulfate reducer isolated from a hot north sea oil reservoir. *Int J Syst Bacteriol* 46:397-402
- NIU L., SONG L., LIU X., DONG X. (2009):** *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2698-2701
- O-THONG S., PRASERTSAN P., KARAKASHEVA D., ANGELIDAKI I. (2008):** Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy* 33:1204-1214
- PARSHINA S.N., KLEEREBEZEM R., SANZ J.L., LETTINGA G., NOZHEVNIKOVA A.N., KOSTRIKINA N.A., LYSENKO A.M., STAMS J.M. (2003):** *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1791-1799
- PAYNTER M.J.B., ELSDEN S.R. (1970):** Mechanism of propionate formation by *Selenomonas ruminantium*, a rumen microorganism. *J Gen Microbiol* 61:1-7
- PFANNEBECKER J. (2008):** Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- PFANNEBECKER J., FRÖHLICH J. (2008):** Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int J Food Microbiol* 128:288-296
- PINE L., GEORGE L.K. (1969):** Reclassification of *Actinomyces propionicus*. *Int J Syst Bacteriol* 19:267-272
- PLUGGE C.M., ZHANG W., SCHOLTEN J.C., STAMS A.J. (2011):** Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol* 2:1-8

- RÖSKE I., SABRA W., NACKE H., DANIEL R., ZENG A.P., ANTRANIKIAN G., SAHM K. (2014):** Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9095-9106
- ROST B. (1999):** Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 12:85-94
- SASAKI D., SASAKI K., WATANABE A., MORITA M., IGARASHI Y., OHMURA N. (2013):** Efficient production of methane from artificial garbage waste by a cylindrical bioelectrochemical reactor containing carbon fiber textiles. *AMB Express* 3, 1-9
- SCHEIFINGER C.C., WOLIN M.J. (1973):** Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol* 26:789-795
- SCHINK B. (1984):** Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C2 compounds. *Arch Microbiol* 137:33-41
- SCHINK B., PFENNIG N. (1982):** *Propionigenium modestum* gen. nov. sp. nov. a new strictly anaerobic, nonsporing bacterium growing on succinate. *Arch Microbiol* 133:209-216
- SCHINK B., THOMPSON T.E., ZEIKUS J.G. (1982):** Characterization of *Propionispira arboris* gen. nov. sp. nov., a nitrogen-fixing anaerobe common to wetwoods of living trees. *J Gen Microbiol* 128:2771-2779
- SCHINK B., KREMER D.R., HANSEN T.A. (1987):** Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. *Arch. Microbiol.* 147:321-327
- SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N.N., DONDRUP M., EICHENLAUB R., GARTEMANN K.H., KRAHN I., KRAUSE L., KRÖMEKE H., KRUSE O., MUSSGNUG J.H., NEUWEGER H., NIEHAUS K., PÜHLER A., RUNTE K.J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., TILKER A., VIEHÖVER P., GOESMANN A. (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136:77-90
- SCHWEIGER G., BUCKEL W. (1984):** On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Lett* 171:79-84
- SEEDORF H., FRICKE W.F., VEITH B., BRÜGGEMANN H., LIESEGANG H., STRITTMATTER A., MIETHKE M., BUCKEL W., HINDERBERGER J., LI F., HAGEMEIERS C., THAUER R.K., GOTTSCHALK G. (2008):** The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2128-2133
- SEELIGER S., JANSSEN P.H., SCHINK B. (2002):** Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol Lett* 211:65-70
- SEKIGUCHI Y., IMACHI H., SUSILORUKMI A., MURAMATSU M., OHASHI A., HARADA H., HANADA S., KAMAGATA Y. (2006):** *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1621-1629
- SOLLI L., HÅVELSRUD O.E., HORN S.J., RIKE A.G. (2014):** A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol Biofuels* 7:146
- STAMS A.J.M., KREMER D.R., NICOLAY K., WEENK G.H., HANSEN T.A. (1984):** Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch Microbiol* 139:167-173
- STANTSCHIEFF R., KUEVER J., RABENSTEIN A., SEYFARTH K., DRÖGE S., KÖNIG H. (2014):** Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5719-5735

- STOLZE Y., ZAKRZEWSKI M., MAUS I., EIKMEYER F., JAENICKE S., ROTTMANN N., SIEBNER C., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015):** Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol Biofuels* 8:14
- STRÖMPL C., TINDALL B.J., LÜNSDORF H., WONG T.Y., MOORE E.R., HIPPE H. (2000):** Reclassification of *Clostridium quercicolum* as *Dendrosporobacter quercicolus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:101-106
- THEUERL S., KOHRS F., BENNDORF D., MAUS I., WIBBERG D., SCHLÜTER A., KAUSMANN R., HEIERMANN M., RAPP E., REICHL U., PÜHLER A., KLOCKE M. (2015):** Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7791-803
- THOLOZAN J.L., TOUZEL J.P., SAMAIN E., GRIVET J.P., PRENSIER G., ALBAGNAC G. (1992):** *Clostridium neopropionicum* sp. nov., a strict anaerobic bacterium fermenting ethanol to propionate through acrylate pathway. *Arch Microbiol* 157:249-57
- VOS P., GARRITY G., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K.H., WHITMAN W.B. (2009):** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Volume Three –The Firmicutes, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- WAGNER A.O., LINS P., MALIN C., REITSCHULER C., ILLMER P. (2013):** Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Sci Total Environ* 458-460:256-66
- WASSENBERG D., LIEBL W., JAENICKE R. (2000):** Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J Mol Biol* 295: 279-288
- WEILAND P. (2010):** Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:849-860
- WIRTH R., KOVÁCS E., MARÓTI G., BAGI Z., RÁKHELY G., KOVÁCS K.L. (2012):** Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels* 5:41
- WESTERHOLM M., DOLFING J., SHERRY A., GRAY N.D., HEAD I.M., SCHNÜRER A. (2011a):** Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ Microbiol Rep* 3:500-505
- WESTERHOLM M., ROOS S., SCHNÜRER A. (2011b):** *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst Appl Microbiol* 34:260-266
- YE J., COULOURIS G., ZARETSKAYA I., CUTCUTACHE I., ROZEN S., MADDEN T.L. (2012):** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005):** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* 89:670-679
- ZHANG K., DONG X. (2009):** *Selenomonas bovis* sp. nov., isolated from yak rumen contents. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2080-2083

# Schlussbericht

## zum Verbundvorhaben

- Thema: **Etablierung eines core-Mikrobioms für Biogasanlagen**  
**Teilvorhaben 4: Methanogene Archaeen**
- Förderkennzeichen: 22006912
- Zuwendungsempfänger: Forschungsschwerpunkt  
„Biomassennutzung Hamburg“  
der HAW Hamburg, Labor für Angewandte Mikrobiologie,  
Fakultät Life Sciences,  
Ulmenliet 20  
21033 Hamburg
- Berichtverfasser: Dr. Yong-Sung Kim,  
Dr. Sandra Off  
Prof. Dr. Paul Scherer
- Kontakt: Prof. Dr. Paul Scherer  
Tel. 040/42875-6355, 0163/724 6059  
Email: Paul.Scherer@haw-hamburg.de

## Inhalt

<b>Inhalt</b> .....	<b>250</b>
<b>Liste der Abbildungen</b> .....	<b>252</b>
<b>Liste der Tabellen</b> .....	<b>254</b>
<b>1 Ziele des Verbundvorhabens / Einleitung</b> .....	<b>255</b>
1.1 Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern .....	258
<b>2 Zusammenfassung des Schlussberichtes</b> .....	<b>259</b>
<b>3 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse</b> .....	<b>261</b>
3.1 Erstellung des Metagenoms der gemeinsamen Viersen-Probe .....	263
3.1.1 Molekularbiologische Identifizierung der Kulturen .....	268
3.2 Isolierung methanogener Archaeen aus Biogasanlagen .....	269
3.2.1 Gewinnung von methanogenen Archaeen-Isolaten .....	271
3.2.2 Genomsequenzierung der Isolate .....	275
3.2.3 Identifizierung der 4 Methanbildner-Isolate mittels Maldi-TOF .....	278
<b>4 Kulturtechnik</b> .....	<b>280</b>
4.1 Strategie für die Isolierung methanbildender Archaeen .....	280
4.2 Überblick zur anaeroben Kulturtechnik .....	281
4.2.1 Historische Entwicklung der anaeroben Techniken zur Kultivierung von Methanbildnern .....	281
4.2.2 Aufbau anaerober Kulturgefäße .....	282
4.2.3 Sauerstoffempfindlichkeit .....	283
4.2.4 Medien-Komponenten .....	284
4.2.5 Kultivierung H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> verwertender Methanbildner (hydrogenotrophe) .....	285
4.2.6 Strategie zur Isolierung von Methanbildnern .....	285
4.3 Methodenentwicklung zur Kultivierung methanogener Archaeen aus Biogasanlagen .....	286
4.3.1 Kulturgefäße .....	286
4.3.2 Anaerobisierung .....	287
4.3.3 Allgemeine Anmerkungen zur Kultivierung .....	288
4.3.4 Eigenschaft des HAW-Mediums .....	288
4.3.5 Zusatzmittel zur Stimulation des Wachstums von methanogenen Kulturen .....	292
4.3.6 Sterilisation des Kulturmediums .....	292
4.3.7 Mediumherstellung im 200 mL-Maßstab .....	292
4.3.8 Drei Kultivierungsmethoden für Festmedien .....	294
4.3.9 Messtechniken zur Kontrolle des Wachstums von Methanbildnern .....	298

4.3.10	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> -Beschickung von Kulturgefäßen .....	300
4.3.11	Optimierung der zum Wachstum anaerob nutzbaren Schwefelquelle .....	300
4.3.12	Alternative Schwefel-Quellen zur Isolierung von Methanbildnern .....	301
4.3.13	Optimierung der Detektionsmethode und Identifizierung .....	303
4.3.14	Wiederbelebung und Identifizierung einer 32 Jahre alten Methanosarcina-Probe .....	305
4.3.15	Folgekultur und Verdünnungsreihe der Flüssigkulturen .....	306
4.3.16	Kontaminationsgefahr .....	307
4.3.17	Strategie der Trennung von Methanbildnern untereinander .....	308
<b>5</b>	<b>Verwertung</b> .....	<b>305</b>
5.1	Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten .....	309
5.2	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten .....	309
<b>6</b>	<b>Erkenntnisse von Dritten</b> .....	<b>309</b>
<b>7</b>	<b>Publikative Tätigkeiten aufgrund des geförderten Projekts</b> .....	<b>310</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>312</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>319</b>
9.1	Materialien zu den molekularbiologischen Arbeiten .....	319
9.2	Protokoll zur DNA-Extraktion .....	320
9.3	Verwendete Lösungen zur Medienherstellung (Beschriftung in Englisch) .....	321
9.4	Lösungen verwendeter Antibiotika .....	325
9.5	Metagenom der thermophilen Biogasanlage Viersen .....	326
9.5.1	Darstellung der Metagenomanalyse in Balkendiagrammen .....	326
9.5.2	Darstellung der Metagenomanalyse in Tortendiagrammen .....	331
	<b>Danksagung</b> .....	<b>334</b>

## Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Fließschema der geplanten Arbeiten und Arbeitsverteilung zwischen den Verbundpartnern.....	258
Abbildung 2 A und 2 B: 4Biogas-NOVA-Anlage des Betreibers Herrn Butschen in Viersen.....	262
Abbildung 3 A und 3 B: Prominente Taxa der mikrobiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf Klassen Ebene.....	265
Abbildung 4 A, 4 B und 4 C: Prominente Taxa der archiellen Ordnungen <i>Methanobacteria</i> (4 A, oben), <i>Methanomicrobia</i> mit <i>Methanomicrobiales</i> (4 B, Mitte) und <i>Methanomicrobia</i> mit <i>Methanosarcinales</i> (4 C, unten) der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf Genus Ebene.....	266
Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen des Isolats von <i>Methanoculleus bourgensis</i> (mesophil, isoliert aus der Bioabfallanlage Biowerk.....)	272
Abbildung 6: Hoch angereicherte Kultur von <i>Methanosarcina mazei</i> aus der mesophilen (40°C), landwirtschaftlichen Biogasanlage in Hocke mit Rindergülle, Mais und Gras.....	2744
Abbildung 7: Erzieltes Isolat von <i>Methanothermobacter marburgensis</i> aus der thermophilen (54°C), landwirtschaftlichen Biogasanlage in Viersen mit Mais und Schweinegülle.....	275
Abbildung 8: Phylogenetischer Stammbaum von angereicherten bzw. isolierten Methanbildnern aus unterschiedlichen Biogasanlagen.....	277
Abbildung 9: Ergebnis der MALDI-TOF Analysen von den Methanbildner-Isolaten <i>Methanoculleus bourgensis</i> (Biowerk), <i>Methanobacterium curvum</i> (Bützberg) und <i>Methanosarcina barkeri</i> (Bayerisches Isolat, das Reaktormaterial hierzu wurde von der Bayerischen LfL erhalten, Dr. Michael Lebuhn). Analytik von der RIPAC LABOR GmbH (Potsdam-Golm), offizieller Verbundpartner.....	279
Abbildung 10: Überblick möglicher Isolierungsstrategien im Hinblick auf anaerobe methanbildende Kulturen.....	280
Abbildung 11: Kulturgefäße von Hungate und Balch/Wolfe.....	283
Abbildung 12: Verwendete Glasgefäße für die anaerobe Kultivierung und zur Herstellung von Medien.....	286
Abbildung 13 A und 13 B: Prinzipielles Schema für die Anaerobisierung.....	287
Abbildung 14: Weiterentwicklung des Gas-Verteilers mit druckgesicherter Technik zur gleichzeitigen Anaerobisierung von 12 Kulturröhrchen durch Evakuierung mit Hilfe einer Vakuumpumpe und Begasung mit reinem Stickstoff.....	288
Abbildung 15: Ausrüstung für die Verdünnungsreihe unter Stickstoff-Spülung.....	293
Abbildung 16: Drei unterschiedliche Gefäßtypen für die verschiedenen Kultivierungsmethoden auf Festmedien.....	294

Abbildung 17: Entwicklung einer Kultivierungsmethode mit Festmedium für hydrogenotrophen Methanbildner.....	295
Abbildung 18: Schematischer Aufbau der Versuche zur Optimierung der Kultivierung von Methanbildnern auf Festmedien.....	297
Abbildung 19: Darstellung der verwendeten Messgeräte zur Detektion und Überprüfung des Wachstums methanbildender Kulturen. ....	299
Abbildung 20: Schematische Darstellung der der derzeit bekannten Schwefel-Quellen zur Kultivierung von Methanbildnern. ....	301
Abbildung 21: Detektion von methanogenen Kolonien.....	304
Abbildung 22: Makro- und Mikroskopische Aufnahmen der aus der Biogasanlage LfL isolierten Kolonien und Methanosarcinen .....	305
Abbildung 23: Bilder einer Kultur von <i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm Wiesmoor. ....	306
Abbildung 24: Mikroskopische Aufnahme von Kontaminationen durch zwei unbekannte Bakterienarten. ....	307
Abbildung 25: Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf <b>Klassen-Ebene</b> .....	326
Abbildung 26: Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf <b>Ordnungs-Ebene</b> . ....	327
Abbildung 27: Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf <b>Familien-Ebene</b> .....	328
Abbildung 28: Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf <b>Gattungs-Ebene</b> .....	329
Abbildung 29: Die <b>Top-Ten</b> Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf <b>Gattungs-Ebene</b> .....	330
Abbildung 30: Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Methanomicrobia</i> mit der Ordnung <i>Methanosarcinales</i> . ....	331
Abbildung 31: Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Methanomicrobia</i> mit der Ordnung <i>Methanomicrobiales</i> . ....	332
Abbildung 32: Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Methanomicrobia</i> mit der Ordnung <i>Methanocellales</i> und der Familie <i>Methanocellaceae</i> .....	332
Abbildung 33: Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Methanobacteria</i> mit der Ordnung <i>Methanobacteriales</i> . ....	333
Abbildung 34: Darstellung der Zusammensetzung wenig vorkommender methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Methanococci</i> mit der Ordnung <i>Methanococcales</i> .....	333
Abbildung 35: Darstellung der Zusammensetzung wenig redundanter Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse <i>Thermococci</i> mit der Ordnung <i>Thermococcales</i> und der Familie <i>Thermococcaceae</i> . ....	334

Abbildung 36: Darstellung der Zusammensetzung wenig redundanter Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Archaeoglobi* mit der Ordnung *Archaeoglobales* und der Familie *Archaeoglobaceae*.....334

### Liste der Tabellen

Tabelle 1: Kurze Übersicht über die Arbeitsziele in zeitlicher Abfolge .....	257
Tabelle 2: Informationen zu den Betriebsparametern der beprobten Biogasanlagen.....	263
Tabelle 3: Erzielte Anreicherungen und Isolate aus 15 verschiedenen Biogasanlagen.....	270
Tabelle 4: Vergleich des optimierten HAW-Mediums mit fünf DSMZ-Medien.....	290
Tabelle 5: Vergleich der Stammlösungen (1:100) an Spurenelementen des HAW-Mediums mit anderen Anaerobiermedien.....	291
Tabelle 6: Herstellung der verwendeten Festmedien .....	296
Tabelle 7: Test für eine alternative Schwefelquelle mit <i>Methanothermobacter marburgensis</i> (DSMZ 2133) im HAW-Medium unter thermophilen Bedingungen.....	302
Tabelle 8: Test für eine alternative Schwefelquelle mit <i>Methanoculleus bourgensis</i> (DSMZ 3045) im HAW-Medium unter mesophilen Bedingungen.....	303
Tabelle 9: Strategie für die Trennung unerwünschter Methanbildner von den gewünschten Ziel-Methanbildnern .....	308

## 1 Ziele des Verbundvorhabens / Einleitung

Ein übergeordnetes Ziel des Verbundvorhabens war die Entwicklung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen, einer Datensammlung zu dem wesentlichen Kernbestand an Mikroorganismen in Biogasreaktoren, welche zukünftig als Basis zur besseren Interpretation und Effizienzsteigerung von Biogasprozessen dienen soll. Die gewonnenen Ergebnisse der Genom- und Metagenom-Analysen sollen vergleichend ausgewertet und in einer Referenzdatensammlung angelegt werden. Ein weiteres Ausgangsziel der HAW Hamburg war es nach Projektvorgabe, eine möglichst einfache und kostengünstige Methode zu entwickeln, um die Schlüsselorganismen der Methanproduktion in Biogasanlagen im Labor kultivieren zu können.

Am Verbundprojekt beteiligt waren das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB), das CeBiTec an der Universität Bielefeld, die Johannes Gutenberg-Universität Mainz, die Technische Universität München, das RIPAC LABOR GmbH (Potsdam-Golm) sowie die Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Für eine technologische Optimierung der Biogasproduktion ist die Kenntnis über die beteiligten Mikroorganismen eine Grundvoraussetzung. Die Mehrheit der Mikroorganismen in Biogasanlagen ist bislang wissenschaftlich noch nicht ausreichend untersucht. Die Diversität dieser abwechslungsreichen Lebensgemeinschaften wird immer noch als „Black-Box“ bezeichnet (RADEMACHER *et al.* 2012). Die mikrobielle Diversität der anaeroben Fermentation wurde mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen, molekularbiologischen Methoden bereits mehrfach untersucht (KRAKAT *et al.* (2010 a/b, 2011), MUNK *et al.* (2010), WIRTH *et al.* (2012), HANREICH *et al.* (2012, 2013), SOLLI *et al.* (2014), ARGYROPOULOS *et al.* (2013) und KLANG *et al.* (2015)). Diese Diversitätsanalysen wurden allerdings von Fermentern im Labormaßstab bzw. Pilotanlagen gemacht. Die Erforschung großtechnischer Biogasanlagen ist in neuerer Zeit vermehrt in den Vordergrund gerückt (KRAUSE *et al.* 2008, NETTMANN *et al.* 2010, REGUEIRO *et al.* 2012, SUNDBERG *et al.* (2013), STOLZE *et al.* 2015, THEUERL *et al.* 2015). Die Ergebnisse dieser Analysen haben gezeigt, dass viele Mikroorganismen noch immer nicht zugeordnet bzw. klassifiziert werden können. Zur Einordnung von genomischen Daten ist eine solide Grundlage an Referenzdaten notwendig. Diese kann nur durch eine Kombination von klassischen mikrobiologischen und den datenreichen kultivierungsunabhängigen Methoden geschaffen werden. Erst durch die umfassende Charakterisierung der Schlüsselorganismen in den verschiedenen Biogasanlagen, speziell deren physiologischen Eigenschaften, ist eine effiziente Optimierung der Biogasbildung möglich. Besonders wichtig ist dabei die Charakterisierung von methanogenen Archaeen. Diese vermutlich ältesten Mikroorganismen der Erde besitzen in herkömmlichen Biogasanlagen im Vergleich zu den hydrolytischen Bakterien lediglich einen Anteil von meist 5-15% (interne Daten, HAW Hamburg), sind aber alleine für die Bildung des gewünschten Methans verantwortlich. Methanogene Mikroorganismen gelten als vergleichsweise langsam wachsende, strikte Anaerobier, die schwierig und aufwendig zu kultivieren sind, insbesondere die Hydrogenotrophen, die als Energie- und Kohlenstoffquelle ausschließlich

das Gasgemisch  $H_2/CO_2$  als Kohlenstoff und Energiequelle nutzen, das zu Urzeiten der Erde vulkanisch erzeugt wurde.

Zur Erreichung des Ziels zur Entwicklung eines *core*-Mikrobioms war der Erhalt unterschiedlichster Isolate aus verschiedenen Biogasanlagen ein wichtiger Schwerpunkt. Dieser und weitere **Arbeitsbereiche** gemäß der Vorhabenbeschreibung in diesem Verbundprojekt sind im Folgenden aufgelistet:

1. Auswahl und Beprobung repräsentativer Biogasanlagen
2. Isolierung von cellulolytischen, acidogenen, acetogenen und Stickstoffumsetzenden Bakterien sowie von methanogenen Archaeen
3. Entwicklung von neuen Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasreaktoren
4. Genomsequenzierung der Isolate und deren bioinformatische Auswertung
5. Aufbau einer Referenzdatenbank anhand bereits vorhandener Metagenomdaten
6. Aufbau einer Referenzdatenbank für den Kernbestand an Mikroorganismen und Abgleich der Daten
7. Entwicklung einer zeitnahen Diagnostik des Reaktorzustandes mittels MALDI-TOF MS

Die HAW Hamburg war an allen Schwerpunkten beteiligt. Die erfolgreiche Methodentwicklung zur Kultivierung und Identifizierung wichtiger methanogener Archaeen sowie deren Isolierung in Biogasanlagen des Arbeitsbereiches Nummer 3 stand im Mittelpunkt der Tätigkeit der HAW Hamburg. Von den Partnern des Projektes wurden am Auftaktsymposium des Verbundvorhabens BIOGAS-CORE am 05.11.2013 **Arbeitspakete** beschlossen.

Ein Ziel war die Isolierung von Mikroorganismen der vier anaeroben Abbaustufen sowohl aus einer gemeinsam beprobten Biogasanlage, als auch aus Biogasanlagen in der Nähe der jeweiligen Projektpartner. Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der einzelnen Arbeitsziele, die Aufgaben der HAW Hamburg darstellen, gibt **Tabelle 1** wider.

**Tabelle 1:** Kurze Übersicht über die Arbeitsziele in zeitlicher Abfolge

Zeitraumen	Aug. 2012 bis Juli 2013	Aug. 2013 bis Juli 2014	Aug. 2014 bis September 2015
Arbeitsplan	1. Auswahl und Beprobung von repräsentativen Biogasanlagen 2. Abstimmung und Austausch der Methodologie 3. Etablierung von neuartigen Kultivierungstechniken 3./4. Gewinnung erster Isolate bzw. Charakterisierung der Anreicherungskulturen Genomsequenzierung im Rahmen des Vorhabens erzeugter Isolate	3./4. Probensammlung und Gewinnung von Isolaten bzw. Anreicherungskulturen Optimierung/Darstellung der Kultivierungstechniken Genomsequenzierung im Rahmen des Vorhabens erzeugter Isolate	3./4. Weitere Probensammlung und Gewinnung von Isolaten bzw. Anreicherungskulturen Abschluss aller experimenteller Arbeiten 4. Genomsequenzierung im Rahmen des Vorhabens erzeugter Isolate Publikation der Ergebnisse und Abschlussberichterstattung

In der ersten Phase wurde von allen Projektpartnern eine Liste möglicher Biogasanlagen erstellt. Aus mikrobiologischer Sicht standen bei der Auswahl der Biogasanlagen folgende Substrate im Vordergrund: Mais, Grassilage, Rindergülle, und Schweinegülle, aber auch die Vergärung von Speiseresten und Bioabfällen wurde berücksichtigt. Ausschlaggebend für die letztendlich gewählte, von der HAW vorgeschlagene gemeinsame Anlage in Viersen waren folgende Eigenschaften: innovative thermophile Anlage, betrieben mit einem Substratgemisch aus nachwachsenden Rohstoffen (größtenteils Mais) und Schweinegülle als tierisches Abfallprodukt sowie ein stabiler Fermentationsprozess. Die ausgewählte Anlage in Viersen weist eine hohe Raumzeitausbeute auf (siehe Ergebnisteil, **Abbildung 2**, **Tabelle 2**), die baugleich an anderer Stelle in Seth von der HAW über mehrere Jahre beprobt und untersucht wurde (ANTONCZYK *et al.* 2015).

## 1.1 Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern

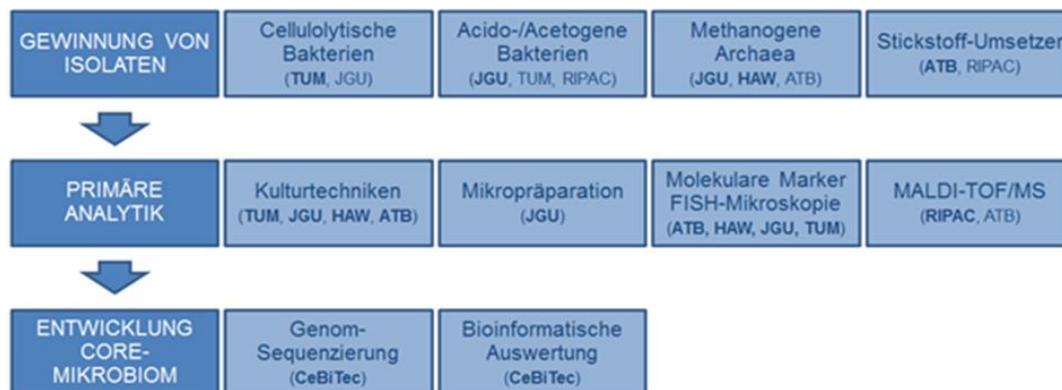
Es sollte ein intensiver Wissensaustausch unter allen Projektteilnehmern geschehen.

Für die Biogasanlage in Viersen sollte ein taxonomisches Profil mittels einer Metagenombank des gesamten Geninventars der mikrobiellen Gemeinschaft der Biogasanlage erstellt werden. Dazu wurde die Anlage von allen Projektpartnern zeitgleich am 07.01.2013 bei einem gemeinsamen Ortstermin beprobt und die DNA nach der jeweiligen hausinternen Methode extrahiert. Diese Vorgehensweise schloss einen möglichen Bias durch unterschiedliche DNA-Extraktionsmethoden oder verschieden lange Transportzeiten der Probe bis zur Lagerung weitestgehend aus. Die jeweilig isolierte DNA wurde im Anschluss durch den Verbundpartner CeBiTec (Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld) gemeinsam analysiert und Teilstücke der 16S rRNA-Gene per Illumina sequenziert. Die entstandenen Metagenome wurden miteinander verglichen und das erfolgreichste Protokoll zur DNA-Isolierung künftig angewendet.

Während des Projektes gewonnene Anreicherungen und Isolate sollten ebenfalls vollständig sequenziert werden. Hierzu wurden diese dem Partner CeBiTec (Universität Bielefeld) übergeben und Genome mit der neuen Technik der Illumina-Sequenzierung erstellt und im Anschluss bioinformatisch ausgewertet werden. Die weitere Interpretation der Daten soll in Verbindung mit den Partnern und im Abgleich mit in früheren Vorhaben erzeugten Ergebnissen erfolgen. So waren bei den Partnern TUM (Technische Universität München), JGU (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) und ATB (Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.) bereits verschiedene relevante Genom- und Metagenomdatensätze vorhanden, welche auch für dieses Vorhaben genutzt werden sollten.

Des Weiteren wurden zusätzlich die verschiedenen Isolate der untersuchten Biogasanlagen dem Verbundpartner RIPAC LABOR GmbH übergeben und mittels MALDI-TOF MS analysiert (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie (MS) mit Flugzeitanalysator (engl. time of flight, TOF).

Eine Übersicht über die geplanten Arbeiten des Forschungsverbundes Biogas-Core-Mikrobiom wird in **Abbildung 1** gegeben.



**Abbildung 1:** Fließschema der geplanten Arbeiten und Arbeitsverteilung zwischen den Verbundpartnern.

## 2 Zusammenfassung des Schlussberichtes

### Isolierung von Methanbildnern

Es hat sich gezeigt, dass erwartungsgemäß die morphologische Diversität der Methanbildner thermophiler Kulturen (nicht direkt gleich bedeutend mit genetischer Diversität) deutlich geringer als die mesophiler war. Im Ausgangsmaterial thermophiler Anreicherungen wurden bei 53°C mittels mikroskopischer Bestimmung in der Regel methanogene Stäbchen als dominierender Morphotyp gefunden. Zur gezielten Isolierung bestimmter Methanbildner in flüssigen Medien wurde vielfach ein wiederholtes Übertragen von mehr als 10 Mal in frisches Medium mit selektiven Antibiotika durchgeführt und von den neu beimpften Kulturen parallel Verdünnungsreihen hergestellt. Jede Kultur benötigte eine Wachstumszeit von etwa 2 – 3 Wochen, bis ein erneutes Überimpfen möglich war. Grund für dieses langsame Wachstum unter Laborbedingungen ist das gasförmige Substrat, welches nicht wie andere flüssige Kohlenstoffquellen leicht dosierbar dem Medium zugefügt werden kann. Die Kulturhaltung solcher Mikroorganismen, zu denen die hydrogenotrophen, d. h. Wasserstoff-CO<sub>2</sub> verwertenden Methanbildner gehören, die zudem unter anaeroben Bedingungen mit Schutzgas kultiviert werden müssen, stellt eine besondere Herausforderung dar. Des Weiteren gibt es keine fakultativ aeroben Methanbildner. Während dieses Verfahrens wurden die dominanten Methanbildner aus den Gärslämmen der ausgesuchten Fermenter angereichert und teilweise isoliert. Bei jeder Übertragung oder jedem Verdünnungsschritt wurden 3 verschiedene Antibiotika zugesetzt, um Fremdbakterien zu hemmen, siehe Anhang 9.4.

### Erhaltene Isolate

Trotz der Schwierigkeiten der Anzucht von methanbildenden Archaeen auf Festmedien sind zwei Kolonien von *Methanothermobacter thermotrophicus* und eine Kolonie eines *Methanothermobacter thermophilus* mittels der verwendeten „Roll-tube-Technik“ gewachsen. Weiterhin konnte jeweils eine Kolonie von *Methanothermobacter thermotrophicus* im Schrägagar und in einer speziell angefertigten anaeroben Petrischalen-Box angezogen werden. Dieses Isolat stammte aus einer thermophilen Biogasanlage mit Mais und Gülle als Substrat. Eine erneute Umstellung der gewachsenen Kolonien von Methanbildnern auf Flüssigmedium war allerdings erfolglos.

Insgesamt drei Isolate und zusätzlich sieben hoch angereicherte Kulturen wurden in dieser Studie erhalten (**Tabelle 3**). Zwei Isolate wurden zur Gesamtgenomsequenzierung an das CeBiTec (Universität Bielefeld) geschickt und vollständig sequenziert. Bei dem einen Isolat handelte es sich um einen bisher noch nicht beschriebenen Stamm von *Methanoculleus bourgensis* aus einer Biogasanlage für Speisereste in Hamburg. Das andere Isolat kommt ursprünglich ebenfalls aus einer Biogasanlage in Hamburg, die aber hauptsächlich Bioabfall (die „Grüne Tonne“) vergärt. Es handelt sich um einen nahen Verwandten von *Methanobacterium curvum*. Bei diesem Isolat wird vermutet, dass es sich um eine neue Art der Gattung *Methanobacterium* handelt.

### Etablierung einer vereinfachten Methodik

Ein wichtiges Ziel der Studie war es, eine einfache Kulturmethode für Biogasanlagen typische methanbildende Archaeen, ohne Verwendung der sonst üblichen, kostenaufwendigen anaeroben Zelte (sog. „Glove Boxes“) zu etablieren. Auf Basis der jahrelangen Erfahrung des Labors für Angewandte Mikrobiologie der HAW Hamburg wurden in dieser Studie verschiedene Techniken für die Kultivierung der  $H_2/CO_2$  verwertenden Methanbildner und für die Anaerobisierung sowie die Messtechnik des Wachstums vereinfacht. Diese Kulturtechniken können universell in einem Standardlabor eingesetzt werden. Eine Besonderheit der Arbeit ist die Entwicklung der anaeroben Petrischalen-Box, **Abbildung 21**. Diese anaerobe „Mini-Box“ ist für eine einzelne Petrischale gedacht, die nach der Nutzung leicht gewechselt werden kann. Regelmäßige Gasfütterung ist hierbei bis zu einem Überdruck von zwei Bar sogar mit Wasserstoff möglich. Die gebildeten Kolonien können unter Sichtblick detektiert und gepickt werden.

Zur Schaffung einer sauerstofffreien Schutzgasatmosphäre für die anaeroben Mikroorganismen einer Biogasanlage, zu denen die Methanbildner gehören, wurde in dieser Studie ebenfalls eine methodische Optimierung der Kultivierung sowie der Isolierung von strikt anaeroben, auf  $H_2/CO_2$  wachsenden sowohl mesophilen als auch thermophilen Methanbildnern durchgeführt. Sauerstofffreie Bedingungen wurden dabei durch wechselnde Be- und Entgasung des Mediums bei Raumtemperatur mit Stickstoff ohne Verwendung externer Kupferabsorber oder thermische Energie (Kochen des Mediums) geschaffen, was lange Abkühlzeiten und Bearbeitungszeiten erfordert hätte. Zusätzlich wurden den Medien zur Sicherheit Eisen-Cystein-Titancitrat und Natriumsulfid als Reduktionsmittel zugegeben. Des Weiteren mussten Komponenten der Medien für das Wachstum der anspruchsvollen Archaeen den Bedingungen in Biogasanlagen angepasst werden. Bestimmte Salzkonzentrationen wie Kalium wurden deshalb erhöht. Andere Salzkonzentrationen wie Phosphat wurden reduziert, um eine Ausfällung in den klaren Kulturmedien zu vermeiden. Als Ersatz für den Phosphat-Haushalt wurde erfolgreich Polyphosphat verwendet. Es war weiterhin wichtig, Mineralien regelmäßig hinzuzufügen, insbesondere Spurenelemente. Zur Pufferung des Mediums wurde Imidazol eingesetzt, was sich in früheren Arbeiten bewährt hatte (SCHERER 1989).

Für die einfache Messung des Wachstums unter Einhaltung der anaeroben Bedingungen wurde ein angepasstes elektronisches Manometer von der Firma SI Spezialinstrumente (Nördlingen, Deutschland, Produktnummer 1908) für die HAW eigens hergestellt. Dieses ist mit einem Luer-Lock-Fitting im vorderen Teil des Drucksensors ausgestattet, um eine Leckage freie Verbindungen mit handelsüblichen Einwegkanülen zu ermöglichen. Ein Fluoreszenzmikroskop zur Überwachung der Kulturen und des Grads der Anreicherung wurde parallel verwendet. Die Reinheit der Kulturen wurde zusätzlich durch die Zugabe von Hefeextrakt oder/und durch molekularbiologische Untersuchungen mit entsprechenden Primern (Bakterien bzw. Archaeen) überprüft.

### Anzucht von Methanbildnern auf Festmedien

Alle verwendeten Proben für diese Studie wurden mehrmals auf festem Medium mit verschiedenen Methoden beimpft, um Einzelkolonien und damit neue Reinkulturen zu erhalten. Die meisten Versuche für das Wachstum auf festen Medien scheiterten allerdings. Gründe hierfür könnte eine Inhibierung durch Sauerstofftoxizität oder durch die Änderung des pH-Wertes durch die Zugabe von Natriumsulfid als Schwefelquelle und zwecks Sauerstoff-Eliminierung gewesen sein. Es wurden verschiedene Tests durchgeführt, um herauszufinden, warum die Methanbildner auf dem festen Medium nicht gut wuchsen. Es wurden zum Beispiel verschiedene Konzentrationen an Schwefelwasserstoff anstatt Natriumsulfid eingesetzt. Mit einer leichten Erhöhung der Menge an Reduktionsmittel sollte die Sauerstofftoxizität minimiert werden. Auch wurde der Zusatz an Nährstoffen sowie die Feuchtigkeit variiert. Es wurde jedoch in dieser Studie kein klarer Grund für die Inhibierung der Methanbildner auf festen Medien gefunden, was auch sonst ein weitgehend ungelöstes Problem in der Literatur darstellt. Trotz dieser ermüdenden Kultivierungsversuche konnten eine Reihe von Isolaten, wie zuvor beschrieben, erhalten werden. Nach dem Projekt konnten durch komplette Neu-Isolierung 4 weitere methanogene Isolate, so *Methanobacterium wolfei* (55°C, Anlage Viersen), *Methanobacterium congolense* (37°C, Anlage Biowerk und Anlage Bützberg, **Tabelle 2**) sowie *Methanobacterium tenebrarum* (Wachstum bei 65°C, Betrieb Grasbiogasanlage der BiEn GmbH und Co KG bei 55°C) per Kolonie gewonnen werden (Frau Dr. Sandra Off und MSc. Katarina Wegner). Eine grundlegende Maßnahme für Einzelkolonien war das konsequente Entfernen von Kondenswasser. Bevorzugt wurden 10 mL Serumflaschen (upside down, mit Gelrite). Trotzdem benötigte das Koloniewachstum 1-3 Wochen.

## 3 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Für eine umfassende Untersuchung der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen (BGA) wurde von allen Verbundpartnern die BGA des Betreibers Herr Butschen in Viersen bei einem gemeinsamen Ortstermin am 07. Januar 2013 beprobt (**Abbildung 2**). Es handelte sich um eine 4Biogas NOVA-Anlage mit drei parallel betriebenen, stehenden, zylinderförmigen Fermentern (**Abbildung 2**). Diese haben je ein Volumen von 105 m<sup>3</sup>, beprobt wurde Fermenter 2 (F2). Durch ein im Gärraum liegendes Rohr ist eine kurze Hydrolyse integriert. Die einstufige Anlage mit der thermophilen Prozesstemperatur von 54°C hatte eine mittlere Dauerleistung von etwa 177 kWel (ca. 4250 kWh/d plus ca. 190 kWh an Wärmeenergie) und war mit einem unbeheizten, abgedeckten Endlager versehen (2500 m<sup>3</sup>), Lagerzeit max. 240 Tage. Diese Leistung entspricht 99% der möglichen Leistung nach den Leistungstabellen der KTBL für Groß-Biogasanlagen (KTBL 2013). Das entspricht einer täglichen Gasproduktion von etwa 728 m<sup>3</sup>/d/Fermenter mit einem Methangehalt von 53-54%. Auf eine tägliche Substratzufuhr von 5,3 Tonnen Frischmasse pro einzelnen Fermenter (105 m<sup>3</sup>) bezogen, lässt sich eine spezifische

Gasproduktion von etwa  $0,62 \text{ m}^3$  Biogas/kg oTS/d berechnen. Als Substrate wurden hauptsächlich Mais-Ganzpflanzensilage (56%), Schweinegülle (32%) sowie in geringen Mengen auch fester Rindermist (6%) und Gerste-Ganzpflanzensilage (6%) eingesetzt. Dieser Hochleistungsfermenter wies eine Verweilzeit von nur 20 Tagen auf, trotz stabiler Betriebsweise (Gesamtfettsäuren 500 - 1000 mg/L) bei einer hohen Beladung von  $8 \text{ kg oTS/m}^3/\text{d}$ . Die normale Raumzeitbelastung einer landwirtschaftlichen BGA liegt in der Regel bei  $3\text{-}5 \text{ kg oTS/m}^3/\text{d}$ , aber einer Verweilzeit von 80 Tagen (WEILAND *et al.* 2015) und damit um 300-400 hundert Prozent geringer. Die Anlage war vor der Probenahme bereits 14 Monate in Betrieb, davon 6 Monate Akklimatisierung von  $38^\circ\text{C}$  auf  $54^\circ\text{C}$ . Startmaterial war eine andere, mesophil eingefahrene Anlage mit Mais, Rinder- und Schweinegülle. Spurenelemente wie Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Co, Ni, and Se (DEMIREL & SCHERER 2011) wurden täglich mit Raten  $< 1 \text{ mg/L}$  zugegeben. Weitere Details zu einer baugleichen thermophilen ( $53^\circ\text{C}$ ) BGA mit  $14 \text{ kg oTS/m}^3/\text{d}$  (65% Rindergülle) und nur 11,5 Tagen Verweilzeit siehe bei ANTONCZYK *et al.* (2015).

Zusätzlich zur gemeinsam untersuchten Biogasanlage in Viersen wurden von der HAW Hamburg noch sechs weitere landwirtschaftliche bzw. städtische Betriebe ausgesucht. Zur Anreicherung und Isolierung von methanogenen Archaeen standen zu diesen Praxisanlagen folgende in **Tabelle 2** aufgelisteten Metadaten zur Verfügung.



**Abbildung 2 A und 2 B:** 4Biogas-NOVA-Anlage des Betreibers Herrn Butschen in Viersen. Rechts Mitglieder/innen des Verbundprojektes, um zum gleichen Zeitpunkt aus dem gleichen Gefäß eine Probe vom Biogasreaktor zu nehmen.

**Tabelle 2:** Informationen zu den Betriebsparametern der beprobten Biogasanlagen, HAW2/4, s. **Tabelle 3**

Anlage	Herkunft	Betreiber	Substrate	Temperatur	Anlagentyp	Fütterungsmenge pro Tag
Hohenwart HAW-3	Agraferm Technologies (»Bayern-Probe«)	Herr Ipfelkofer	Gras (77%), Mais (17%), Getreide (3%), Mist (5%)	42°C	NF <sup>1</sup> , stehender Rührreaktor	15,5 t/d in 800 m <sup>3</sup> Fermenter
Biowerk HAW-5	Hamburger Stadtreinigung	Herr Margull	Speisereste, überlagerte Lebensm.	41°C	NF <sup>1</sup> , stehender Rührreaktor	3 kg TS/(m <sup>3</sup> *d)
Bützberg HAW-6	Hamburger Stadtreinigung	Frau Dr. Boisch	Grüne kommunale Bioabfälle	37°C	TF <sup>1</sup> , Garagenform	k.A.
Dario HAW-7	Nord-Italien, über Firma Agratech-Italia	Herr Bertolli	Mais (80%), Getreide (20%)	47°C	TF <sup>1</sup> , liegender Rührreaktor	Raumbelastung 3,5 kg oTS/(m <sup>3</sup> *d)
Ernesto HAW-8	Nord-Italien, über Firma Agratech-Italia	Herr Bertolli	Mais (80%), Getreide (20%)	41°C	TF <sup>1</sup> , liegender Rührreaktor	Raumbelastung 3,5 kg oTS/(m <sup>3</sup> *d)
Benz bei Wismar HAW-9	Hocke	Bioenergie GmbH	Rindergülle (50%), Mais (45%), Gras (5%)	40°C	NF <sup>1</sup> , stehende Rührreaktor	20 kg TS/ (1700m <sup>3</sup> *d)
Viersen HAW-1	4 Biogas, Nachfolge Klotz GmbH, Hilchenbach	Herr Butschen	Schweinegülle (56%), Mais (32%), Gerste (6%), Rindermist (6%)	54°C	NF <sup>1</sup>	Raumbelastung 8 kg oTS/(m <sup>3</sup> *d)

<sup>1)</sup> NF: Nassfermentation; 2) TF: Sogenannte Trockenfermentation (ohne Flüssigkeitszugabe). 7 Isolate, s. **Tabelle 3**.

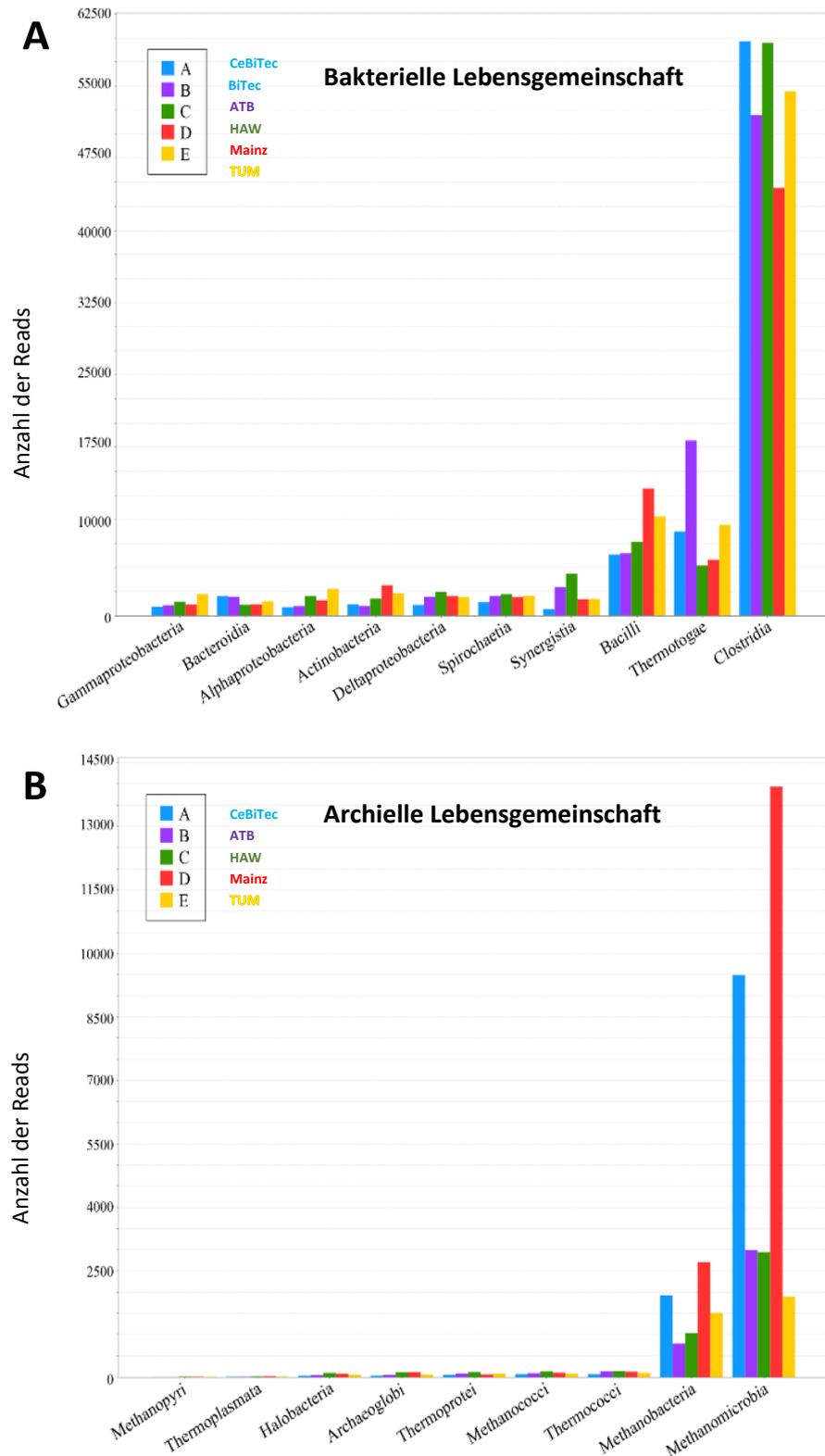
### 3.1 Erstellung des Metagenoms der gemeinsamen Viersen-Probe

Um eine vollständige taxonomische Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der thermophilen BGA Viersen zu erhalten, wurde die DNA der im Gärslamm enthaltenen Mikroorganismen nach fünf unterschiedlichen Extraktionsmethoden isoliert und die daraus hergestellten Metagenom-Datensätze vereinigt. Die fünf Extraktionsmethoden sind im Folgenden aufgelistet.

- A: Klassische Chloroform-Isoamylalkohol DNA Extraktion (CeBiTec)
- B: Phenol-Chloroform Extraktion mit einem zusätzlichen mechanischen Lyse-Schritt (ATB)
- C: Enzymatischer Aufschluss und Verwendung des PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (Mo-Bio) (HAW)
- D: GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit (EURx) (Mainz)
- E: Chloroform Extraktion mit Isopropanol Präzipitation (TUM)

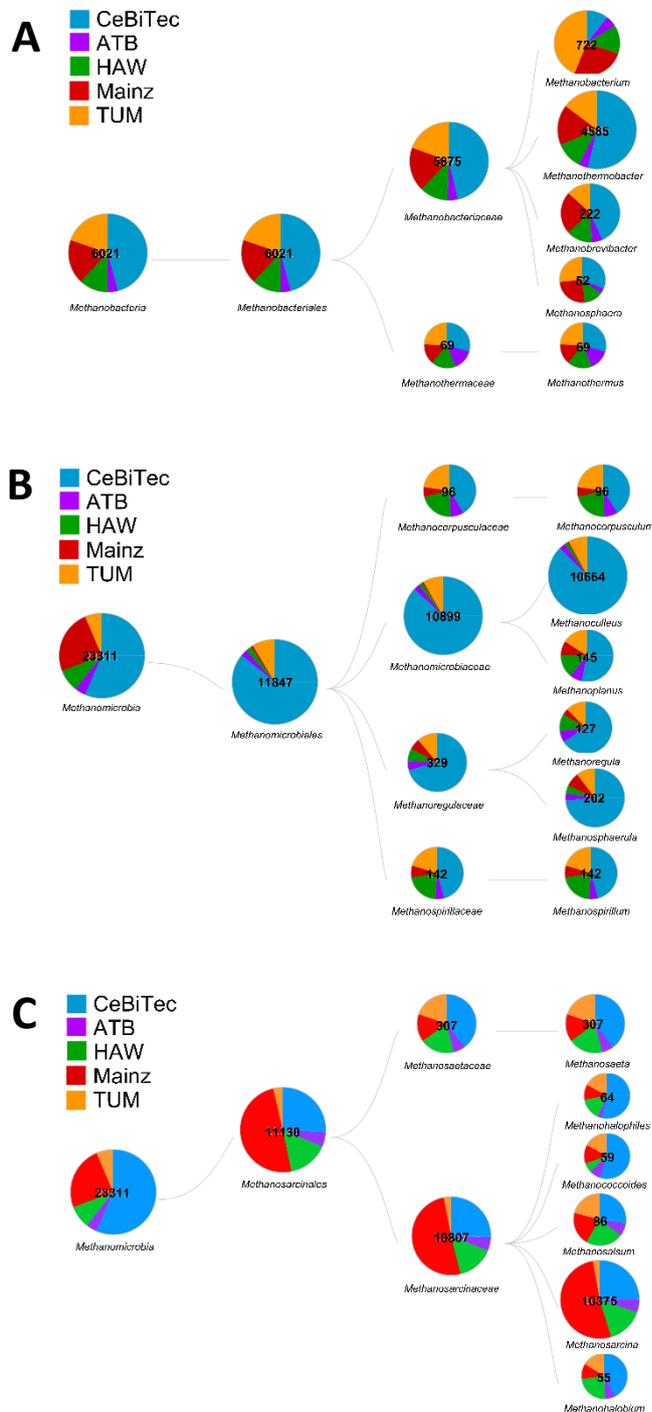
Der Ablauf des Protokolls zur DNA-Isolierung der HAW Hamburg ist in einzelnen Schritten unten angegeben. Dabei hat sich die HAW Hamburg bei der Vorbehandlung der Proben zur DNA-Extraktion (Schritt 1 – 13) an dem Protokoll des CeBiTec der Universität Bielefeld orientiert. Der detaillierte Ablauf des Protokolls zur DNA-Isolierung ist im Anhang aufgeführt (Kap. 9.2).

Der Vergleich der Ergebnisse der Metagenom Sequenzierungen aus den unterschiedlich extrahierten DNA-Proben hat gezeigt, dass die höchste Anzahl an nachweisbaren methanogenen Archaeen der Klassen *Methanomicrobia* und *Methanobacteria* unter Verwendung des GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit der Firma EURx (Roboklon, Berlin, Deutschland) erreicht werden konnte (**Abbildung 3**). Für spätere DNA-Extraktionen von Fermenterproben und Kulturen von Anreicherungen wurde daher dieses DNA-Extraktionskit benutzt.



**Abbildung 3 A und 3 B:** Prominente Taxa der mikrobiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf Klassen Ebene. Die taxonomische Klassifikation erfolgte anhand von metagenomischen Sequenzen. Für die taxonomische Klassifizierung wurde das Programm MetaCV angewandt (LIU *et al.* 2013). Je nach verwendeter DNA-Extraktionsmethode ließ sich eine unterschiedliche Menge an verwertbaren Sequenzen gewinnen. 3A (oben): Anzahl der Reads bakterieller Mikroorganismen; 3B (unten): Anzahl der Reads von Archaeen.

Zur besseren Veranschaulichung wurde die **Abbildung 3 B** mit den *Methanobacteria* und den *Methanomicrobia* taxonomisch weiter aufgefächert, um eine Aussage über die Beteiligung der Gattungen *Methanothermobacter*, *Methanoculleus* und *Methanosarcina* mit Readanzahl treffen zu können, siehe **Abbildung 4 A, 4 B** und **4 C**.



**Abbildung 4 A, 4 B und 4 C:** Prominente Taxa der archiellen Ordnungen *Methanobacteria* (4 A, oben), *Methanomicrobia* mit *Methanomicrobiales* (4 B, Mitte) und *Methanomicrobia* mit *Methanosarcinales* (4 C, unten) der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf Genus Ebene.

Aus **Abbildung 4 A** geht hervor, dass die Gattung *Methanothermobacter* bei den *Methanobacteria* dominiert. Dieser konnte auch isoliert werden. Bei den *Methanomicrobia* war die dominante Gattung *Methanoculleus*, was man grob an der Anzahl der Reads ablesen kann (**Abbildung 4 B**). Weitere grafische Darstellungen der Verteilung innerhalb der archiellen Lebensgemeinschaft befinden sich im Anhang unter 9.5.

Bei den methanogenen Archaeen in der thermophilen Biogasanlage in Viersen mit Mais und Schweinegülle als Substrat (**Tabelle 2**) dominierten kokkoide Methanomicrobien (ca. 80%) mit vergleichsweise wenigen Methanobakterien (ca. 20%). Dies ist allerdings nicht kongruent mit den mikroskopischen Direktbeobachtungen (20 : 80% anstatt 80 : 20%) bei dieser und anderen thermophilen landwirtschaftlichen BGAs, bei denen die Methanobakterien eindeutig unter thermophilen Bedingungen überwiegen (KRAKAT *et al.* 2010 a/b, KIM & SCHERER 2014). Es ist auffällig, dass je nach verwendeter Extraktionsmethode insbesondere die Relationen der Reads bei den Methanbildnern sehr stark schwanken (von etwa 2000 bis 14000), viel weniger bei den Bakterien (**Abbildung 3 B**). Danach würden die meist kokkenförmigen *Methanomicrobia* dominieren. Dies mag daran liegen, dass *Methanobacteriales* für die DNA-Extraktion schwerer mechanisch aufschließbar sind. *Methanoculleus* kann hingegen bereits aus osmotischen Gründen leicht auf dem Objektträger unter dem Mikroskop platzen.

Die Mikrobiomanalysen von **Abbildung 3A/B** zeigten weiterhin, dass bei den Bakterien vor allem *Clostridien* und *Bacilli*, dominierten, die zu den **Firmicutes** gehören. Beide Gruppen gehören zu den hydrolytischen Bakterien, sind Sporenbildner, deren Sporen über 100°C tolerieren können. Daher gibt es in diesen Gruppen auch viele thermophile Vertreter. Insbesondere *Clostridium thermocellum* dominiert hier, wie von Daniela Koeck und Kollegen im Verbund gezeigt wurde (KOECK *et al.* 2014). Daneben gab es noch eine deutliche Population von *Thermotoga*, die im Allgemeinen thermophil ist und daher typischer Weise bei erhöhten Temperaturen vorkommt. Ähnliche Populationen von *Firmicutes* und *Thermotoga* wurden dementsprechend in vollautomatisierten, kontinuierlich beladenen Laborbiogasreaktoren (3 x pro Tag) unter thermophilen (55°C) und moderat hyperthermophilen Bedingungen (60°C) beobachtet (KRAKAT *et al.* 2010 a/b). Diese Fermenter wurden über 2 Jahre lang genauestens wöchentlich und zum Teil täglich analysiert. Als Substrat diente hier allerdings Futterrübensilage anstatt Maissilage und Schweinegülle, also ein deutlich anderes und mehr konstanteres als für die Biogasanlage in Viersen. Neben den Vertretern von *Thermotoga* wurde in den Laborfermentern als zweite große hydrolytische Gruppe die *Bacterioidetes* detektiert (hier nur marginal vertreten, **Abbildung 3A/B**), die immer wieder in anaeroben Mikrobiomen auftreten, so auch dominant mit *Firmicutes* im menschlichen Darm (ARUMUGAM 2011). Bei Futterrübensilage als Substrat wechselte die Vorherrschaft trotz gleich bleibendem Substrat, pH und Temperatur mehrfach von der einen zur anderen Gruppe, *Bacterioidetes/Firmicutes* (KRAKAT *et al.* 2010 a/b). Da beide Gruppen Kohlenhydrate abbauen, ergab sich dadurch offenbar kein ausreichender Selektionsdruck und die Populations-

wechsel verliefen nicht zuordnungsfähig zur experimentell eingestellten Beladungsrate und hydraulischen Verweilzeit (KRAKAT *et al.* 2010 a/b, ARGYROPOULOS *et al.* 2013).

Es würde den Rahmen sprengen, die Ergebnisse hier alle mit den gerade in den letzten Jahren beschriebenen Mikrobiomen zu vergleichen, die teilweise mit unterschiedlichen molekularbiologischen Techniken erarbeitet wurden. Diese zeigen bis auf wenige Ausnahmen in der Regel nur Momentaufnahmen (snapshots) von Biogasanlagen und keine automatisierten, kontinuierlichen Laborversuche. Als Arbeiten über Populationsstudien an großtechnischen Biogasfermentern mögen folgende Arbeiten exemplarisch dienen: KRAUSE *et al.* 2008, NETTMANN *et al.* (2010), REGUEIRO *et al.* (2012), SUNDBERG *et al.* (2013), STOLZE *et al.* 2015 und THEUERL *et al.* (2015). Ein exzellentes Review von Demirel fasst die Befunde von Populationsstudien landwirtschaftlicher Biogasanlagen der letzten Jahre zusammen. Insbesondere zeigt sich, dass hydrogenotrophe, stäbchenförmige Methanbildner (*Methanobacteriales*) in mit Substrat gut versorgten Mais-Güllebiogasanlagen dominieren, wobei in mesophilen Biogasanlagen es meist kokkoide Methanbildner sind (DEMIREL 2014), worunter sich *Methanoculleus* oder kokkoide *Methanosarcina* (z.B. *M. mazei*) Formen verbergen können, die sogar zum ersten Mal aus einer landwirtschaftlichen Biogasanlage angereichert werden konnte, siehe dazu **Tabelle 3**, Anlage Hocke.

Es ist anzunehmen, dass ein großer Teil der in Biogasanlagen gefundenen Methanosarcinen nicht in der typischen Paketform vorliegt, was an den hohen osmotischen Kräften und dem hohen pH von 7,5 - 8,3 in solchen Anlagen liegen mag. Siehe dazu auch die Diskussion unter 3.2.1.

### 3.1.1 Molekularbiologische Identifizierung der Kulturen

Die erzielten Anreicherungen bzw. Isolate wurden molekularbiologisch analysiert, wobei während der Projektzeit der Verbund folgende Extraktionsmethode bevorzugt (höchste Organismenvielfalt, insbesondere bei Bakterien, die empfindlich für Lysozym sind): Die Gesamt-DNA wurde von 1-2 mL zu untersuchender Kultur mit Hilfe des GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit der Firma EURx (Roboklon, Berlin, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde eine PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene in 50 µL Reaktionsansätzen durchgeführt. Diese setzten sich wie folgt zusammen: 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µM von jedem Primer, 0,24 mM von jedem dNTP und 1,7 Units Dream Taq Green DNA Polymerase (Fermentas GmbH, Part of Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) in 1 x Puffer sowie 3 µL Template-DNA. Es wurden zur Bestimmung der Reinheit zwei PCR-Primer-Sets verwendet, 27F-1492R für Bakterien (LANE 1991) und A337F-A1000R für Archaeen (A337F, 5'-TAYGGGGYGCAGCAG-3', modifiziert nach GANTNER *et al.* 2011; A1000R, 5'-3'GAGAGGAGGTGCATGGCC, GANTNER *et al.* 2011; Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland), siehe Anhang 9.1. Das PCR-Programm bestand aus einem Zyklus von 96°C für 3 min, gefolgt von 30 Zyklen von 96°C für 50 s, 53°C für 50 s und 72°C für 90 s. Eine abschließende Extension

wurde bei 72°C für 8 min durchgeführt. PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%-tigen Agarosegel aufgetrennt (100V, 35 min) und die DNA durch Ethidiumbromid-Färbung und UV-Detektion ausgewertet (Die Materialien zu den molekularbiologischen Methoden sind im Anhang aufgeführt; Anhang 9.1).

Mit Hilfe eines PCR Clean-up Kits (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan; Verkäufer: DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) wurden die DNA-Amplifikate gereinigt. Zur Identifizierung der angereicherten Methanbildner in den Kulturen wurden die Archaeen-16S-rRNA-Gen-Fragmente von der Firma GATC (Köln, Deutschland) oder LGC (Berlin, Deutschland) unter Verwendung des Primers Arch915R (5'-TGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'; TOKURA *et al.* 1999; Verkäufer: Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen 16S-rRNA-Gen-Sequenzen wurden mit öffentlich zugänglichen Datenbanken mit dem Programm Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST) verglichen (ALTSCHUL *et al.* 1990).

In einer späteren Studie zeigte sich jedoch, dass ein anderer, hier nicht verwendeter Extraktionskit (FastDNA™ SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, USA) vorteilhafter für Bakterien und methanogene Archaeen ist. Vermutlich führt er zu einer ausreichend guten Detektion der gegenüber dem Lysozym-Aufschluss inerten *Methanobacteriales*, deren Zellwand aus Pseudomurein statt wie bei den Bakterien aus Murein besteht (NAKAMURA *et al.* 2006). Mit Hinblick auf die *Methanobacteriales* erscheint daher das FastDNA™ SPIN Kit for Soil geeigneter. Es ergaben sich ferner Hinweise, dass ein zweifaches Homogenisieren (2 x 30 sec und 6500 rpm) mit dem Glasperlenmix dieses speziellen Kits zu entsprechend hohen Zahlen an *Metanobacteriales* führten, die sich dann mit den mikroskopischen Beobachtungen deckten (MAUS *et al.* 2017). Gute Aufschlüsse mit hohen *Methanobacteriales*-Anteilen, die sich mit dem mikroskopischen Bild decken, ergeben sich auch mit der French Press (KRAKAT *et al.* 2010 a/b). Für gut aufschließbare Bakterien scheint es hingegen günstiger zu sein, nicht zu starke Scherkräfte zu verwenden, um die DNA nicht unnötig zu schädigen und damit die Readzahl der Gensequenzen möglicherweise zu reduzieren. Eine wissenschaftliche Beweisführung dieser Hypothese war jedoch im Rahmen des Projekts nicht möglich.

### 3.2 Isolierung methanogener Archaeen aus Biogasanlagen

In dieser Studie wurden fünfzehn verschiedenen Fermenterproben im „HAW-Medium“ kultiviert. Zur Anreicherung wurden die Kulturen mehrfach überimpft und Verdünnungsreihen hergestellt. Nach etwa der 10ten Überimpfung mit jeweils drei selektiven Antibiotika gegen Fremdbakterien konnten mikroskopisch und molekularbiologisch geprüfte einheitliche Monokulturen erreicht werden. Von sieben unterschiedlichen großtechnischen Biogasanlagen konnten 3 Isolate und 7 hochangereicherte Kulturen mit methanbildenden Archaeen erhalten werden (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** Erzielte Anreicherungen und Isolate aus 7 verschiedenen Biogasanlagen, siehe auch **Tabelle 2**

Anlage	Anlagen-Temp.	Erzielte Kultur	Sequenzähnlichkeit <sup>1</sup>	Temperatur Antibiotika <sup>2</sup>	Morphotyp
Hohenwart HAW-3	42°C	<i>Methanosarcina barkeri</i> CM1; hoch angereichert, BGA Agrafarm Technol.	99,8% – CP008746	37°C; 4, 5, 9	Vielzellige Aggregate
Biowerk	41°C	<b><i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2T; Isolat</b>	100% – HE964772	37°C; 1, 7, 8	Kokken (komplett sequenziert)
		<i>Methanospirillum stamsii</i> str. ps; hoch angereichert	98,9% – NR_117705	37°C	Filamente
		<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> Delta H; hoch angereichert	100% – NR_074260	53°C	Stäbchen
HAW-5		<i>Methanobacterium curvum</i> ; hoch angereichert	99,7% – AF276958	37°C	Stäbchen
Bützberg HAW-6	37°C	<b><i>Methanobacterium congolense/curvum</i>; Isolat</b>	99,7% – AF276958	37°C; 2, 5, 8	Stäbchen (komplett sequenziert)
Dario HAW-7	47°C	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2T; hoch angereichert Agratech Italia	100% – HE964772	26°C; 4, 7, 8	Kokken
Ernesto HAW-8	41°C	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> Delta H; hoch angereichert Agratech Italia	100% – NR_074260	37°C; 7, 8	Stäbchen
Benz HAW-9	40°C	<i>Methanosarcina mazei</i> ; hoch angereichert, Benz b. Wismar, Hocke	100% – CP009514	53°C; 1, 7, 8	Mini-Kokken
Viersen HAW-1	54°C	<b><i>Methanothermobacter marburgensis</i>; Isolat</b> Referenzanlage des Verbunds, Butschen	100% – CP001710	53°C; 3, 7, 8	Stäbchen

<sup>1)</sup> Sequenzähnlichkeit zum nächsten kultivierten und beschriebenen Verwandten mit Angabe der NCBI-Referenznummer;

<sup>2)</sup> die verwendeten Antibiotika sind im Anhang aufgeführt. 7 Isolate, HAW-2, kokkoid, Beta-Biomethananlage in Schuby (Zuckerrüben), ging verloren. HAW-4 = HAW-3 (gleiches Isolat aus gleicher Anlage).

Während der umfangreichen Kultivierung der Methanbildner hat es sich tendenzmäßig gezeigt, dass stäbchenförmige Methanbildner offenbar schneller im HAW-Medium wuchsen als kokkenförmige. Generell wuchsen die Methanbildner besser in 5 mL Röhrchen als in einer 100 mL Serumflasche. Dies hing vermutlich mit der unterschiedlichen Kontaktfläche zwischen Gas- und Flüssigphase und der damit einhergehenden Verfügbarkeit des Wasserstoffes zusammen. Des Weiteren wurde bei einer Langzeitlagerung von methanbildenden Kulturen von mehr als drei Wochen ohne Substratzufuhr beobachtet, dass stäbchenförmige und kokkenförmige hydrogenotrophe Methanbildner mit  $H_2/CO_2$  besser überlebten als acetogenotrophe *Methanosarcinae*. Hydrogenotrophe konnten sogar nach Wochen des Substratmangels durch Zugabe von  $H_2/CO_2$  revitalisiert werden, was an der Wiederkehr der Fluoreszenzkraft erkannt wurde, die nach einigen Tagen wieder auftrat. Die hydrogenotrophen Methanbildner besaßen auch grundsätzlich nach einer Lagerung eine größere Fluoreszenz unter UV-Anregung als die Acetogenotrophen. *Methanosarcina* zum Beispiel verlor bei längerem Substratmangel sowohl die Leuchtkraft als auch die Struktur der Aggregate.

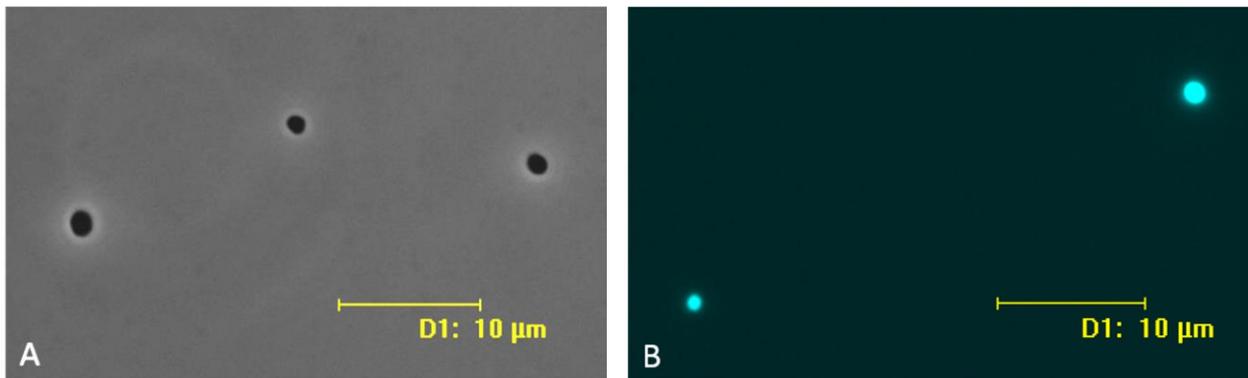
Allgemein konnte beobachtet werden, dass die Zellaggregate von *Methanosarcina* 10 – 30 fach im Durchmesser größer waren als kokkoide Methanbildner ( $0,5 - 1 \mu m^3$ ) und wiederum größer als die kleinsten stäbchenförmigen Methanbildner ( $0,1 - 0,5 \mu m^3$ ). Kulturen von *Methanosarcina* benötigten zur besseren Kultivierung ein methylotrophes Nährstoffangebot und teilweise energiereiche Substrate wie Trypticase oder Hefeextrakt, um ihre Aggregat-Struktur zu erhalten. Nur in einem guten Nährstoffzustand des Mediums wurden die typischen aggregierten *Methanosarcina*-Formen gefunden. Zum „Erwecken“ von stagnierten *Methanosarcina*-Kulturen war es ebenfalls notwendig, dass Hefeextrakt (0,1%) bzw. Trypton (0,1%) aus Casein (Difco) als zusätzliche unspezifische Nährstoffquellen dem Medium zugegeben wurde. Nicht getestet wurde in dieser Studie der Zusatz Trypticase original von BBL, das nach MILLER & WOLIN (1974) zusammen mit Hefeextrakt die besten Ergebnisse der Anzucht von Methanogenen ergab.

Als besonders widerstandsfähig gegenüber verschiedenen kulturbedingten Stressfaktoren, wie beispielsweise Temperaturwechsel oder Ammoniak, zeigten sich in einer anderen thermophilen, baugleichen BGA die stäbchenförmigen Methanbildner der Ordnung *Methanobacteriales* (KIM & SCHERER 2014, ANTONCZYK *et al.* 2015). Gründe für diese Robustheit könnten die verschiedenen methanogenen Stoffwechselwege, inklusive der alternativen Natrium- und Protonen-Pumpe zur Erzeugung von Energie, sein (CHO *et al.* 2013). Diese Protonenpumpen können für die hydrogenotrophen Methanbildner möglicherweise ausreichend Energie erzeugen, um sogar ohne ein energielieferndes Substrat zu überleben, z.B. mit  $CO_2$  alleine.

### 3.2.1 Gewinnung von methanogenen Archaeen-Isolaten

Die methanogene Kokke *Methanoculleus bourgensis* wurde aus dem mesophilen Biogasfermenter mit Bioabfall, dem sogenannten Biowerk (Speisereste, Hamburger Stadt-

reinigung), mit einer relativ hohen Fermenter-Konzentration an Ammonium (4000 - 6000 mg/L) isoliert. In der ursprünglichen Kultur waren überwiegend methanogene Kokken und wenig methanogene Stäbchen vorhanden. Nach 11 Transfers wurde eine Monokultur von Kokken erhalten. Jedoch wuchs diese im Vergleich mit anderen stäbchenförmigen Methanbildnern relativ langsam. Das Genom von *Methanoculleus bourgensis* aus dem Biowerk in Hamburg wurde vollständig vom CeBiTec (Universität Bielefeld) sequenziert. Die **Abbildungen 5 A** und **5 B** zeigen mikroskopische Aufnahmen des Isolats des Methanbildners. Deutlich ist die runde Form der Einzelzellen zu erkennen.



**Abbildung 5:** Mikroskopische Aufnahmen des Isolats von *Methanoculleus bourgensis* (mesophil, isoliert aus der Bioabfallanlage Biowerk. A) Phasenkontrast und B) Fluoreszenzaufnahme (420 nm).

Lange filamentöse Methanbildner, die zur Gattung *Methanospirillum* gehören, wurden ebenfalls im Bioabfallfermenter (Biowerk) während der Kultivierung bei mesophilen Bedingungen (37°C) gefunden. Die Trennung dieser Art von anderen stäbchenförmigen Methanbildnern sowie von Bakterien war bisher nicht möglich. Ein Grund für die erschwerte Isolierung von Vertretern der Gattung *Methanospirillum* könnte sein, dass diese vermehrt in Co-Kulturen als syntrophe Bakterien auftreten. Yitai Liu und Kollegen fanden bereits 1999 die syntrophe Abhängigkeit von den Propionat oxidierenden *Smitthella propionica* mit Methanbildnern wie *Methanospirillum hungatei* heraus (LIU *et al.* 1999). Helena Junicke und ihre Kollegen beschrieben wesentlich später ein voneinander abhängiges syntrophisches Wachstum von *Desulfovibrio* sp. G11 und *Methanospirillum hungatei* JF1 (JUNICKE *et al.* 2015).

Des Weiteren konnte durch die Kultivierung der Probe vom Biowerk unter thermophilen Bedingungen bei 55°C der Methanbildner *Methanothermobacter thermoautotrophicus* angereichert werden. Dieser Organismus wurde ursprünglich aus dem 35°C Faulturm einer Kläranlage in Marburg isoliert (BOONE 2001, LIESEGANG *et al.* 2010), wächst aber ansonsten unter Laborbedingungen am besten bei Temperaturen oberhalb von 40°C bei einem Optimum von 65 – 70°C (ZEIKUS & WOLFE 1972). Obwohl die städtische Bio-

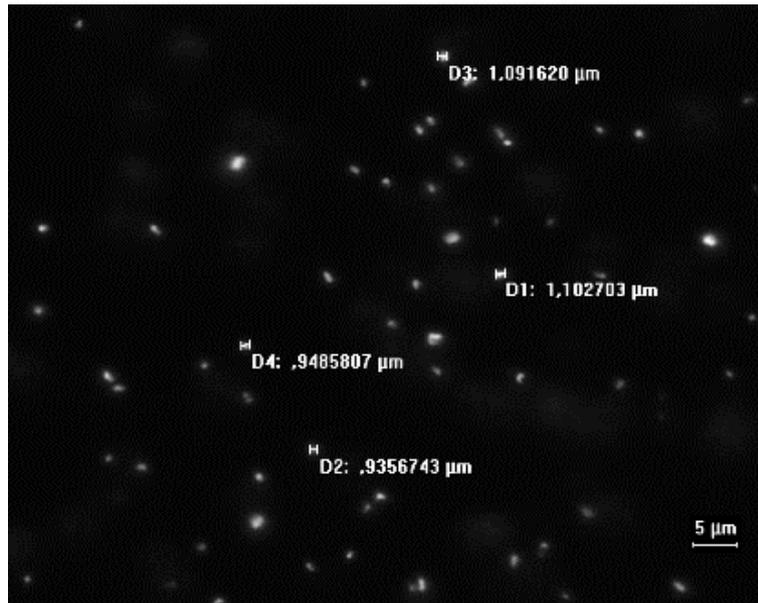
gasanlage Biowerk nur bei 41°C arbeitet, reicht anscheinend diese Temperatur bereits aus, um eine überlebensfähige Population an *M. thermoautotrophicus* aufzuweisen.

Unter mesophilen Bedingungen konnte als viertes methanogenes Archaeon ein Vertreter der Gattung *Methanobacterium* hoch angereichert werden. Der verwandtschaftlich nächste kultivierte und beschriebene Methanbildner ist mit einer Sequenzähnlichkeit von 99,7% *Methanobacterium curvum* (NCBI (internationale Datenbank): AF276958).

Von der ebenfalls mit kommunalen Bioabfällen der Stadt Hamburg gespeisten Biogasanlage Bützberg konnten interessanter Weise die gleichen stäbchenförmigen Methanbildner mit einer Inkubations-Temperatur von 37°C angereichert und isoliert werden. Es handelte sich daher ebenfalls um nahe Verwandte von *Methanobacterium curvum*. Diese Spezies wuchs relativ schnell zu hohen Zelldichten (2 - 3 Tage). Das Genom des Isolats wurde vollständig durch den Verbundpartner CeBiTec sequenziert (Universität Bielefeld). Erstaunlich ist das Vorkommen der gleichen Spezies in den zwei sehr verschiedenen Biogasanlagen. Die beiden Anlagen der Stadtreinigung Hamburg werden zwar mesophil mit einer ähnlichen Temperatur von 37°C in Bützberg und 41°C im Biowerk gefahren, aber die Anlage in Bützberg ist eine sogenannte Trockenvergärung in Boxen, während das Biowerk eine gerührte Nassvergärung (beprobte Stufe) mit Hydrolysestufe und gesondertem Nachgärer darstellt. Die Substratzusammensetzung ist in beiden Anlagen ebenfalls sehr unterschiedlich: grüne kommunale Abfälle in Bützberg (grüne Tonne) und vornehmlich überlagerte Lebensmittel sowie Speisereste im Biowerk, wobei die Variation an Kohlenstoff- und Proteingehalt der Biomasse bei Lebensmitteln hoch divers ist. Diese Substrate sollten daher eher zu verschiedenartigen Populationen an Methanbildnern geführt haben (WILKINS *et al.* 2015).

Von der landwirtschaftlichen Biogasanlage Ernesto aus Italien, bezogen über die Firma Agratech Italia, wurde ein stäbchenförmiger Methanbildner der Familie *Methanobacteriaceae* unter mesophilen Bedingungen (37°C) hoch angereichert. Dieser wies eine Sequenzähnlichkeit von 100% zu einer ganzen Reihe von Methanobacteriales auf. Grund hierfür war das recht kurze sequenzierte Teilstück des 16S rRNA-Gens von nur knapp 500 bp. So stimmt die partielle Sequenz zum Beispiel mit *Methanothermobacter thermoautotrophicus* str. Delta H (NCBI: NR\_074260), *Methanothermobacter wolfeii* str. SIV6 (KT368944) und *Methanothermobacter sp.* CaT2 (AP011952) vollständig überein. Da eine höhere Anreicherung aufgrund von einer starken bakteriellen Begleitflora nicht möglich war, wurde eine genauere Bestimmung des Verwandtschaftsverhältnisses nicht durchgeführt.

Aus dem Fermenter "Hocke" wurden methanogene Mini-Kokken angereichert (0,9 – 1,2 µm, **Tabelle 9**). Die ursprüngliche Kultur enthielt zwei dominierende Arten von Methanbildnern, die sich morphologisch unterschieden (Stäbchen und Kokken). Die Kultur wurde zuerst bei einer Temperatur von 26°C und später nach einigen Überimpfungen bei 53°C inkubiert. Durch den Temperaturwechsel ließen sich die Mini-Kokken stark anreichern, die zum Teil auch sehr kleine Aggregate bildeten (**Abbildung 6**).



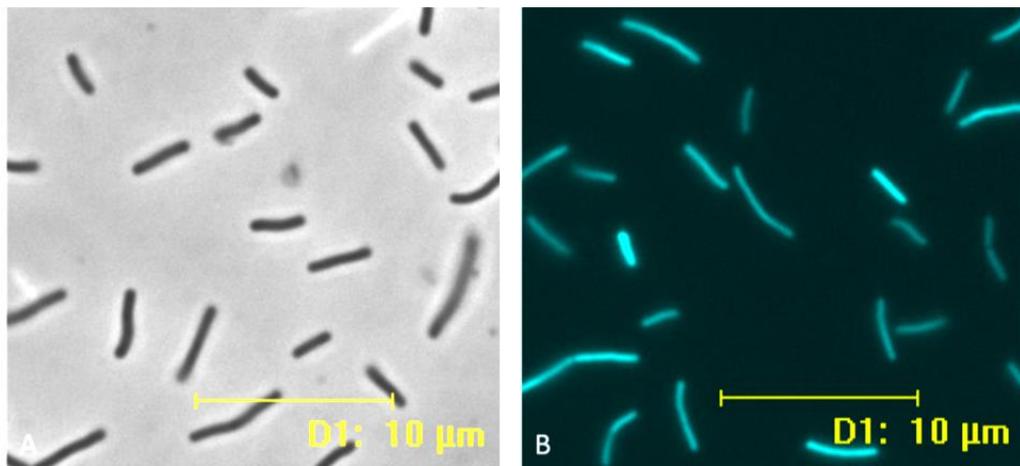
**Abbildung 6:** Hoch angereicherte Kultur von *Methanosarcina mazei* aus der mesophilen (40°C), landwirtschaftlichen Biogasanlage in Hocke mit Rindergülle, Mais und Gras. Fluoreszenzaufnahme (420 nm) mit Distanzmessungen der Mini-Kokken D1 bis D4 von jeweils etwa 1 µm.

Anhand einer 16S rRNA-Gen-Analyse wurden diese besonders kleinen Kokken als singuläre Zellen bzw. sehr kleine Aggregate von *Methanosarcina mazei* detektiert (**Abbildung 6**). Bemerkenswert ist, dass das spezielle Archaeon noch nicht aus einer Biogasanlage isoliert wurde, aber vermutlich die von unserer Arbeitsgruppe in anderen Anlagen gelegentlich beobachteten Mini-Kokken (0,9 – 1,2 µm) verkörpert. Diese sind wesentlich kleiner als die dominant in mesophilen Anlagen gefundenen Kokken von *Methanoculleus*, deren durchschnittliche Größe in etwa 2 – 3 µm beträgt. Diese eher untypische Form der eigentlich vielzelligen Aggregate bildenden Methanbildner kommt bei Archaeen der Gattung *Methanosarcina* vermehrt bei besonders hohen Nährstoff- oder Salzkonzentrationen vor (DAVIS & HARRIS 1985). David Boone und Robert Mah fanden heraus, dass der Stamm *Methanosarcina mazei* S-6 nur wenige oder keine Aggregate bildet, wenn das Substratangebot an Acetat oder Methanol bei 50 mM lag. Bei einer höheren Konzentration von 100 mM an Acetat oder Methanol trat keinerlei Aggregatbildung mehr auf (BOONE & MAH 1987). Bei hohen Salzkonzentrationen von 0,4 M bis 1,0 M Natriumchlorid, entsprechend 2,4 – 5,8% Salzgehalt, disaggregierten zahlreiche Spezies von *Methanosarcina* (SOWERS *et al.* 1993). Immerhin traten in den Biogasanlagen Bützberg und Biowerk Salzkonzentrationen zwischen 1,5 – 2,5% auf, wobei landwirtschaftliche Biogasanlagen durch die Güllezusätze ähnlich hohe Salzkonzentrationen aufweisen (eigenes Messprogramm an 15 verschiedenen Biogasanlagen über 10 Jahre). Ein weiterer Grund für den Zerfall der Aggregate in Einzelzellen wird das Enzym Disaggregatase sein, welches durch einen pH-Wert oberhalb von 6,3 aktiviert wird, wenn eine erhöhte Zelldichte vorliegt. Dadurch wird das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen größer, was einen besseren Substrataustausch ermöglicht (LIU *et al.* 1985,

XUN *et al.* 1990). Entsprechend hohe pH-Werte von 7,7 – 8,1 herrschten ebenfalls in den Biogasanlagen und Bützberg. Dies ist jedoch nichts Außergewöhnliches, denn der pH von landwirtschaftlichen Anlagen liegt im gleichen Bereich.

Der stäbchenförmige Methanbildner *Methanothermobacter marburgensis* wurde aus der landwirtschaftlichen thermophil betriebenen Biogasanlage Viersen bereits nach sechs Überimpfungen isoliert. Wie oben bereits erwähnt, konnte der Methanbildner aus dem 35°C Faulturm einer Kläranlage in Marburg in Deutschland isoliert werden (WASSERFALLEN *et al.* 2000, BOONE 2001, LIESEGANG *et al.* 2010). Es ist das erste Isolat von *M. marburgensis* aus einer großtechnischen, landwirtschaftlichen Biogasanlage. Das Isolat der HAW Hamburg aus der BGA Viersen wurde zu dem Projektpartner CeBiTec (Universität Bielefeld) für eine Gesamtgenomsequenzierung gegeben.

In den **Abbildungen 7 A** und **7B** sind mikroskopische Aufnahmen des Isolats von *M. marburgensis* dargestellt. Der stäbchenförmige Methanbildner hatte eine Länge von etwa 2,5 – 6,0 µm (A). Die Zellen waren nicht beweglich. Sie fluoreszierten grün bis türkisgrün bei der für Methanbildner charakteristischen blauviolettten Anregungswellenlänge von 420 nm (B).



**Abbildung 7:** Erzieltes Isolat von *Methanothermobacter marburgensis* aus der thermophilen (54°C), landwirtschaftlichen Biogasanlage in Viersen mit Mais und Schweinegülle. A) Phasenkontrast und B) Fluoreszenzaufnahme (420 nm).

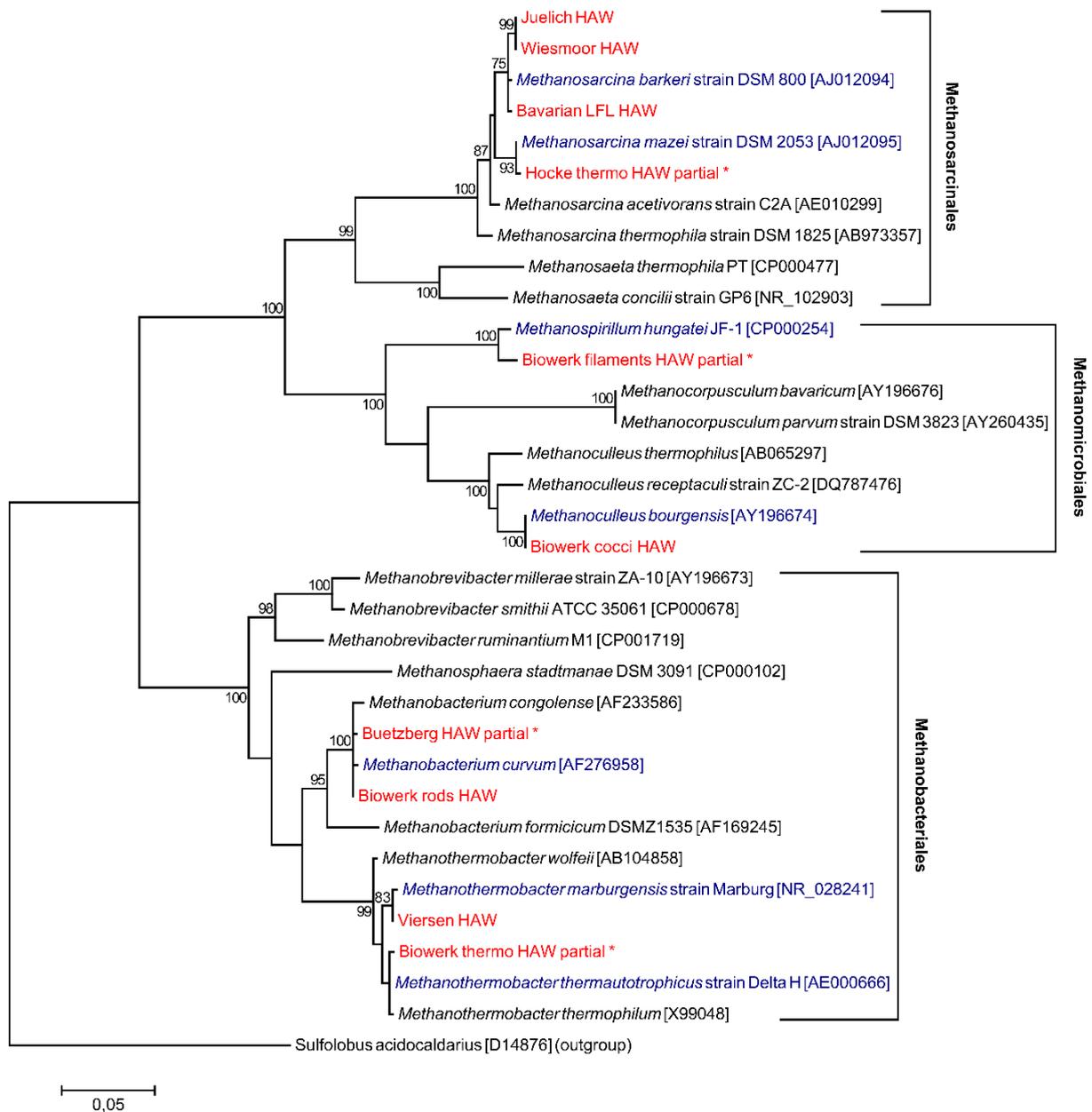
### 3.2.2 Genomsequenzierung der Isolate

Während der Projektlaufzeit wurden insgesamt drei Isolate an Herrn Dr. Andreas Schlüter und Frau Irena Maus, den Projektpartnern am CeBiTec, zur Gesamtgenomsequenzierung geschickt. Bei den drei Stämmen handelte es sich um *Methanoculleus bourgenis* (BGA Biowerk), *Methanothermobacter marburgensis* (BGA Viersen) und einem nahen Verwandten von *Methanobacterium curvum* (BGA Bützberg). Entsprechend der Eigenpublikation mit TORRES *et al.* (2016) handelt es sich eher um *Methanobacterium congolense*. Bei dem vielversprechenden Stamm von *Methanothermobacter marbur-*

*genesis*, der bisher noch nicht aus einer Biogasanlage isoliert wurde, fehlte zur Genomanalyse am Ende der Projektlaufzeit noch eine zusätzliche Menge an extrahierter, hochmolekularer DNA. Es wurde aber per 16S rRNA Analyse die NCBI-GenBank-Nr. KU667127 hinterlegt.

Die erneute zeitintensive Anzucht dieses Methanbildners konnte vor Projektende nicht mehr abgeschlossen werden. Die beiden anderen Isolate konnten erfolgreich sequenziert werden.

In Ergänzung zu den erfolgten Genomsequenzierungen der Isolate wurden die 16S rRNA-Gensequenzen der angereicherten Spezies analysiert. **Abbildung 8** zeigt den phylogenetischen Stammbaum (Maximum Likelihood-Algorithmus) der erzielten Anreicherungen und Isolate im Zusammenhang mit anderen beschriebenen Spezies der verschiedenen Gattungen an Methanbildnern. Von den BGAs Dario und Ernesto konnten keine ausreichend langen Gensequenzen erhalten werden. Zusätzlich ist die angereicherte Kultur von *Methanosarcina* mit Namen „Jülich“ aufgeführt. Dieser Stamm wurde ähnlich wie der Stamm Wiesmoor nach 32 Jahren wieder zum Leben erweckt, aber nicht neu isoliert (Näheres siehe 4.3.14). Diese Wiederbelebung wird als Beweis für die guten Eigenschaften des entwickelten „HAW Mediums“ gesehen.

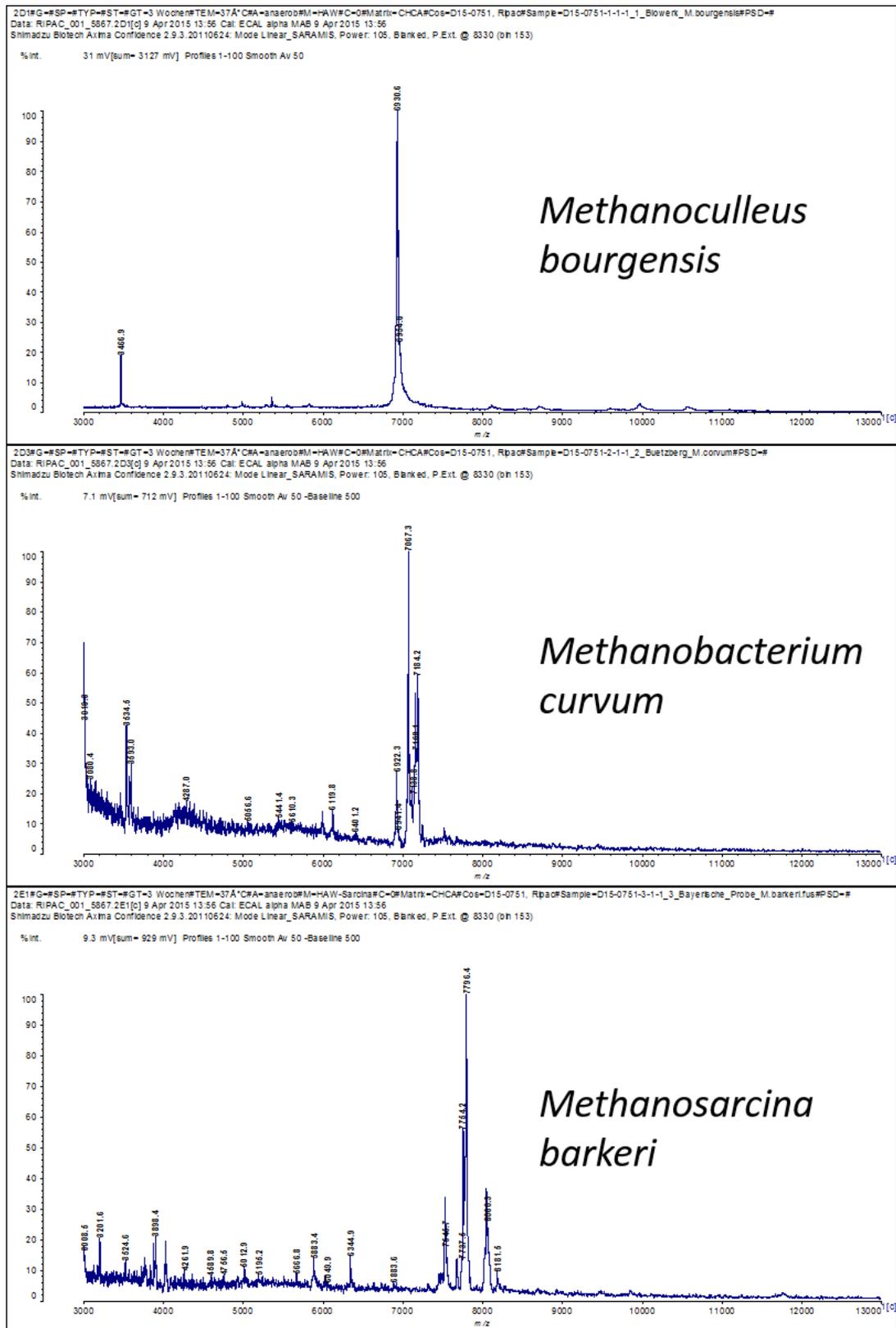


**Abbildung 8:** Phylogenetischer Stammbaum von angereicherten bzw. isolierten Methanbildnern aus unterschiedlichen Biogasanlagen. Dargestellt sind die Anreicherungskulturen und Isolate in **ROT**, deren nächste Verwandte in **BLAU** und ausgewählte, bereits gefundene Gensequenzen von Methanbildnern aus anderen Biogasanlagen (Werte von Datenbanken). Berechnet wurde der Stammbaum basierend auf Maximum Likelihood-Analysen nach dem Tamura-Nei Model (KUMAR *et al.* 2001) der 16S rRNA Gensequenzen. Sequenzen  $\leq 1200$  bp sind durch \* gekennzeichnet. Als Wurzel wurde *Sulfolobus acidocaldarius* gewählt. Bootstrap-Werte sind ab 75% angegeben. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 5%.

### 3.2.3 Identifizierung der 4 Methanbildner-Isolate mittels Maldi-TOF

Für den Aufbau der Datenbank der Maldi-TOF MS Analysen wurden die erzielten methanogenen Isolate zum Projektpartner RIPAC LABOR GmbH (Potsdam-Golm) gesendet. Dabei zeigte die etwas lang gelagerte Kultur aus der BGA Viersen (*Methanothermobacter marburgensis*) keinen eindeutigen Peak. Drei weitere Isolate konnten einwandfrei analysiert werden. Da bei RIPAC keine Referenzdatenbank für Methanbildner vorlag, ist bisher eine Identifizierung von Kulturen über Maldi-TOF nicht möglich. Für künftige weitere Analysen können die Ergebnisse dennoch als Referenz genutzt werden. Um genauere Bestimmungen per Maldi-TOF durchführen zu können, sind aber auch von den nun vorliegenden Methanbildnern mehr Isolate mit unterschiedlichen Wachstumsraten notwendig. Die entstandenen Peaks resultierten aus den unterschiedlichen Proteinmassen, welche Arten-spezifisch sind. Die Methanbildner zeigten eine relativ geringe Proteinmasse im Vergleich zu der von Bakterien. Der Grund hierfür ist noch unklar.

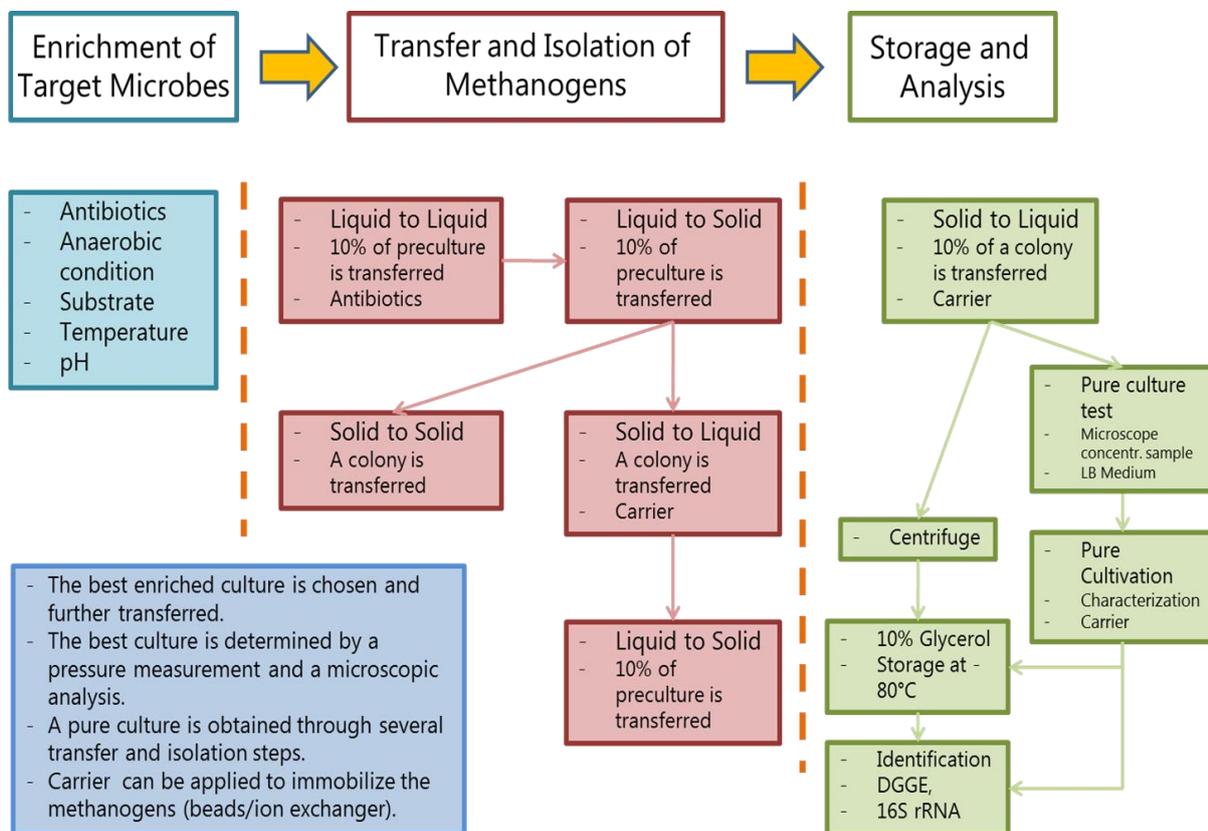
In **Abbildung 9** sind die Diagramme der Maldi-TOF-Analysen grafisch dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Intensität (Konzentration, Häufigkeit) von Proteinen und die X-Achse die Proteinmassen. Dabei bedeutet ein Peak ein Protein. Die drei analysierten Methanbildner sind folgende: *Methanoculleus bourgensis* (Biowerk), *Methanobacterium curvum* (Bützberg) und *Methanosarcina barkeri* (Bayerische Probe, LfL); separat über 16 s RNA-Analysen bestimmt.



## 4 Kulturtechnik

### 4.1 Strategie für die Isolierung methanbildender Archaeen

Für die Isolierung der Ziel-Methanbildner wurde eine Strategie entwickelt (**Abbildung 10**). Durch den Einsatz von drei unterschiedlichen Antibiotika und den Hauptsubstraten Wasserstoff ( $H_2$ , Energiequelle) und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ , Kohlenstoff-Quelle) wurden die anaeroben, chemoautotrophen Zielmikroorganismen zuerst angereichert. Nach dem Verbrauch des Nährmediums wurde die Flüssigkultur weiter in ein frisches Medium überimpft, wobei eine andere Antibiotikakombination gegen Fremdbakterien eingesetzt wurde, um die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung der Ziel-Methanbildner zu erhöhen. Antibiotika konnten eingesetzt werden, weil die meisten Archaea gegen Antibiotika unempfindlich sind.



**Abbildung 10:** Überblick möglicher Isolierungsstrategien im Hinblick auf anaerobe methanbildende Kulturen.

Die am besten angereicherten Kulturen wurden über Druckmessung und Fluoreszenz-Mikroskopanalyse ausgewählt und sowohl in Flüssigmedium als auch auf Festmedium (Petrischalenbox) überimpft. Für die Überprüfung der Reinheit der isolierten Methanbildner wurden die Kulturen durch hohen Zusatz von Hefeextrakt in nährstoffreiches Flüssigmedium bzw. Festmedium überimpft. Diese unspezifischen Zusätze lassen hydrolytische Fremdbakterien in Erscheinung treten. Nach einer Inkubationsdauer von min-

destens zwei Tagen wurde der Grad der Reinheit durch Auszählen der Fremdkolonien bzw. durch mikroskopische Analysen ermittelt. Sobald eine Anreicherung bei diesen Reinheitstests keinerlei Wachstum von unerwünschten bakteriellen Begleitorganismen aufwies, wurde die Reinheit molekularbiologisch überprüft. Dazu wurde mit für Archaeen bzw. Bakterien spezifischen Oligonukleotiden (Primern) die Teilstücke der 16S rRNA-Gene vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese und anschließender Detektion ausgewertet (siehe auch 4.3.4).

Zur Erhöhung der Wachstumsraten der Methanbildner in Flüssigmedien wurde ein Immobilisierungsmaterial getestet. Es handelte sich dabei um Borosilikatglas mit einer Porengröße von 60 µm (Sinterglas, 1,5 mm Pellets, [www.robu.net](http://www.robu.net)). Dieses mit seiner großen Oberfläche viel versprechende Immobilisierungs-Material erwies sich in der Praxis jedoch als unbrauchbar, da sich der im porösen Material befindliche Sauerstoff nicht ausreichend entfernen ließ. Des Weiteren wurde Alginat als eine Alternative getestet, welches aber ebenfalls aufgrund des enthaltenen, nicht entfernbaren Sauerstoffs auswich.

## 4.2 Überblick zur anaeroben Kulturtechnik

Aufgrund der etwa 8000 Biogasanlagen in Deutschland ([www.fnr.de](http://www.fnr.de), 2015 ) ist zur Steigerung der Raumzeitausbeuten aufgrund der steigenden Rohstoffpreise und bei gleichzeitiger Reduktion der Einspeisungsgebühren gemäß dem Deutschen Energieeinspeisungsgesetz ein Forschungsbedarf zur Untersuchung der beteiligten Schlüsselmikroorganismen, insbesondere der „Methanbildner“, in Biogasanlagen groß. Nur mit einem guten Verständnis über die an der Methanproduktion beteiligten Mikroorganismen kann eine effiziente Leistung von Biogasanlagen erreicht werden. Zusätzlich könnten neuartige, besonders aktive Methanbildner zur Prozessstabilisierung oder Ertragssteigerung eingesetzt werden. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Methanproduzierenden Mikroorganismen kultiviert. Im Jahr 1936 wurden vier Methanbildner systematisch zusammengefasst (BARKER 1936). Nach wie vor stellen die Kultivierungsbedingungen der Methanbildner die Forscher vor Herausforderungen.

### 4.2.1 Historische Entwicklung der anaeroben Techniken zur Kultivierung von Methanbildnern

Die Kultivierung von Methan produzierenden Mikroorganismen (methanogene Archaeen) gelingt nur unter strikt anaeroben Bedingungen. Auch ist der Wissensstand über benötigte Nährstoffe und Spurenelemente für Methanbildner weitestgehend unzureichend (JARRELL & KALMAKOFF 1988). Zahlreiche Methanogene können nur in einer symbiotischen Lebensgemeinschaft mit anderen Mikroorganismen wachsen. Dazu möge eine kleine Auswahl der umfangreichen Literatur zu dieser mikrobiologischen Problema-

tik dienen: BRYANT *et al.* (1967), CONRAD *et al.* (1986), SCHINK (1997), SCHERER (2001), SHINK & STAMS (2006) und SOUSA *et al.* (2009).

Die Methanbildung durch Mikroorganismen ist ein weit verbreitetes Phänomen. Sie kommt ubiquitär in der Natur vor, wie beispielsweise bei Verdauungsprozessen von organischem Material in Rumen von Tieren speziell von Wiederkäuern oder in Sedimenten und Schlämmen von aquatischen Lebensräumen.

Der Erhalt der ersten Reinkultur eines Methanbildners gelang 1947 Charles Schnellen mit der Isolierung von *Methanosarcina barkeri* (SCHNELLEN 1947). Wesentlich später wurde eine detaillierte Studie über die Methanbildner insbesondere mit Hinblick auf die biochemischen Eigenschaften und Physiologie verfasst (ZEIKUS 1977). Anschließend wurde eine umfangreiche und allgemeine Bewertung der anaeroben Kultivierungstechniken durchgeführt (LJUNGDAHL & WIEGEL 1986).

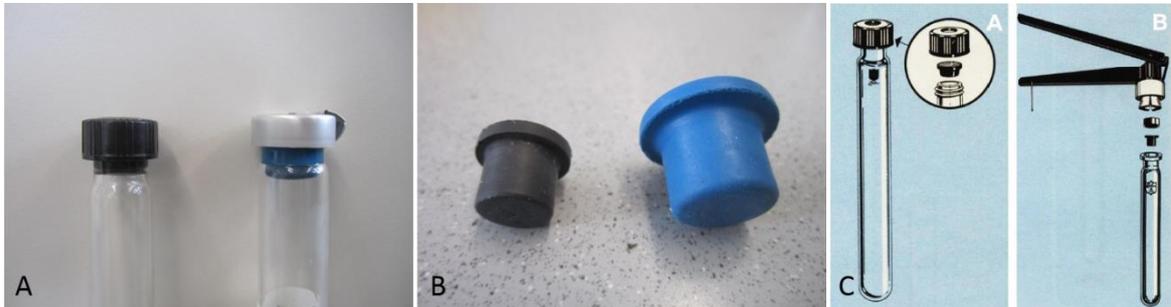
Eine sehr gute Übersicht über die verschiedenen anaeroben Kultivierungssysteme wurde 1988 von Daniel Fung zusammengefasst (FUNG 1988), ferner kamen einige wichtige Bemerkungen über die anaeroben Verfahren von Caroline Plugge hinzu (PLUGGE 2005). Sie erwähnte zwei wichtige Punkte für die Kultivierung von anaeroben Prokaryoten: der Ausschluss von Sauerstoff und die Auswahl der geeigneten Wachstumsmedien. Erst kürzlich wurde eine ausgezeichnete Zusammenfassung der anaeroben Kultivierungstechniken vom „Altmeister“ Wolfe veröffentlicht (WOLFE 2011), welcher dieselben Techniken bereits im Wesentlichen im Jahr 1971 eingeführt hatte (WOLFE 1971). Obwohl die detaillierten Techniken für die anaerobe Kultivierung der Methanbildner von Labor zu Labor variieren, basiert die am häufigsten verwendete Methode auf der sogenannten „Hungate – Technik“ (HUNGATE 1950, HUNGATE 1969). Robert Hungate hat die Präparationstechnik des Mediums unter anaeroben Bedingungen zum ersten Mal ausgearbeitet und publiziert.

Robert Wolfe fasste 2011 die wichtigsten Punkte der Hungate-Technik in drei Teile zusammen: 1) Arbeiten unter Ausschluss von Sauerstoff bei der Medienvorbereitung, 2) Sterilisation der anoxischen Medien und 3) Verfahren für die aseptische Beimpfung und den Transfer von anaeroben Mikroorganismen in Medien (WOLFE 2011). Die Kultivierung speziell von hydrogenotrophen Methanogenen unter Überdruck, der ein mögliches Eindringen von Sauerstoff verhinderte, wurde von William Balch und Robert Wolfe erläutert (BALCH & WOLFE 1976).

#### 4.2.2 Aufbau anaerober Kulturgefäße

Geeignete Gefäße zur Kultivierung der anaeroben Archaeen gewährleisten eine einfache Handhabung unter sauerstofffreien Bedingungen für die Probenahme, die Beimpfung und die Gasfütterung bei der Kultivierung der hydrogenotrophen Methanbildner. Die am häufigsten verwendete und einfachste Art von Gefäßen sind die sogenannten

Hungate-Röhrchen (HUNGATE 1969) und die Balch-Röhrchen (BALCH & WOLFE 1976) (**Abbildung 11**). Diese besitzen auch bei Überdruck einen gasdichten Verschluss.



**Abbildung 11:** Kulturgefäße von Hungate und Balch/Wolfe. A und B: schwarzer schraubbarer Deckel und schwarzer Butylgummistopfen (Röhrchen-Art nach Hungate) sowie Bördelverschluss mit Aluminium-Kappe und blauem Butylgummistopfen (Röhrchen-Art nach Balch); C Verschluss des Deckels durch Schrauben bzw. Verbördeln.

Das modifizierte Hungate-Röhrchen wird durch einen Schraubverschluss mit Butylgummistopfen verschlossen, während das Balch-Röhrchen einen Bördelrand besitzt, der durch einen Butyl-Gummistopfen und einer Aluminium-Kappen-Dichtung abgedichtet wird. Beide Kulturröhrchen lassen einen gasdichten Überdruck von 2 bis 3 bar zu.

Des Weiteren werden zur standardmäßigen Kultivierung von methanogenen Mikroorganismen verschiedene Größen an Serumflaschen (25 – 200 mL) mit Butylgummistopfen und Aluminium-Kappendichtung verwendet (MILLER & WOLIN 1974), **Abbildung 12**. Größere voluminöse Glasgefäße sind bei der Kultivierung unter Überdruck eher ungeeignet.

#### 4.2.3 Sauerstoffempfindlichkeit

Zur Sauerstoffempfindlichkeit der methanogenen Archaeen wurde berichtet, dass die Methanbildung durch Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff bereits ab einer Konzentration von 30 nM gehemmt wird (SCOTT *et al.* 1983). Auf festen Medien führt die Einwirkung von Luft zu einem raschen Tod der Methanbildner innerhalb von 10 - 30 Stunden (KIENER & LEISINGER 1983). Die Löslichkeit von Sauerstoff in der Luft bei 25°C und 1 bar Luftdruck beträgt 8 mg/L (250 nM) oder 4,6 mg/L (144 nM) bei 60°C. Diese extreme Empfindlichkeit der Methanogenen verdeutlicht die Schwierigkeit der Anaerobisierung (Entfernung von Restsauerstoff). Damals wurde der Restsauerstoff zur Begasung während der Medienherstellung und Kultivierung mit elektrisch erhitzten (350°C) Kupferabsorbieren entfernt (HUNGATE 1969). Diese umständliche Technik ist bei den heutigen Reinheitsgraden der verwendeten Gase (99,995%) und bei Anwendung der Vakuumtechnik nicht mehr erforderlich, **Abbildung 13**.

Eine Möglichkeit zur Entfernung des Sauerstoffs aus den Kulturmedien besteht durch intensives, gegebenenfalls mehrmaliges Kochen, was jedoch sehr zeitaufwendig ist. Die Sauerstoffentfernung durch kaltes „Kochen“ der Medien mit Hilfe einer Vakuumpumpe sowie durch die Zugabe von Reduktionsmitteln scheint am elegantesten. Geeignete Reduktionsmittel sind Cystein und Natriumsulfid (SCHERER & SAHM 1981, WOLFE 2011) sowie Titan(III) citrat (ZEHNDER & WUHRMANN 1976, JONES & PICKARD 1980, WACHENHEIM & HESPELL 1984). Dabei sind die Reduktionsmittel, insbesondere Natriumsulfid, nur in geringen Konzentrationen einsetzbar, da sie ansonsten auch die Methanogenen in ihrem Wachstum hemmen. Im Allgemeinen wird Resazurin als Redoxpotential-Indikator verwendet.

#### 4.2.4 Medien-Komponenten

Die Auswahl der Medienkomponenten ist einer der wichtigsten Faktoren für eine erfolgreiche Kultivierung von methanogenen Archaeen. Zur Charakterisierung von Mikroorganismen ist die Isolierung durch ein definiertes Medium notwendig, aber es kann sehr häufig zu einer zeitaufwendigen Arbeit führen oder zum Misserfolg aufgrund des Fehlens/Überdosierung von spezifischen Nährstoffen, die für das Wachstum notwendig sind. Die Anwendung einer relativ niedrigen Konzentration von Nährstoffen, ungewöhnlicher neuartigen Nährstoffquellen und eine relativ lange Inkubationszeit sind für die erfolgreiche Kultivierung von methanogenen Archaeen notwendig (JARRELL & KALMOKOFF 1988, PLUGGE 2005). Die herkömmlichen, komplexen Medien für Methanbildner enthalten typischerweise eine oder mehrere Kohlenstoffquellen wie Kohlenstoffdioxid, Methanol, Natriumacetat, einige Makroelemente wie Kalium, Magnesium, Schwefel, Natrium, Phosphor und Eisen (BALCH & WOLFE 1976), Spurenelemente und Vitaminlösungen (WOLIN *et al.* 1963) einschließlich nicht definierter Wachstumsstimulatoren wie Panseninhalt, Faulschlamm, Hefeextrakte und Trypticase (MILLER & WOLIN 1974). Unter diesen Stimulatoren wurden Pansenflüssigkeit und Trypton aus Casein (Trypticase) am positivsten beschrieben (FERGUSON & MAH 1983). Die komplexen Medien, die Bestandteile aus den ursprünglichen Lebensräumen der Methanbildner enthalten, können die Inkubationszeit (Adaptionszeit) deutlich reduzieren. Dies offenbart, dass die Anzucht von methanogenen Archaeen sehr individuell und keine Routine ist. Ein anderer wesentlicher Faktor ist die pH-Kontrolle durch ein Puffersystem, beispielsweise Carbonat-Puffer (WOLFE 2011), wobei sich langjährig im Labor des Projektleiters die bei pH 7 puffernde Substanz Imidazol bewährt hat (SCHERER 1989). Eine effektive Pufferung ist vor allem für die hydrogenotrophen Methanbildner bei der Fütterung von CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle wichtig.

#### 4.2.5 Kultivierung H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> verwertender Methanbildner (hydrogenotrophe)

In den vergangenen Jahrzehnten wurden mehrere Methoden zur Kultivierung von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> verwertenden Methanbildnern angewendet. So wurde im Jahr 1966 ein einfacher Anaeroben-Topf für mehrere Agar-Platten konstruiert, deren Deckel mit einer Gummidichtung gasundurchlässig abgedichtet wurde. Mit einem Palladium-Pellet-Katalysator wurde die Sauerstoffentfernung aus einem Einweg-Wasserstoff-Kohlendioxid-Generator (Natriumborhydrid sowie einer Mischung aus Zitronensäure und Natriumbikarbonat) aktiviert und das negative Redox-Milieu wurde mit Methylenblau-Indikatoren im Gefäß überprüft (BREWER & ALLGEIER 1966).

Zwei Jahre später wurde ein Verfahren für die Kultivierung von hydrogenotrophen Methanbildnern im Flüssigmedium mit 200 mL Schüttelkolben sowie in einem 12 L-Fermenter vorgestellt. Eine Vorrichtung zur Bereitstellung einer Gasmischung aus 80% H<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> wurde dazu entwickelt (BRYANT *et al.* 1968). Ein etwas verbessertes Flüssigkultursystem für Schüttelkolben wurde von Lacy Daniels und J. Gregory Zeikus eingeführt (DANIELS & ZEIKUS 1975). Mit Gaseinlass und -auslass wurde die kontinuierliche Begasung ermöglicht. In einem extra Seitenarm konnte eine Trübungsmessung der Kultur durchgeführt werden. Die Beimpfung wurde mittels Spritzen und Kanüle durch einen Neopren-Stopfen durchgeführt.

#### 4.2.6 Strategie zur Isolierung von Methanbildnern

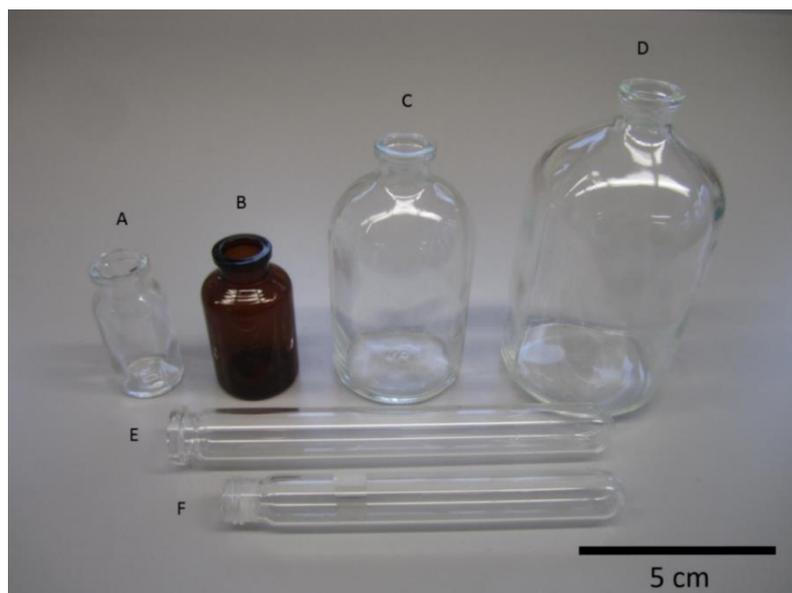
Zur Isolierung methanogener Kulturen auf festen Nährböden wurde unter anderen die sogenannte "Roll-tube-Technik" angewendet. Agar-Agar enthaltene Medium wurde gleichmäßig über die Innenoberfläche eines besonders dicken Kulturröhrchens verteilt. Ein Inokulum der methanogenen Mischkultur wurde durch Drehen des Röhrchens ebenfalls gleichmäßig auf die Agar-Oberfläche aufgetragen. Die gewachsenen Kolonien konnten mit einer Impfnadel gepickt werden (HUNGATE 1969, WOLFE 1971). Eine weitere Technik zur Isolierung von Methanbildnern stellte die Verwendung eines anaeroben Zeltens mit Vakuumschleusen und Schutzgas dar, in dem konventionelle Petrischalen platziert werden können (EDWARDS & McBRIDE 1975). Die Kultivierung in Petrischalen zeigte Vorteile gegenüber der Roll-Tube-Technik mit Hinblick auf einen einfachen Zugang zu den Kolonien zum Picken. Aber für die Petrischalen-Technik wird ein kostenintensives anaerobes Kabinett oder Zelt benötigt, um die notwendigen anoxischen Bedingungen zu schaffen. Daher wurde eine weitere Isolationstechnik entwickelt, die man mit Agar-Glasflaschen-Technik umschreiben kann. Sie ermöglicht ebenfalls ein Wachstum von Methanbildnern auf Festmedien. Die Technik ermöglicht ein einfaches Hinzufügen und Ablassen der Gasatmosphäre. Grundkomponenten dieser Anaeroben-Technik sind bereits in einigen Publikationen vorgeschlagen worden (UFFEN & WOLFE 1970, HERMANN *et al.* 1986, OLSON 1992).

Für die einfache Erfassung von methanogenen Kolonien konnte die Autofluoreszenz des Coenzym  $F_{420}$  durch UV-Licht verwendet werden. Heutzutage ist die Erzeugung der gewünschten Wellenlänge von 420 nm mit einer LED-Taschenlampe möglich. Blaugrün fluoreszierende Kolonien sind zwar nicht immer frei von Begleitorganismen, aber alle leuchtenden Kolonien sind zumindest Methanbildner (EDWARDS & McBRIDE 1975, DODDEMA & VOGELS 1978).

### 4.3 Methodenentwicklung zur Kultivierung methanogener Archaeen aus Biogasanlagen

#### 4.3.1 Verwendete Kulturgefäße

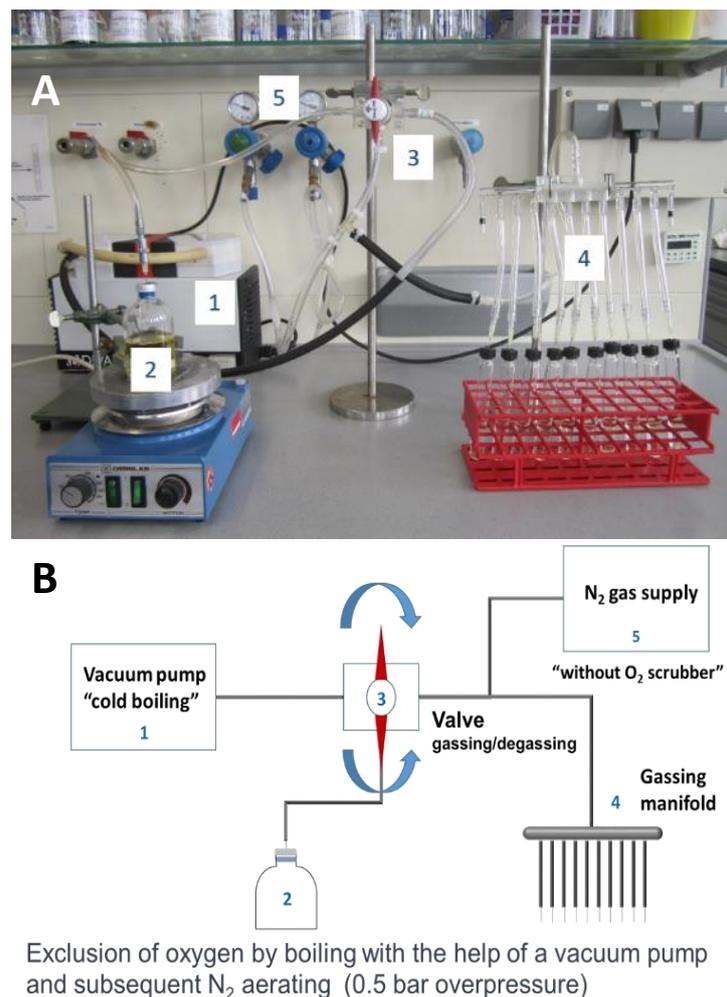
Zur Kultivierung unter Ausschluss von Sauerstoff wurden passende Kulturflaschen wie Hungate-Röhrchen (HUNGATE 1950) oder Balch-Röhrchen verwendet (BALCH & WOLFE 1976) (Bellco, USA bzw. Dunn Labortechnik GmbH, Asbach). Die Röhrchen wurden jeweils mit 4,5 mL sterilem, sauerstofffreiem Medium befüllt und mit 0,5 mL Inokulum angeimpft. Das flüssige Medium füllte somit nur 25 – 30% des Volumens der Kulturgefäße aus, da ein ausreichender Gas-Raum für die Gas-Fütterung bestehen sollte. Anschließend wurden sie bei der entsprechenden Temperatur, meist ähnlich der Temperatur der Biogasanlage, im Brutschrank kultiviert. Bei der Verwendung dieser Gefäße sind gasundurchlässige Butylgummi-Stopfen eine wichtige Voraussetzung (HUNGATE 1969). Weitere Glasgefäße für die anaerobe Kultivierung sowohl von hydrogenotrophen Methanbildnern mit einem Überdruck von 2 – 3 bar als auch von acetotrophen Methanbildnern mit Methanol und/oder Acetat als mögliche Substrate sind in **Abbildung 12** dargestellt.



**Abbildung 12:** Verwendete Glasgefäße für die anaerobe Kultivierung und zur Herstellung von Medien. A: Serumflasche (10 mL); B: Serumflasche (20 mL, braun); C: Serumflasche (100 mL); D: Serumflasche (200 mL); E: Röhrchen nach Balch (Firma Dunn); F: Röhrchen modifiziert nach Hungate (Firma Bellco).

### 4.3.2 Anaerobisierung von Kulturmedien

Der Ausschluss von Sauerstoff und die Prüfung der Gasdichtheit waren bei jedem Schritt der Kultivierung notwendig. Dazu wurde die vereinfachte Anaerobisierungstechnik etabliert und verbessert (basierend auf den langjährigen Labortechniken an der HAW). Alle Medien wurden mit einem leichten Überdruck von N<sub>2</sub> (0,25 bis 0,5 bar) aufbewahrt, um die Einführung von Luft in die Medienflasche zu vermeiden. Zum Ausschluss bzw. Entfernen von Sauerstoff (Anaerobisierung) aus den Kulturgefäßen wurde das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Divac, Nr. 13512Z99, Leybold AG, Köln) „kalt gekocht“ und mit reinem nicht nachgereinigtem Stickstoff (Qualität 5.0, 99,995%) durchgespült. Die Methode wurde an Stelle des sehr zeitaufwendigen Kochens mit Hitze bzw. dem Einsatz eines Sauerstoffabsorbers aus Kupfer eingesetzt (sogenannte Hungate-Technik, HUNGATE 1969). Durch Drehung eines Drei-Wege-Ventils wurde die Begasung bzw. Entgasung durchgeführt (**Abbildung 13**, Nr. 3). Diese Technik wurde ursprünglich im Labor von Prof. Dr. R. Thauer zur Anaerobisierung von Photometer-Glasküvetten mit Stopfen unter Schutzgas angewendet (THAUER *et al.* 1975).



**Abbildung 13 A und 13 B:** Prinzipielles Schema für die Anaerobisierung. A (oben): Sauerstoffentfernung aus dem Medium (2) oder den Kulturröhrchen (4) erfolgte durch Wiederholung der Begasung (reines N<sub>2</sub>) und Entgasung mit einer Vakuumpumpe (1). B (unten): Schema der Apparatur.

Aufgrund der bisher verwendeten, relativ dünnen Glas-Konstruktion des Gasverteilers (**Abbildung 14**, Nr. 4) war ein Druckaufbau bzw. die Erreichung des Vakuumzustands in den Kulturröhrchen nicht ausreichend möglich. Deshalb wurde ein metallischer Gasverteiler mit 12 Luer-Lock-Anschlüssen inklusiv innenliegenden Gummiringen an der HAW entwickelt und gebaut (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14:** Weiterentwicklung des Gas-Verteilers mit druckgesicherter Technik zur gleichzeitigen Anaerobisierung von 12 Kulturröhrchen durch Evakuierung mit Hilfe einer Vakuumpumpe und Begasung mit reinem Stickstoff.

#### 4.3.3 Allgemeine Anmerkungen zur Kultivierung

Für eine erfolgreiche Kultivierung möglicher unbekannter Archaeen aus Biogasanlagen sollte ein Kulturmedium mit optimaler Zusammensetzung vorhanden sein. Es wurden insgesamt fünf verschiedene DSMZ-Medienrezepturen (DSMZ Nr. 141, 287, 318, 332 und 334) mittels vier physiologisch unterschiedlichen, für BGAs relevanten Referenzstämmen getestet (DSMZ 1498 *Methanoculleus marisnigri*, DSMZ 3915 *Methanoculleus thermophilus*, DSMZ 3267 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und DSMZ 2133 *Methanothermobacter marburgensis*). Schließlich wurden die vorhandenen Rezepte so verändert und optimiert, dass ein „HAW-Medium“ geschaffen wurde, mit dem sowohl hydrogenotrophe als auch (leicht verändert) acetotrophe Methanbildner unter thermophilen (53°C) als auch mesophilen (37°C) Bedingungen kultiviert werden können.

#### 4.3.4 Eigenschaften des HAW-Mediums

Bei der Herstellung des Mediums und während der Kultivierung ist die pH-Kontrolle unumgänglich. Für die Anreicherung der differenzierten Methanbildner wurden zwei verschiedene pH-Werte verwendet: pH 6,4 ± 0,1 für die hydrogenotrophen Methanbildner und 7,0 ± 0,1 für die acetogenotrophen methanbildenden Archaeen. Später stellte sich heraus, dass das pH-neutrale Medium für beide methanogene Gruppen vorzuziehen ist. Natriumsulfid wurde im Allgemeinen als Reduktionsmittel und Schwefel-Quelle verwen-

det. Der pH-Wert der Natriumsulfid-Stammlösung ist 9.0. Daher musste nach Zugabe von Natriumsulfid die pH-Änderung berücksichtigt werden. Es war schwierig, die richtige Konzentration von  $\text{Na}_2\text{S}/\text{H}_2\text{S}$  zu erhalten. Die Löslichkeit von Natriumsulfid ist abhängig vom pH-Wert und der Temperatur. Bei einem niedrigeren pH-Wert und erhöhter Temperatur (z. B. bei der thermophilen Kultivierung) wird die Löslichkeit von Natriumsulfid stark verringert und dadurch die Verfügbarkeit der Schwefel-Quelle für Methanbildner reduziert. Der Schwefelwasserstoff wurde außerdem mit Sauerstoff schnell oxidiert. Bei der Anaerobisierung oder Fütterung konnte der Schwefelwasserstoff entweichen. Daher wurde während der Kultivierung einfacherweise durch Riechen regelmäßig kontrolliert, ob noch Schwefelwasserstoff vorhanden war.

Ein weiterer wichtiger Punkt war das Redoxpotential, das für die Anzucht der Methanbildner unter einen Wert von -350 mV gehalten werden musste. Ein Redoxpotential über dieser genannten Grenze verursachte einen Farbumschlag des verwendeten Indikators Resazurin von farblos nach rosa. Zum Erhalt des Potentials wurden in dieser Studie Eisen-Cystein, Natriumsulfid und Titan-Citrat als Reduktionsmittel verwendet. Titan-Citrat war das stärkste Reduktionsmittel, während Eisen-Cystein das Schwächste war. Ein Vorteil des Eisen-Cysteins war seine geringe Toxizität (WACHENHEIM & HESPELL 1984, HILTON & OLESZKIEWICZ 1988).

Eine besondere Eigenschaft des HAW-Mediums war die relativ hohe Konzentration (4,8 g/L) an Kaliumchlorid (KCl) (**Tabelle 4**). Das entspricht einer Menge an Kalium von 2,5 g bzw. einer Konzentration von 64 mM. Paul Scherer und seine Kollegen fanden 1983 heraus, dass der elementare Kalium-Gehalt in 10 verschiedenen Methanbildnern zwischen 0,13% und 5% (1,3 bis 50 g/L) lag, das entspricht 33 mM bis 128 mM Kalium (SCHERER *et al.* 1983). Landwirtschaftliche Biogasanlagen mit den eingesetzten Substraten von Gülle und Energiepflanzen zeigten einen ebenfalls hohen Anteil an Kalium von 3 g/L (laborinterne Analysen). Gemäß einer Studie gab es eine positive Korrelation zwischen der syntrophischen Acetat-Oxidation mit anschließender Methanogenese und der Konzentration von Ammonium und dem Kalium-Gehalt sowie dem Vorkommen von *Methanoculleus* (SCHNÜRER *et al.* 1999). Jedoch können auch zu hohe Kaliumkonzentrationen (3 - 6 g/L, 77 mM bis 154 mM) die anaerobe Vergärung hemmen (CHEN & CHENG 2007). Vor diesem Hintergrund wurde eine angepasste Konzentration an Kalium im Medium von 64 mM gewählt.

**Tabelle 4:** Vergleich des optimierten HAW-Mediums mit fünf DSMZ-Medien

Makroelemente	HAW	DSMZ	DSMZ	DSMZ	DSMZ	DSMZ
		141	119	287	318	332
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Polyphosphat(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>x</sub>	0.025					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			0.5	0.3	0.3	
KCl	4.8	0.34				
NH <sub>4</sub> Cl	1	0.25	0.4	2.7	1	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				0.3		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O		0.2		0.3		0.4
NaCl	1.75	18	0.4	0.61	0.6	
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1	3			0.1	0.1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O		3.45	0.4	0.13		
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.073	0.14	0.05	0.14	0.08	
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O			0.002			
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *7H <sub>2</sub> O		0.002				
Fe(II)Citrat	0.0024					
Natriumformiat	0.68		2			5
Natriumacetat	0.41	1	1	2.5		1
Hefeextrakt	5 <sup>a</sup>	2	1		0.5	1
Trypticase	5 <sup>a</sup>	2			0.5	1
Resazurin	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Vitamin-Lösung	10 mL	10 mL <sup>b</sup>		10 mL <sup>b</sup>	10 mL <sup>b</sup>	10 mL <sup>b</sup>
Fettsäuren-Lösung			20 mL			
NaHCO <sub>3</sub>	0.42	5	4	5		
KHCO <sub>3</sub>					2	
Methanol					5 mL	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>						1.5
Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	0.24	0.5	0.5	0.3	0.3	0.2
Titancitrat	38 mg Ti, 4 mg Citrate					
Imidazol	0.68					
Spurenelement-Lsg.	10 mL	10 mL <sup>b</sup>	1 mL <sup>c</sup>	10 mL <sup>b</sup>	10 mL <sup>d</sup>	10 mL <sup>b</sup>
Cystein-HCl*H <sub>2</sub> O	0.15	0.5	0.5	0.3	0.3	0.5
Gärflüssigkeit			50 mL			
pH-Wert Einstellung	1 M HCl, pH 6,4 bzw. 7,0; s. Text	10 M KOH		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Gasphase	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , 2 bar	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , 2 bar	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , 1.2 bar	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , 1.2 bar	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , 2 bar

<sup>a)</sup> Für Reinkulturen und Festmedien; <sup>b)</sup> DSMZ Medium 141; <sup>c)</sup> DSMZ Medium 320; <sup>d)</sup> DSMZ 318

Ein Problem waren die Ausfällungen im Medium. Daher wurde die Menge an Phosphat und Carbonat optimiert. Die  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration wurde daher im Vergleich zu den anderen DSMZ-Medien auf 5 mM reduziert (**Tabelle 4**) und anstelle des Phosphatpuffers wurde ein mit 10 mM gering konzentrierter Imidazol-Puffer eingesetzt (SCHERER 1989). Phosphat, Sulfid und Carbonat sind jedoch essentielle Nährstoffe. Daher wurde statt Kaliumphosphat Polyphosphat als neue Phosphatquelle für Methanbildner im HAW-Medium verwendet. Danach erhielt man ein klares Medium. Bei einer zu hohen Dosierung von  $\text{Na}_2\text{S}$  und Sauerstoffspuren konnte aber schwarzes Sulfid nachträglich beim Stehenlassen unter Raumtemperatur ausfallen. Daher wurde zusätzlich das Reduktionsmittel Titancitrat verwendet. Hefeextrakt oder Trypton aus Casein (Difco bzw. Trypticase) waren für die Kultivierung von einigen methylotrophen Methanbildnern (z. B. *Methanosarcina barkeri*) notwendig. Sulfat wurde absichtlich im HAW-Medium aufgrund der möglichen Anreicherung von Sulfat-reduzierenden Bakterien vermieden (LOVLEY & KLUG 1983).

**Tabelle 5:** Vergleich der Stammlösungen (1:100) an Spurenelementen des HAW-Mediums mit anderen Anaerobiermedien

Spurenelemente	HAW [mg / L]	DSMZ 141 [mg / L]	DSMZ 318 [mg / L]	DSMZ 320 [mg / L]
HCl (25%; 7.7 M)				10 mL
$(\text{NaPO}_3)_x$	10			
Nitrilotriessigsäure		1500	12800	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		3000		
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		500		
NaCl		1000	1000	
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$				1500
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1350	
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$				
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		100		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		100	100	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		180		
$\text{ZnCl}_2$	6.81		100	70
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.98		100	100
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.62	10	10	6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		10		
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.7		25	2
$\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3	10		
$\text{K Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$		20		
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		180		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	11.89		24	190
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	11.88	30	120	24
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.63	0.3	26	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.41		24	36

Bei den Spurenelementen des HAW-Mediums wurde Polyphosphat statt Nitrilotriessigsäure als Komplexbildner verwendet, gleichzeitig aber auch als Phosphatersatz. Die Menge von Zink (Zn), Mangan (Mn), Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) sowie Cobalt (Co), Nickel (Ni) und Wolfram (W) wurde nach den Versuchen in unserem Labor reduziert, da die Elemente mit Sulfid zur Ausfällung neigten (**Tabelle 5**).

#### 4.3.5 Zusatzmittel zur Stimulation des Wachstums von methanogenen Kulturen

Gelegentlich war es notwendig, das Wachstum der Methanbildner durch Zusatzmittel zu erhöhen. Hierzu wurden Hefeextrakt oder Trypton (Difco) bzw. Trypticase eingesetzt (MILLER & WOLIN 1974, FERGUSON & MAH 1983). Der Einsatz von Zusatzmitteln geschah mit dem Risiko eines Wachstums von ungewollten Begleitorganismen. Zum Erwecken von stagnierten Methanbildnern war die Verwendung von anaerobisiertem und sauberen Trypton notwendig. Nach ausreichendem Wachstum sollten die möglicherweise mitgewachsenen Bakterien durch Überimpfungen mit Antibiotika beseitigt werden. Hefeextrakt und Trypton (0,1% w/w) wurden generell in Monokulturen oder für feste Medien zugegeben. Eine weitere Option für die Förderung des Wachstums war, Schlammflüssigkeit oder methanogene Fermenterflüssigkeit dem Medium zuzusetzen (STANTSCHEFF *et al.* 2014). Die Sterilisation einer solchen Gärflüssigkeit gestaltete sich sehr kompliziert. Nach einer Zentrifugationsdauer von etwa vier Stunden bei 10.000 x g und nach 2 bis 3 folgenden Filtrationsschritten konnte ein relativ klares Fermentermedium erreicht werden.

#### 4.3.6 Sterilisation des Kulturmediums

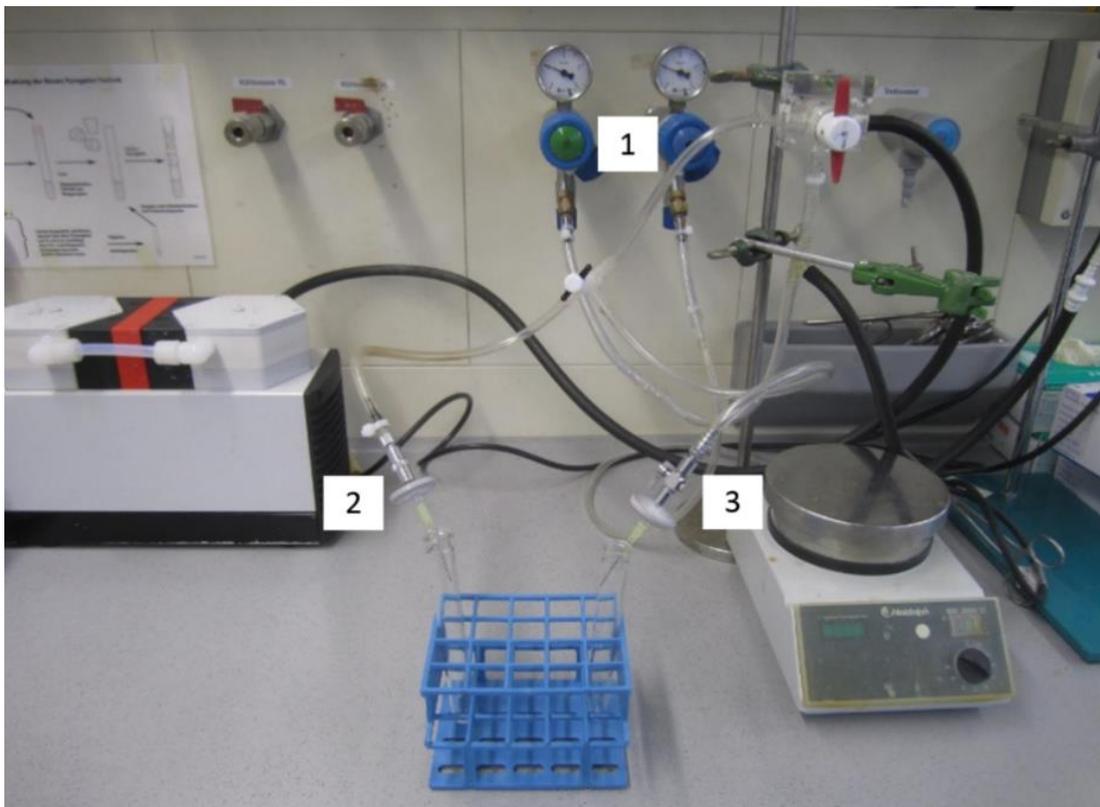
Ein weiteres Problem war die Sterilisation des Mediums. Einige Komponenten waren Hitze-instabil, wie Vitamine und Cystein. Nach dem Autoklavieren konnte häufig eine Fällung von Phosphat oder Carbonat mit den Spurenelementen beobachtet werden. Die ausgefallenen Spurenelemente wären dann biologisch nicht mehr verfügbar (schwer löslich). Für diesen Fall wurde die Membranfiltration mit einer Vakuumpumpe als Hauptsterilisationsverfahren verwendet. Wie unter 4.3.4 bereits erwähnt, wurde vermutlich zum ersten Mal für eine anaerobe Kultur (bisher keine Referenz) Polyphosphat statt Phosphat eingesetzt, um Ausfällungen vorzubeugen.

#### 4.3.7 Mediumherstellung im 200 mL-Maßstab

Zur Herstellung des HAW-Mediums wurde dieses standardmäßig im 200 mL Maßstab gemäß folgender Schritte angesetzt. Zu 186 mL Makroelemente-Lösung in einem 250 mL-Becherglas (detaillierte chemische Komponenten sind im Anhang beschrieben) wurden 2 mL Imidazol (1 M), 2 mL Acetat-Lösung (0,5 M), 2 ml Formiat-Lösung (1 M), 2 mL Spurenelementlösung, 2 mL Vitaminlösung, 400 µL Resazurin (4 mM), 100 µL

Polyphosphat (2 M) und 1 mL einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 M) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (1 M) auf pH 7 eingestellt. Danach wurde das noch nicht ganz vollständige Medium durch Filtration (0,22 µm Porengröße) mit einer Vakuumpumpe sterilisiert. Die Lösung wurde in eine sterile 200 mL Serumflasche unter sterilen Bedingungen übertragen. Die Serumflasche wurde mit einem Butylgummistopfen einschließlich Aluminiumkappe verschlossen. Für die Anaerobisierung, wie unter 4.3.2 beschrieben, wurden Sterilfilter für Gase verwendet. Währenddessen fand eine intensive Durchmischung mit einem Magnetrührer statt. In die befüllte und nun sauerstofffreie Serumflasche wurden nacheinander folgende anaerobisierte Lösungen zugeetzt: 400 µL Cystein-Lösung (212,5 mM), 800 µL Natriumsulfid-Lösung (250 mM), 200 µL Titan-Citratlösung (83,9 mM). Der pH wurde mit Salzsäure auf etwa 6,4 oder 7,0 eingestellt. Ein Überdruck von circa 0,25 bar in der 200 mL-Serumflasche wurde mit reinem Stickstoff erzeugt, um diese unter anaeroben Bedingungen zu lagern und die Einführung von Luft in dem Kulturgefäße zu verhindern.

**Abbildung 15** zeigt das verwendete Begasungssystem mit reinem Stickstoff (99,995%) für die anaerobe Übertragung des Inokulums und des Mediums sowie für die Durchführung von sogenannten Verdünnungsreihen unter Schutzgas.

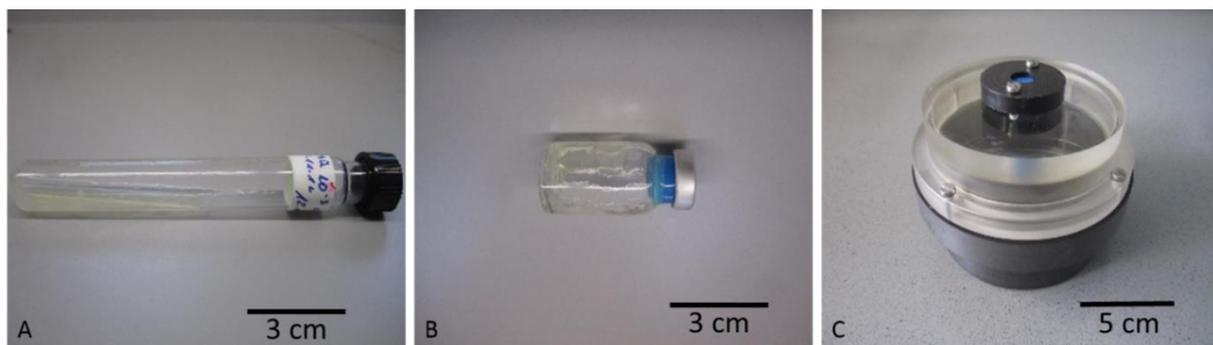


**Abbildung 15:** Ausrüstung für die Verdünnungsreihe unter Stickstoff-Spülung. 1) Stickstoff-Gasleitung, 2) und 3) zwei Schläuche mit Sterilfiltern und den Kanülen für die beiden Kulturröhrchen.

#### 4.3.8 Drei Kultivierungsmethoden für Festmedien

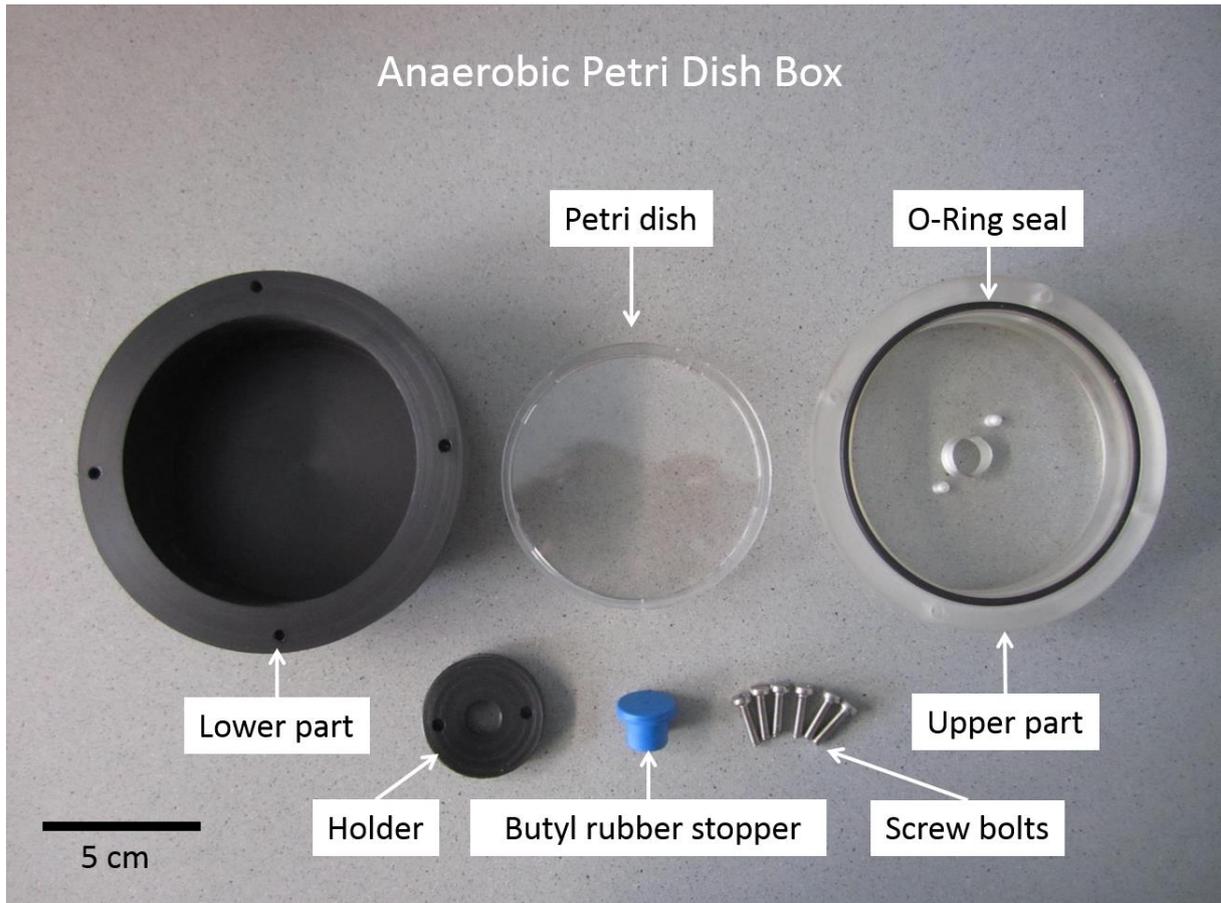
Ein wichtiges Versuchsziel der HAW Hamburg war die Ermöglichung der Isolierung von Methanbildnern ohne Hilfe einer anaeroben Kammer, einer sogenannten „Glove-Box“, die kostenaufwendig ist, relativ kompliziert in der Handhabung ist und einen großen Flächenbedarf benötigt (WOLFE 2011). Zur Entwicklung einer alternativen einfachen aber dennoch effektiven Kultivierungsmethode gab es vier Voraussetzungen, die zu beachten waren. Erstens, eine Begasung musste möglich sein. Das bedeutete, dass das Gefäß auch bei einem Überdruck von bis zu zwei Bar mit Wasserstoff gasundurchlässig sein musste. Zweitens sollte die Kontaktfläche zwischen Gas und Festmedium möglichst groß sein, um eine ausreichende Diffusion des Gases in das Medium zu gewährleisten. Drittens, die Detektion der methanogenen Kolonien sollte leicht durchzuführen zu sein. Zuletzt musste das sogenannte Kolonien-Picken möglich sein.

Zur Isolierung von Methanbildnern wurden drei unterschiedliche Methoden unter Verwendung von Festmedien durchgeführt. Die dafür gewählten Gefäße sind in **Abbildung 16** beschrieben.



**Abbildung 16:** Drei unterschiedliche Gefäßtypen für die verschiedenen Kultivierungsmethoden auf Festmedien. A) Hungate-Röhrchen für die Anzucht auf bzw. in Schrägagar, B) 10 mL Serumflasche für die Roll-Tube-Technik und C) die in dieser Studie entwickelte, druckgesicherte anaerobe Petrischalen-Box (KIM 2015).

In **Abbildung 17** werden die einzelnen Bestandteile des neu entwickelten Gefäßes für die Kultivierung methanbildender Archaeen auf Festmedien gezeigt.



**Abbildung 17:** Entwicklung einer Kultivierungsmethode mit Festmedium für hydrogenotrophen Methanbildner. Dieses Kultivierungsgefäß wurde anaerobe Petrischalen-Box genannt.

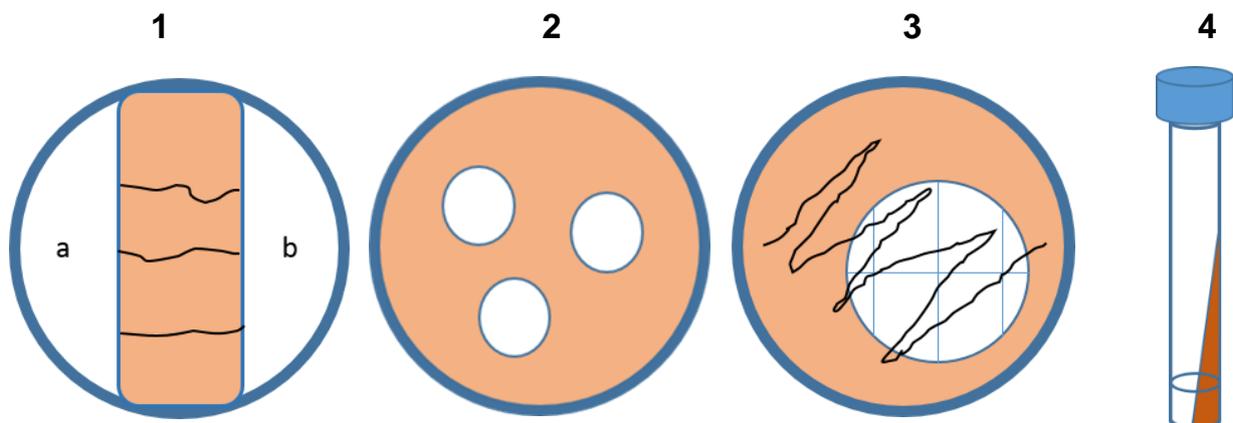
Während der Studie wurde eine Gasdruck-gesicherte anaerobe Petrischalen-Box (**Abbildung 17**) entwickelt (KIM 2015). Dies ist eine Box für eine einzelne Petrischale. Regelmäßige Gas-Zufuhr war bis zu 2 bar Überdruck möglich. Nach der Begasung war das verschlossene Gefäß bis zu 3 Monaten gasundurchlässig, erkennbar am farblosen Resazurin. Die anaerobe Petrischalen-Box besteht aus einem Ober- und einem Unterteil sowie einem Butylgummistopfen, Schrauben zum Zusammensetzen und einer zu befüllenden Petrischale. Als Material wurde Polyoxymethylen (POM) für den unteren Teil und Polymethylmethacrylat (PMMA) für den oberen Teil verwendet. Die Box ist bis zu 100°C thermostabil. Zur Sterilisation wurden die Petrischalen-Boxen mit UV-Licht und Desinfektionsmittel behandelt. Der obere Teil ist transparent, damit die gebildeten Kolonien ohne Öffnen des oberen Teils detektiert werden können. Der Zugang zu einer Kolonie war nach Öffnen des Deckels problemlos. Allerdings konnte ein kurzzeitiger Sauerstoffkontakt nicht ausgeschlossen werden. Durch die Redoxpufferung blieb der Resazurinindikator aber farblos. Nach Beendigung der Kultivierung konnte die verwendete Petrischale ausgetauscht und die anaerobe Petrischalen-Box leicht gereinigt werden. Die Herstellung der Festmedien in den drei unterschiedlichen Gefäßtypen für die jeweilige Kultivierungsmethode ist in **Tabelle 6** beschrieben.

**Tabelle 6:** Herstellung der verwendeten Festmedien

<b>Schrägagarmedien</b> (100 mL) (BAST 2010)	<b>Roll-Tube-Technik</b> (20 mL) (HUNGATE 1969)	<b>Anaeroben Petrischa- len-Box</b> (20 mL) (Eigen- entwicklung KIM 2015)
<p>93 mL Makroelement-Lösung wurde in einem 200 mL-Becherglas vorgelegt. 1 mL Imidazol-Lösung, 1 mL Acetat-Lösung und 1 mL Formiat-Lösung wurden hinzu gegeben. Weiter wurden dem Medium Agar (1,8%, 1,8 g), Hefeextrakt (0,5%, 0,5 g), Trypton (0,5%, 0,5 g) und 200 µL Resazurin beigefügt. Nach der Anaerobisierung und Autoklavierung dieser Mixlösung wurde diese in einem 60°C warmem Wasserbad gelagert.</p> <p>4,8 mL der obigen Lösung wurde in 10 ml sterile Röhrchen (insgesamt 12 Röhrchen) bei 60°C überführt. Als nächstes wurden 200 µL Cystein-, 400 µL Natriumsulfid-, 1 mL Vitamin-, 1 mL Spurenelement-, 500 µL Polyphosphat-, und 100 µL Titan-Citrat-Lösung in ein anderes 10 mL anaerobes steriles Röhrchen gegeben. Aus dieser Lösung wurden Aliquot zu je 200 µL in die mit 4,8 mL Medium befüllten Röhrchen gegeben. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ein Überdruck von etwa 2 bar eingestellt. Die Röhrchen wurden bis zur Aushärtung stark geneigt platziert.</p>	<p>10 mL HAW Medium wurde in eine 25 mL Schott-Flasche gegeben. Agar (1,5%, 0,15 g), Gelrite (0,5%, 0,05 g), Hefeextrakt (0,5%, 0,05 g) und Trypton (0,5%, 0,05 g) wurden dem Medium zugesetzt. Diese Lösung wurde autoklaviert und in einem 60°C warmen Wasserbad kurzfristig gelagert.</p> <p>10% Inokulum, welches ebenfalls auf 60°C erwärmt worden war, wurden zu dem Medium gegeben und unter Beibehaltung der Temperatur gemischt. Etwa 3 mL des beimpften Mediums wurden in eine sterile 10 mL Serumflasche gegossen und mit einem Butylgummi-stopfen verschlossen. Die Serumflasche wurde dann mit der Hand gedreht (10-15 Sekunden), bis das Medium auf der Innenwand der Serumflasche fest geworden war. Nur auf die Innenwand der Serumflasche wurde das Festmedium beschichtet und der Innenraum der Serumflasche blieb leer, da hier ein großer Gasraum bestehen bleiben sollte. Die Serumflasche wurde anschließend anaerobisiert, mit Reduktionsmittel versetzt und mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ein Überdruck von etwa 2 bar eingestellt.</p>	<p>20 mL HAW Medium wurde in eine 25 mL Schottflasche gegeben. Agar (1,5%, 0,15 g), Trypton (0,5%, 0,05 g) und Hefeextrakt (0,5%, 0,05 g) wurden dem Medium zugesetzt. Die Lösung wurde autoklaviert und in einem 60°C warmen Wasserbad kurzfristig gelagert.</p> <p>Unter sterilen Bedingungen wurden 200 µL Impfkultur und folgende Lösungen zügig dem Medium zugegeben: 50 µL Natriumsulfid (1 mM), 50 µL Cystein, 50 µL Titan-Citrat, 200 µL Vitamin und 200 µL Spurenelemente. Das angeimpfte Medium wurde in Petrischalen gegossen und in die vorbereiteten anaeroben Petrischalen-Boxen platziert. Diese wurden dann geschlossen und unter Zugabe von Reduktionsmittel anaerobisiert. Mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> wurde ein Überdruck von etwa 2 bar eingestellt.</p>

Trotz der verwendeten entwickelten Petrischalen-Boxen gestaltete sich die Kultivierung von methanbildenden Archaeen auf Festmedien als wesentlich schwieriger als die Anzucht in Flüssigmedien. Ein möglicher Grund war die Schwierigkeit der Anaerobisierung (Sauerstoffentfernung) des Festmediums bei der Medienherstellung und der Kultivierung. Laut Robert Scott und seinen Kollegen inhibiert eine gelöste Sauerstoffkonzentration von unter 30 nM (1 ppm) bereits die Methanbildner (SCOTT *et al.* 1983). Obwohl der Sauerstoff durch Reduktionsmittel reduziert wurde, verblieben vermutlich Spuren in den anaeroben Gefäßen, im Gegensatz zur vollständigen Reduktion von Sauerstoff in einem flüssigen Medium (maximale Löslichkeit des Sauerstoffs bei 25°C beträgt 8 mg/L bzw. 0,25 mM). 1 mM Natriumsulfid (Na<sub>2</sub>S) kann theoretisch den gesamten gelösten

Sauerstoff in Medien reduzieren, erwies sich allerdings bei pH 7,0 im Vergleich zu früheren Arbeiten des gleichen Labors als zu hoch (SCHERER & KNEIFEL 1983, Anzucht von *Methanosarcina* bei pH 6,3). Reiner Stickstoff (99,995%) wurde zur Anaerobisierung verwendet. Dennoch schien diese Qualitätsstufe nicht rein genug zu sein, da die möglichen 0,005% (50 ppm) an Luft mit etwa 10 nM an gelöstem Sauerstoff (bei unter 1 bar und bei 37°C nach dem Henry-Dalton-Gesetz) bereits ausreichend gewesen sein konnte, um die Methaner zu inhibieren. Daher wurden die anaerobisierten Petrischalen-Boxen mit einer Natriumsulfid-Lösung (1 mM) mit einer Einwirkzeit von ein bis zwei Tagen gespült. Erst nach diesem Waschschrift wechselte die Farbe des Mediums mit Resazurin von rosa zu farblos, was eine vollständige Reduktion des Sauerstoffs bedeutete. Gleichzeitig war aber eine pH-Wert-Korrektur notwendig, da Natriumsulfid den pH-Wert nachweislich erhöhte. Durch diese Vorgehensweise gelang jedoch nur vereinzelt eine Anzucht von methanbildenden Archaeen in den Petrischalen-Boxen. Aus diesem Grund wurden mehrere Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen zur Anzucht von methanbildenden Archaeen auf Festmedien unternommen. Vier dieser Ansätze sind in **Abbildung 18** dargestellt.



**Abbildung 18:** Schematischer Aufbau der Versuche zur Optimierung der Kultivierung von Methanbildnern auf Festmedien. 1) bis 3) Anaerobe Petrischalen-Box (Aufsicht), 4) Schrägagar (Seitenansicht). 1) Dünne Kanäle zwischen beimpften Flüssigmedium (a) und Flüssigmedium mit einem „Lockstoff“ (b, z. B. Acetat), 2) drei flüssige Substratreservoir im Festmedium, 3) Festmedium mit Flüssigmedium-getränktem Filterpapier, 4) Schrägagar mit zusätzlichem schwefelreichem Flüssigmedium.

Für den ersten Versuchsansatz (1) wurde ein Substratreservoir „a“ mit einer Mischkultur beimpft. Auf der anderen Seite des mit dünnen Kanälen durchzogenen Festmediums befand sich das Substratreservoir „b“, welches als Zusatz anlockende Nährstoffe zum Beispiel Acetat enthielt. Ein beweglicher Methanbildner sollte von Seite a zu Seite b aufgrund der anziehenden Nährstoffe wandern und sich in Seite b ansammeln. Die dünnen Kanäle (Breite etwa 10 µm) wurden manuell mit einer Kanüle eingekerbt.

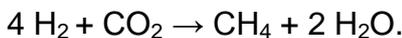
Beim zweiten Ansatz (2) wurden drei Löcher (Durchmesser ca. 1 cm) mit einer abgeschnittenen Kanüle ins Festmedium gestanzt und dort frisches, flüssiges Medium eingefüllt. Das leicht verfügbare Flüssigmedium sollte während der Kultivierung positiv das Wachstum der Methanbildner beeinflussen. Ein weiterer positiver Effekt durch das Flüssigmedium war die hohe Feuchtigkeit im Kulturgefäß.

In der dritten Variante (3) wurden 100 µL Inokulum auf dem Festmedium ausgestrichen. Darauf wurde ein Filterpapier (Porengröße 0,22 µm) gelegt. Das Filterpapier wurde mit etwa 3 mL Flüssigmedium getränkt. Nach dem Wachstum sollten unter dem Filter die Kolonien isoliert werden können.

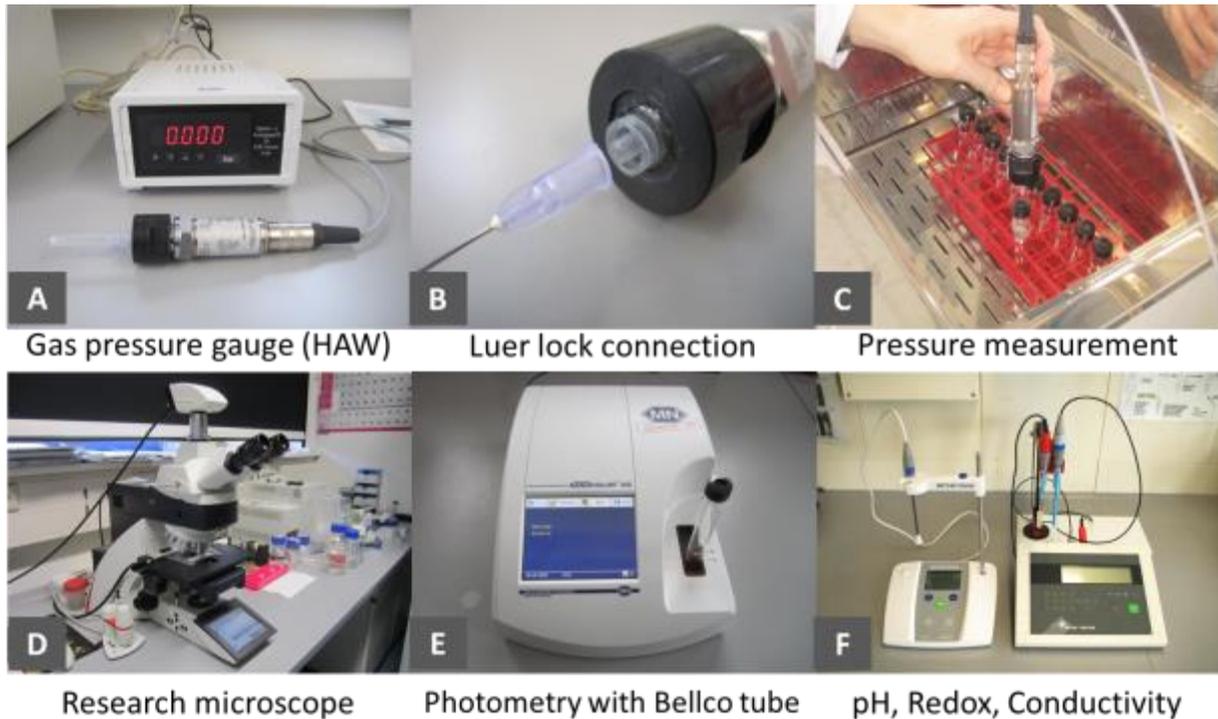
Im vierten Ansatz (4) wurde das inokulierte Röhrchen mit Schrägagar in eine vertikale Position gestellt. Auf den Boden wurde Flüssigmedium mit Natriumsulfid gegeben, um eine künstliche Sumpfatmosphäre zu erzeugen. Dieses war eine aussichtsreiche Idee, die jedoch zeitlich nicht mehr eingesetzt werden konnte. Verwendet wurde das Schrägagarmedium ohne „H<sub>2</sub>S-Sumpf“ (siehe **Tabelle 6**).

#### 4.3.9 Messtechniken zur Kontrolle des Wachstums von Methanbildnern

Das Wachstum der hydrogenotrophen Methanbildner konnte durch Messung des Drucks überwacht werden. Wenn Biomethan erzeugt wurde, verringerte sich der Gesamtdruck der Gasphase bei der Kultivierung nach der folgenden biochemischen Reaktion:



In **Abbildung 19** sind die verwendeten Geräte zur Überwachung des Wachstums der Kulturen dargestellt.



**Abbildung 19:** Darstellung der verwendeten Messgeräte zur Detektion und Überprüfung des Wachstums methanbildender Kulturen. A) Manometer, B) speziell angefertigtes vorderes Teil des Manometers, C) Druckmessung von mehreren Kulturen im Wasserbad, D) Fluoreszenz-Mikroskop, E) Spektralphotometer zur Messung des Wachstums durch Bestimmung der Trübung und F) regelmäßige Kontrolle des Mediums auf pH, Redoxpotential und Leitfähigkeit.

Die Methanbildungsaktivität wurde durch einen Gasdruckmesser mit einem speziellen Aufsatz gemessen (A; Special Instruments, Spezialanfertigung, Artikelnummer 1908 Nördlingen, Deutschland). Der Kopf des Manometers (B) wurde mit einem Luer-Lock-Verschluss konfiguriert, welcher leicht an einer handelsüblichen Luer-Lock-Kanüle verbunden werden konnte. Dieser Aufsatz wurde für das Labor hergestellt, um den Druck von anaeroben Röhren oder Serumflaschen mit einem nur minimalen Druckverlust messen zu können. Der durchschnittliche Druckverlust bei etwa 2 bar Überdruck in den Gefäßen betrug lediglich 50 mbar pro Messung. Die Gasdruckmessungen (C) wurden für die thermophilen Mikroorganismen in einem 60°C warmen Wasserbad aufgrund des veränderbaren Gasvolumens in Abhängigkeit von der Temperatur vorgenommen. Die Fluoreszenzmikroskopie (D, Leica 6000B) wurde verwendet, um das Vorhandensein und die Menge der Methanbildner zu bestimmen (DODDEMA & VOGELS 1978). Des Weiteren konnten mit Hilfe der Mikroskopie die Morphotypen erkannt und eventuell die Reinheit der Kultur bestätigt werden. Die Zellkonzentration konnte zusätzlich mit einem Spektralphotometer für die optische Dichte (E, Nanocolor® VIS, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemessen werden. Dieses war für Rundküvetten geeignet. Dieses wurde jedoch nur vereinzelt eingesetzt, da generell eine Grundtrübung der Nährmedien und insbesondere der Fermenterproben sowie in deren nächsten Überimpfungen bestand. Weiterhin wurden der pH-Wert, das Redoxpotential und die Leitfähigkeit (4 mm

Durchmesser der Elektroden für die Mikroreaktionsröhrchen, Eppendorf, Hamburg) für ein optimales Medium geprüft (F).

#### 4.3.10 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Beschickung von Kulturgefäßen

Für die gezielte Kultivierung von hydrogenotrophen Methanbildnern wurden die Kulturen mit jeweils 2 bar Wasserstoff (H<sub>2</sub>) und 0,5 bar Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) regelmäßig begast bzw. gefüttert. Der selbst produzierte Wasserstoff mit einem Elektrolysegerät (Chrompack, Middelburg, Niederlande) im Labor erwies sich als nicht rein genug für die Kultivierung der strikt anaeroben Methanbildner. Das Gasgemisch H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80% / 20% mit einer Reinheit von 99,995% wurde stattdessen mittels Gasdruckflasche (Air Liquide, Stelle, Deutschland) regelmäßig durch einen Filter (0,22 µm) unter exakter Druckkontrolle den Kulturröhrchen zugeführt. Als sehr selektives Referenzsubstrat für methylotrophe bzw. acetogenotrophe Methanbildner wurde neben dem im Medium schon vorhandenen Acetat auch Methanol als Kohlenstoff-Quelle verwendet. Diesen Kulturen wurde kein Wasserstoff zugesetzt.

#### 4.3.11 Optimierung der zum Wachstum anaerob nutzbaren Schwefelquelle

Ein großes Problem bei der anaeroben Kultivierung von Methanbildnern mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> unter hohem Überdruck war der Verlust des leicht flüchtigen Schwefelwasserstoffs aus zugefügtem Na<sub>2</sub>S. Für die Methanbildner bedeutet dies eventuell den Verlust der Schwefel-Quelle, beispielsweise vor allem bei thermophilen Temperaturen (um die 53°C) bei der Neubegasung. Schwefelwasserstoff ist daher ein limitierender Faktor. Bisher wurden viele Untersuchungen über die Art der Schwefel-Quelle durchgeführt (SCHERER & SAHM 1981, DANIELS *et al.* 1986, LIU *et al.* 2012). **Abbildung 20** zeigt eine Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen. Die Schwefel-Quelle ist im Wesentlichen notwendig für viele Eisen-Schwefel Proteine, wie zum Beispiel der Methyl-Coenzym-M-Reduktase, die den letzten Schritt der Methanbildung zusammen mit dem Thiol-Coenzym B katalysiert:

$\text{Me-S-CoM} + \text{CoB-SH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CoB-S-S-CoM}$ ,  $\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ mol}^{-1}$  (DEPPENMEIER *et al.* 1996).

Die zumeist benutzte Schwefel-Quelle ist Natriumsulfid, das gleichzeitig auch als Reduktionsmittel wirkt. Bei neutralem pH-Wert liegt etwa ein Drittel des Sulfids als gasförmiges Schwefelwasserstoff vor (LIU *et al.* 2012). Wenn die Kulturen unter thermophilen Bedingungen durchgeführt werden, wird die Löslichkeit des Schwefelwasserstoffs verringert. Die Löslichkeit ist etwa 2,7-mal weniger bei 60°C (pH 7) als bei 20°C (3,8 g H<sub>2</sub>S/kg H<sub>2</sub>O). Andererseits ist Schwefelwasserstoff für Bakterien und Methanbildner jenseits einer bestimmten Konzentration von mehr als 2 mM und je nach pH Wert toxisch (SCHERER & SAHM 1981, HILTON & OLESZKIEWICZ 1988). Daher war die Zugabe der geeigneten Menge an Schwefelwasserstoff in einem definierten mineralischen Medium



**Tabelle 7** zeigt einen Test mit verschiedenen Schwefelquellen. Als Inokulum wurde eine Reinkultur von *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133) verwendet. Die Kultivierung fand bei einer Temperatur von 53°C statt. Der Gasdruck wurde mit einem umgebauten Manometer (SI-Instruments, siehe 4.2.9) gemessen. Das Substrat H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80% / 20%) wurde mit bis zu zwei Bar Überdruck zugeführt.

**Tabelle 7:** Test für eine alternative Schwefelquelle mit *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133) im HAW-Medium unter thermophilen Bedingungen

Tag		Natriumsulfid		Tetrathionat		Thiosulfat		Thioessigsäure	
		a	b	a	b	a	b	a	b
0	Druck	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fütterung								
3	Druck	0.869	0.690	0.642	0.669	0.666	1.116	0.512	0.753
	Fütterung	√	√	√	√	√	√	√	√
5	Druck	1.132	<b>0.341</b>	0.921	0.898	0.947	<b>0.251</b>	0.823	0.988
	Fütterung		√				√		
9	Druck	1.034	0.437	0.916	0.887	0.879	0.598	0.801	0.963
	Fütterung		√				√		

Alle Kulturen wurden direkt nach dem Beimpfen mit 2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Überdruck versehen. Der Test zeigte, dass alle oben genannten Ansätze das Gasmisch sehr aktiv innerhalb von drei Tagen verbrauchten, was an der Reduktion des Druckes unter 1,1 bar (Tag 3) erkannt werden konnte. Nach der zweiten Gasfütterung zeigten weiterhin alle Kulturen eine hohe Aktivität, vor allem die Kulturen mit Natriumsulfid und Thiosulfat als Schwefel-Quellen. Der Gasdruck reduzierte sich bei diesen auf unter 0,3 bar (5 d). Nach einer dritten Gas-Zugabe zeigten die Kulturen mit Natriumsulfid (Ansatz b) und Thiosulfat (Ansatz b) immer noch eine höhere Aktivität als die anderen Versuchsansätze mit alternativen Schwefelquellen (Tag 9). Mit Bezug auf die Kultivierung von *Methanothermobacter marburgensis* unter thermophilen Bedingungen waren Na<sub>2</sub>S und Thiosulfat die beste Option für eine alternative Schwefelquelle.

Der zweite Test für eine alternative Schwefelquelle wurde unter mesophilen Bedingungen mit dem Inokulum vom *Methanoculleus bourgensis* (DSMZ 3045) geführt (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8:** Test für eine alternative Schwefelquelle mit *Methanoculleus bourgensis* (DSMZ 3045) im HAW-Medium unter mesophilen Bedingungen

Tag		Natriumsulfid		Tetrathionat		Thiosulfat		Thioessigsäure	
		a	b	a	B	a	b	a	b
0	Druck	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fütterung								
3	Druck	1.778	1.946	1.78	1.657	1.665	1.581	1.867	1.945
	Fütterung								
5	Druck	<b>0.782</b>	1.824	0.774	0.724	<b>0.464</b>	<b>0.684</b>	1.782	1.823
	Fütterung	√	√	√	√	√	√	√	√
9	Druck	0.934	2.215	0.948	0.681	0.806	1.169	2.246	2.017
	Fütterung	√		√	√	√			

Allen Kulturen wurde direkt nach der Inokulation  $H_2/CO_2$  bis zu 2 bar Überdruck zugeführt. Anders als beim ersten Test mit *Methanothermobacter marburgensis* zeigten alle Kulturen unabhängig von der Schwefelquelle eine geringere Aktivität innerhalb der ersten drei Tage. In fünf Tagen begannen alle Kulturen außer der Kultur mit Thioessigsäure, Wasserstoff zu verbrauchen. *M. bourgensis* wuchs im Allgemeinen langsamer als *M. marburgensis*. Nach der zweiten  $H_2/CO_2$ -Zugabe hatte Tetrathionat und Thiosulfat nebst Natriumsulfid die beste positive Auswirkung auf das Wachstum der Methanbildner. In Bezug auf die Kultivierung von *M. bourgensis* unter mesophilen Bedingungen beeinflussten Tetrathionat und Thiosulfat am stabilsten das Wachstum.

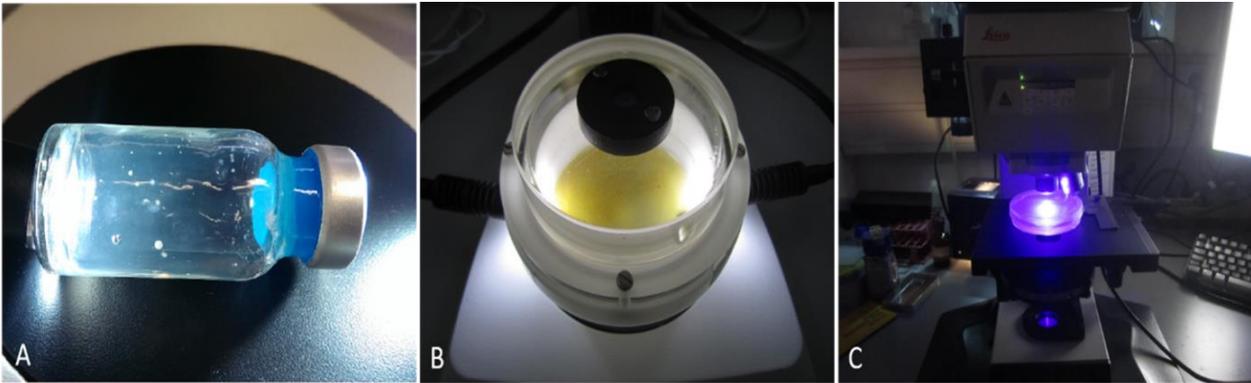
Basierend auf den beiden Tests wurde Thiosulfat als alternative Schwefelquelle ausgewählt. Es sollte bemerkt werden, dass alle Chemikalien sehr geruchsintensiv waren. Insbesondere Thioessigsäure war extrem übelriechend.

#### 4.3.13 Optimierung der Detektionsmethode und Identifizierung

Die auf Festmedium gewachsenen Kolonien wurden zuerst mikroskopisch analysiert und beurteilt, ob es sich um einen fluoreszierenden Methanbildner handelte. War dies der Fall, wurde die Kolonie in ein neues Medium überimpft, um weitere DNA-Analysen und Untersuchungen zu ermöglichen. Die Kolonien waren in der Regel klein (1 bis 2 mm) und schwer zu vereinzeln. Daher wurde eine Strategie des Ablaufs des Analysierens und Isolierens aufgestellt.

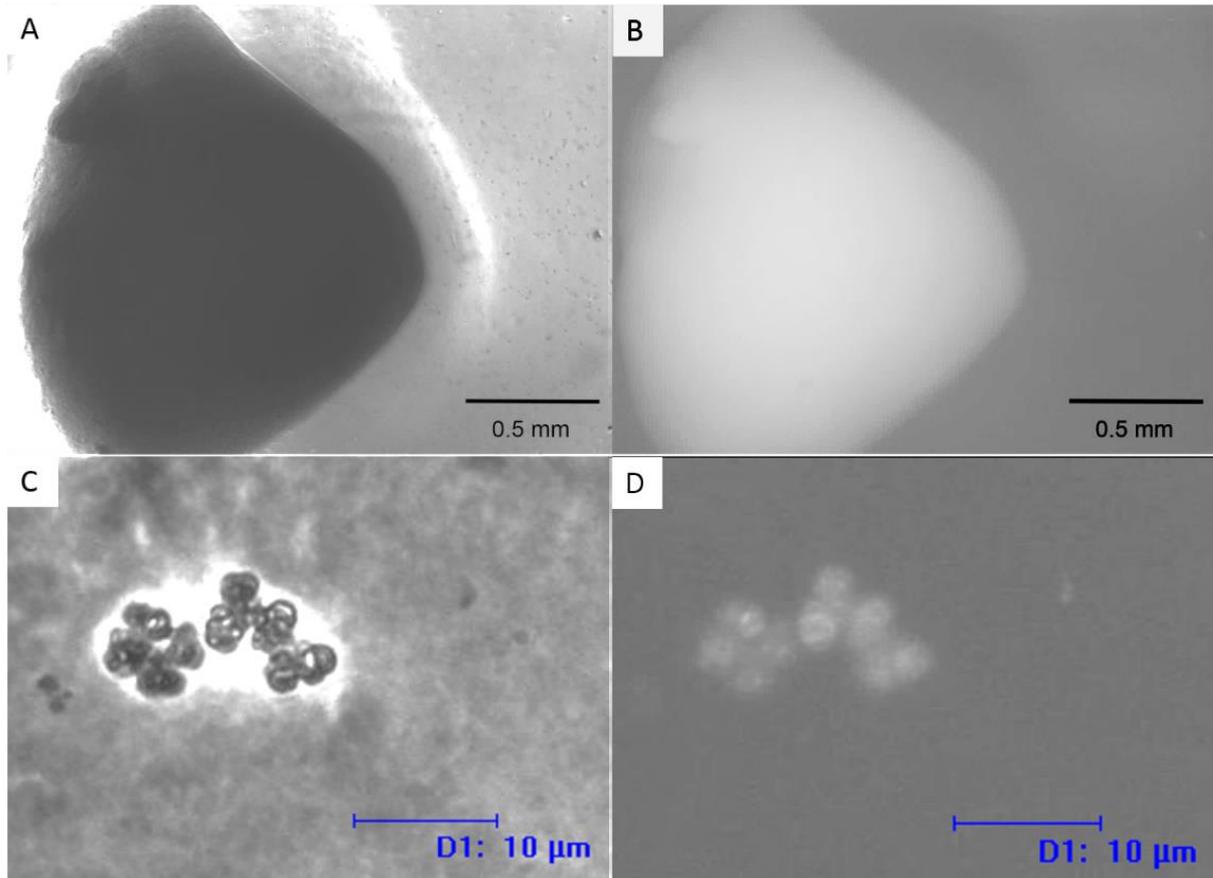
Die methanogenen Kolonien waren zwar durch das durchsichtige Glas oder Plexiglas sichtbar, sie konnten aber nicht ohne weiteres von Kolonien der Begleitorganismen unterschieden werden. Eine UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 400 nm wurde getestet, ob es möglich war, methanogene Kolonien aufgrund des autofluoreszierenden Koenzyms  $F_{420}$  detektieren zu können. Die Wanddicken der Serumflaschen bzw. die des Plexiglases waren aber zu dick. Die Petrischale selbst konnte man jedoch unter dem

passenden UV-Licht des Fluoreszenz-Mikroskops gut beobachten. Dazu wurde die Petrischale zügig aus der anaeroben Box entnommen und umgehend mit Parafilm umwickelt (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Detektion von methanogenen Kolonien. A) 10 mL Serumflasche unter hellem Licht, B) anaerobe Petrischalen-Box und daraus C) die entnommene Petrischale unter dem Fluoreszenzmikroskop mit violetter Lichtanregung.

Die gebildeten Kolonien wurden sowohl unter Phasenkontrast als auch unter dem Fluoreszenzmodus betrachtet. Wenn eine Kolonie bei beiden Modi sichtbar war, sollte diese Kolonie aus Methanogenen bestehen. Ein Beispiel zur mikroskopischen Identifikation zeigt **Abbildung 22**.



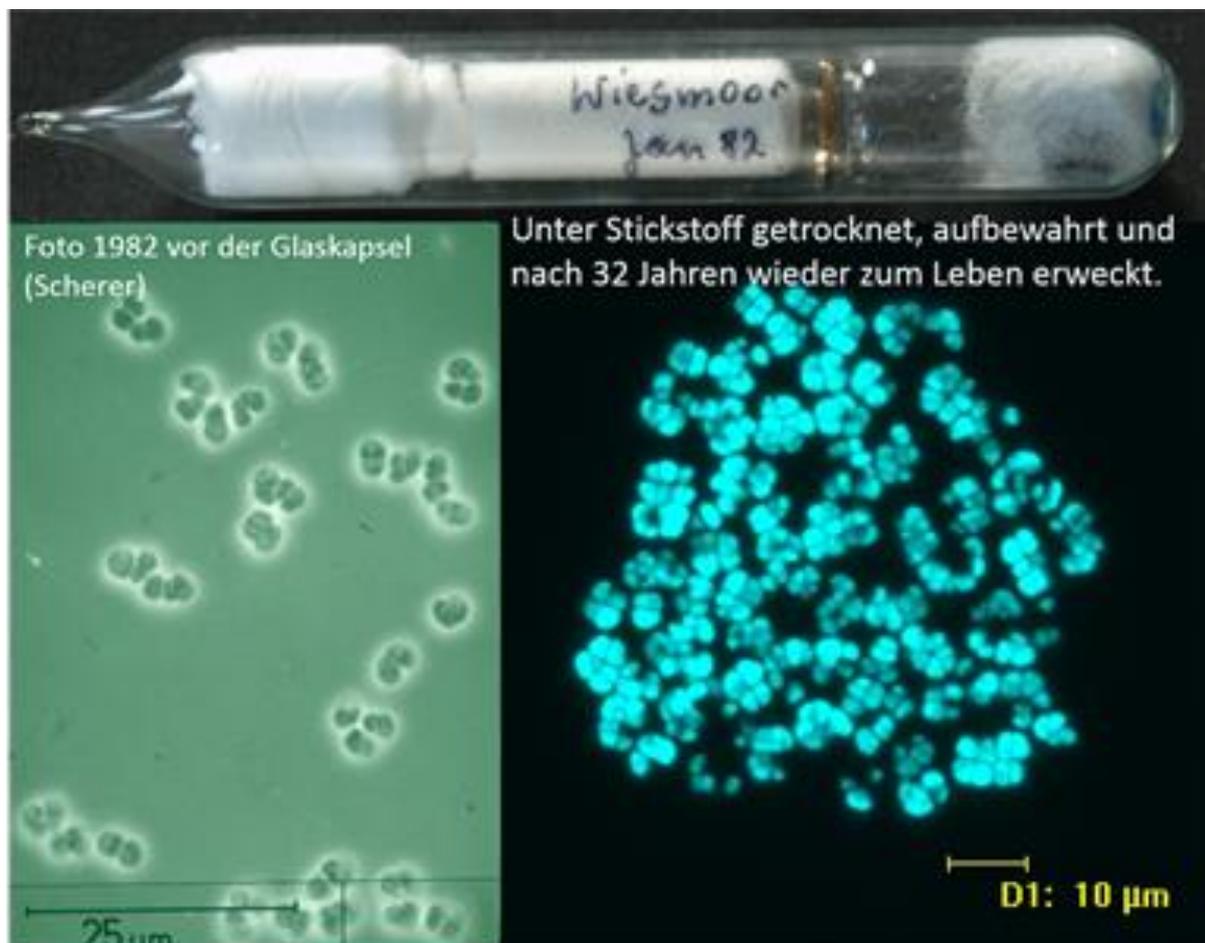
**Abbildung 22:** Makro- und Mikroskopische Aufnahmen der aus der Biogasanlage LfL isolierten Kolonien und Methanosarcinen (s. **Tabelle 2** und **3**). Eine fluoreszierende Kolonie ist in anaerober Petrischalen-Box gewachsen. A) Foto der Kolonie im Phasenkontrast, B) Foto der Kolonie im Fluoreszenzmodus mit Farbe türkisgrün (A und B: 40 x Vergrößerung). Die Kolonie wurde danach gepickt, mit 10 µL Wasser suspendiert und mit einer 400 x Vergrößerung untersucht. C) Aufnahme mit Phasenkontrast und D) Aufnahme im Fluoreszenzmodus (türkisgrün). Die Zellen wurden anhand der typischen Morphologie als *Methanosarcina* identifiziert.

Wurde eine Kolonie als möglicher Methanbildner identifiziert, wurde sie mit der Impföse gepickt und auf einem sauberen Objektträger mit Reinstwasser gemischt. Der Vorgang dauerte etwa 30 Sekunde. Die Koloniesuspension wurde anschließend mit dem Mikroskop analysiert. Ebenfalls mit Hilfe der Impföse wurde das Inokulum in frisches anaerobes Flüssigmedium übertragen.

#### 4.3.14 Wiederbelebung und Identifizierung einer 32 Jahre alten Methanosarcina-Probe

Zur Demonstration der erfolgreichen angewendeten Kultivierungstechnik sowie des entwickelten Anzuchtmediums wurde eine einzigartige Kultur mit Methanbildnern gewählt. Eine Glasampulle mit einer 1981/1982 von Paul Scherer isolierten *Methanosarcina*-Kultur (SCHERER & BOCHEM 1983) wurde nach einem über 32 Jahre andauernden „Winterschlaf“ bei -20°C im Gefrierfach wieder zum Leben erweckt (**Ab-**

**bildung 23).** Im Januar 1982 wurde die damals gefriergetrocknete Kultur von der DSMZ in Göttingen fachmännisch in eine Glaskapsel unter Stickstoff zusammen mit Eisensulfid eingeschmolzen (DSMZ 8687). Es gelang, diese Kultur unter Verwendung des neu entwickelten HAW-Mediums mit 100 mM Methanol als Substrat und Hefeextrakt als zusätzlicher unspezifischer Nährstoffquelle zu reaktivieren. Dies diente als Beweis der hier erarbeiteten, guten Kulturtechnik. Nach molekularbiologischer Identifizierung ergab sich, dass dieses Isolat wieder einwandfrei der Spezies *Methanosarcina barkeri* Stamm Wiesmoor (DSMZ 8687) zuzuordnen war, wie er über die DSMZ zu beziehen ist.



**Abbildung 23:** Bilder einer Kultur von *Methanosarcina barkeri* Stamm Wiesmoor. Links unten: Aufnahme der Kultur vor der Lagerung (Foto von 1983), oben: Glaskapillare mit gefriergetrockneter Kultur mit Eisensulfid als Hilfsmaterial, unten rechts: Fluoreszenzaufnahme (420 nm) der wachstumsaktiven Kultur nach 32 Jahre Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

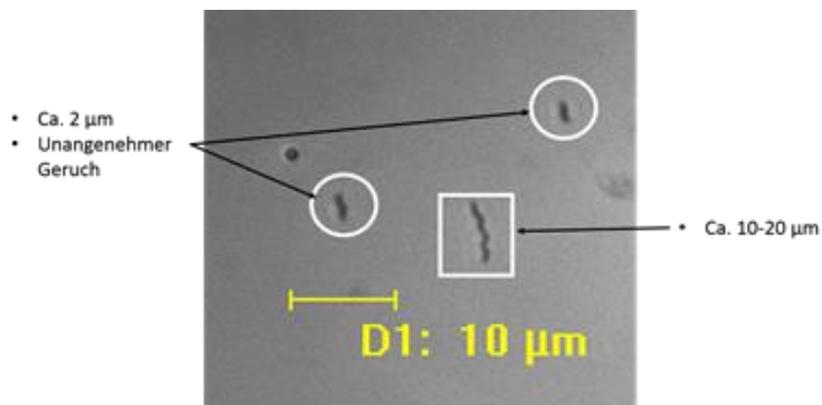
#### 4.3.15 Folgekultur und Verdünnungsreihe der Flüssigkulturen

Alle Flüssigkulturen wurden regelmäßig in ein neues Medium überimpft. Das Inokulum betrug in der Regel 10%. Verdünnungsreihen, um die gewünschten Methanbildner anzureichern, wurden in 10-fachen Verdünnungs-Schritten angesetzt, wobei meistens ei-

ne Serie mit sechs Stufen entstand. Für die weitere Überimpfung in Folgekulturen wurde die höchste Verdünnungsstufe gewählt, welche noch ein eindeutiges Wachstum der Methanbildner zeigte. Normalerweise konnte eine Reinkultur auf diese Weise nach der etwa der 10. Überimpfung erreicht werden. Zu jeder Überimpfung wurden generell drei verschiedene Antibiotika sowie Cystein (nebst  $\text{Na}_2\text{S}$  und Titancitrat) als Reduktionsmittel zugegeben. Als spezifische Substrate wurde ausschließlich mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nachgefüttert.

#### 4.3.16 Kontaminationsgefahr

Während der Isolierungsversuche unter  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  kam es selbst ohne Hefeextrakt wiederholt zu Kontaminationen durch unbekannte sehr robuste „Mitesser-Bakterien“ (**Abbildung 24**). Gegen diese wurden verschiedene Kombinationen von Antibiotika getestet. Eine Zusammenstellung aus Chloramphenicol, Bacitracin, Cycloserin, Cefotaxim und Rifampicin hat sich als wirksam herausgestellt. Die neu angesetzten Kulturen thermophiler Methanbildner wurden zuerst bei  $37^\circ\text{C}$  für 1 - 2 Tage aufgrund der Hitzeinstabilen Eigenschaft einiger Antibiotika inkubiert und dann bei der Zieltemperatur von zum Beispiel  $53^\circ\text{C}$  weiter kultiviert. Mögliche Kontaminationsquellen könnten die Fütterung und die Druckmessung gewesen sein, da die verwendeten sterilen Kanülen nicht bei jeder Injektion erneuert wurden.



**Abbildung 24:** Mikroskopische Aufnahme von Kontaminationen durch zwei unbekannte Bakterienarten. Kurzes, sehr mobiles sowie spiralförmiges Bakterium, markiert durch Kreis und Viereck.

Die in **Abbildung 24** durch Kreise markierten kleineren Bakterien bewegten sich im Zickzack oder im Kreis und wiesen eine wesentlich stärkere Mobilität auf, als die spiralförmigen Bakterien (Viereck). Ein Merkmal war der sehr unangenehme Geruch, wenn sich die kleineren Bakterien in der Kultur befanden. Bisher konnten diese Bakterien noch nicht molekularbiologisch identifiziert werden, eventuell handelt es sich bei diesen Mikroorganismen um *Desulfovibrio*. Die längeren, spiralförmigen Bakterien (Viereck) waren teilweise mehr als  $20\ \mu\text{m}$  lang und waren ebenfalls aktiv beweglich.

#### 4.3.17 Strategie der Trennung von Methanbildnern untereinander

Für die gezielte Isolierung der Methanbildner aus einer Mischpopulation mit anderen methanbildenden Archaeen wurden die bereits beschriebenen konventionellen Methoden wie Verdünnungsreihen und Überimpfungen mit je 3 Antibiotika verwendet.

Diese Methoden waren für die Kultivierung mit einem Flüssigmedium ausgelegt. Ein Nachteil war jedoch, dass nur die angepassten oder dominanten Methanbildner gehäuft gefunden wurden. Für die Isolierung neuartiger Methanbildner waren abgewandelte Methoden inklusive neuartiger Kulturmedien notwendig. Ein schwierigeres Problem war dabei die Trennung der angereicherten Methanbildner von unerwünschten Methanbildnern. Zum Beispiel waren stäbchenförmige Methanbildner bei der Kultivierung der gewünschten kokkenförmigen, methanogenen Archaeen im Lauf der Zeit nachgewachsen. Um die unerwünschten Methanbildner zu trennen, wurden die Medien und/oder die Temperatur variiert. Die angewendeten Möglichkeiten sind in **Tabelle 9** beschrieben.

**Tabelle 9:** Strategie für die Trennung unerwünschter Methanbildner von den gewünschten Ziel-Methanbildnern

Kulturtemperatur	pH-Wert	Nährstoffe
Die Anreicherung wurde bei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert. Zum Beispiel wurde erst eine Mischkultur bei 37°C inkubiert, danach in 26°C übertragen und anschließend bei 53°C weiter kultiviert.	Die zu trennenden Methanbildner wurden von einem Medium mit pH 7,0 in ein anderes Medium mit pH 6,4 oder umgekehrt übertragen.	Es wurden verschiedene Salze wie NaCl, KCl, NH <sub>4</sub> Cl, MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> oder einzelne Spurenelemente alleine oder in Kombination dem Medium vermehrt zugegeben.
Je nach gewählter Temperatur dominierte derjenige Methanbildner, welcher am besten an die Temperatur angepasst war. Durch den Temperaturwechsel der Kulturen konnten die methanogenen Mischkulturen aufgetrennt werden.	Die an den jeweiligen pH-Wert am besten angepassten Methanbildner konnten über die anderen dominieren.	Diese Methode wurde für die Separation der kokkenförmigen Methanbildner ( <i>Methanoculleus</i> ) von stäbchenförmigen Methanbildner angewendet.

Durch den Wechsel der Kulturtemperaturen war eine unspezifische Trennung von Methanbildnern möglich. Durch diese Veränderung der Kulturbedingungen konnte beispielsweise einer aus einer landwirtschaftlichen Biogasanlage stammender kokkenförmiger *Methanosarcina mazei* erfolgreich angereichert werden. Dieser trat anders als eine typische *Methanosarcina* in Einzelzellen von  $\leq 1 \mu\text{m}$  auf.

## 5 Verwertung

Die meisten Methanbildner aus Biogasanlagen sind derzeit weitgehend neuartig (kein direkter Bezug zu Datenbanken möglich), d.h. es ist keine eindeutige Identifizierung

möglich. Daher ist eine Isolierung im Wesentlichen wichtig, obwohl sie sehr aufwändig ist. Auf Basis der Isolate aus Flüssigmedien kann eine weitere Analyse, hier die Genomsequenzierung, durchgeführt werden. Die verbesserten Isolierungstechniken und -kenntnisse können zur weiteren Untersuchungen der Methanbildner positiv beitragen. Aber ein direkter kommerzieller Nutzen ist daraus nicht ableitbar. Der Nutzen besteht im besseren Verständnis der „Black Box“ Biogasanlage, um darüber eine Biogasanlage effizienter betreiben zu können.

### 5.1 Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten

Eine gemeinsame Publikation in einem wissenschaftlichen Journal ist vorgesehen. Außerdem ist eine weitere Publikation über die angewandte Methode und die damit erzielten Methanbildner geplant. Dazu wird die komplette Genomsequenzierung der Isolate beitragen, die ebenfalls publiziert wird. Die hier optimierten und entwickelten Techniken und Kenntnisse sind universell anwendbar und ohne den großen finanziellen Aufwand einer anaeroben „Glove box“ entstanden. Damit ließe sich die Erforschung der Mikrobiologie von Biogasanlagen weiter vorantreiben. Leider kann der Projektleiter wegen Emeritierung diese Ziele nicht mehr selbst weiter verfolgen.

### 5.2 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Die dargestellten Aspekte könnten im Rahmen von Satellitenprojekten oder Anschlussarbeiten bearbeitet werden.

- Nutzung des Datenmaterials zur Modellierung der Biogasfermentation (z. B. Erweiterung des ADM1-Modells)
- Entwicklung von molekularen Markern für prozessbeeinflussende Mikroorganismen und Validierung der Marker in Labormodellen
- Prüfung der Eignung von Isolaten als Hilfskulturen für Biogasfermentationen zur Steigerung des Biogasertrags bzw. der Abbaurate pflanzlicher Biomasse
- Isolation von weiteren Methanbildnern aus Biogasanlagen in Abhängigkeit des Substrates

## 6 Erkenntnisse von Dritten

Bisher existieren nur wenig kultivierungsabhängige Studien über die gezielte Isolierung von Mikroorganismen aus Biogasanlagen Während der Projektlaufzeit wurden mehrere wissenschaftliche Berichte zur methanogenen Diversität in Biogasanlagen veröffentlicht. Darunter befanden sich jedoch keine, die eine Methode zur vereinfachten und kostengünstigen Kultivierung bzw. Isolierung beinhaltete. Als aktuelle Beispiele für die Untersuchung der methanogenen Diversität in Biogasanlagen sollen folgende Studien genannt werden: REGUEIRO *et al.* 2012, SUNDBERG *et al.* 2013, ST. PIERRE & WRIGHT 2013,

FOTIDIS *et al.* 2013, ABENDROTH *et al.* 2015, LUCAS *et al.* 2015 und STOLZE *et al.* 2015. Diese Forschungsarbeiten der letzten Jahre sind ausschließlich OMIC- Arbeiten, also ohne mikrobielle Kulturen, d. h. kultivierungsunabhängige molekularbiologische Diversitätsanalysen. Als Antipode zu solchen vergleichsweise schnellen Methoden, die in den letzten Jahren zu Millionen von neuen mikrobiellen Gensequenzen geführt haben, entstand das Verbundprojekt, da ein erheblicher Mangel an klassisch mikrobiologischen Arbeiten mit anaeroben Bakterien und Archaeen existiert.

Auf der Seite der Biomasse abbauenden Bakterien wurden im Laufe des Projektes zahlreiche neue Organismen isoliert und beschrieben: HANIA *et al.* (2012, *Defluviitoga tunisiensis*), HAHNKE *et al.* (2014, *Clostridium bornimense*), KOECK *et al.* (2014, *Clostridium thermocellum*) sowie MAUS *et al.* (2015a, *Defluviitoga tunisiensis* L3).

In enger Zusammenarbeit konnten hauptsächlich die Arbeitsgruppen aus dem Verbundprojekt während der Projektlaufzeit erfolgreich Methanbildner mit kultivierungsunabhängigen Methoden charakterisieren. So wurde durch die Arbeitsgruppe des Verbundpartners Herrn König (Universität Mainz) im Rahmen eines anderen Projekts aus einer großtechnischen Biogasanlage mit Maissilage und Rindergülle als Co-Vergärung ein Vertreter der Gattung *Methanobacterium* isoliert (STANTSCHIEFF *et al.* 2014). Ebenfalls in Zusammenarbeit mehrerer Verbundpartner konnten zwei weitere Methanbildner, *Methanobacterium* sp. Mb1 und *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), isoliert und genomisch charakterisiert werden (MAUS *et al.* 2013 und MAUS *et al.* 2015b). Unabhängig vom Verbund wurde ein weiterer hydrogenotropher Methanbildner der Gattung *Methanobacterium* ebenfalls aus einer großtechnischen Biogasanlage isoliert und physiologisch charakterisiert (KERN *et al.* 2015).

## 7 Publikaive Tätigkeiten aufgrund des geförderten Projekts

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Development of a Quick Tool for Quantification of Methanogens, Graduate School, Hamburg, Germany, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Digital Image Analysis for Quantification of Microorganisms in Environmental Habitats. Annual conference, University of West Scotland, Paisley, Scotland, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Digital image analysis of total cells and methanogens in anaerobic digesters to serve as fingerprint and indicator. 13th Anaerobic Digestion World Conference, Santiago de Compostela in Spain, Poser presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Application of an image analysis system for quantification and classification of microbes from agricultural biogas plants. Microscopy Conference (MC) 2013, Regensburg, Germany, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Two-dimensional digital image analysis of fermentor samples for quantitative three-dimensional determination of living microorganisms, Promotion and Research day at the Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg, Germany, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2014, New Method to Isolate Methane Producing Bacteria under Oxygen Free Conditions, Graduate School, Hamburg, Germany, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2014, Novel Type of a Pressurised Anaerobic Cultivation System to Isolate Hydrogenotrophic Methanogens Utilizing H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> as Single Energy and Carbon Source, Annual conference, University of West Scotland, Paisley, Scotland, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2014, Development and application of rapid methods for quantification and cultivation of methanogens in Bio-Methane producing fermenters, Promotion and Research day at the Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg, Germany. Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2014, Estimation of the Total Methanogenic Cell Power (TMCP) and quantitative microscopic fingerprinting (QMF): A novel microscopic approach to forecast rapidly the performance of biogas plants, Biogas Science 2014, Vienna, Austria, Poster presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2014, Biogas status in Germany and microscopic quantification technique, Seminar, Seoul National University, Seoul, South Korea, Oral presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2015, Microscopic digital image analysis for monitoring of anaerobic digesters: quantification and classification of methanogens, Seminar, Newcastle University, Newcastle, England, Oral presentation

Kim Y.S., Scherer P., 2015, A New Digital Image Analysis Method for Objectification of Microbial Activity (Focused on Anaerobic Digesters), 12th Hamburger Studententagung, Innovation Medizin- und Biotechnologie, Hamburg, Oral presentation

Kim Y.S., Steven K., Scherer P., 2015, Digital Image Analysis as a Tool to Investigate Microbial Biodiversity, Annual conference, University of the West of Scotland, Paisley, Scotland, Oral presentation

## Schriftliche Publikationen

Kim Y.S., Scherer P., 2013, Rapid quantification and classification of bacteria and methanogens by digital image analysis, VAAM Annual Conference, Bremen, Germany, Oral presentation, Springer Biospektrum ISSN 0947-0867, p. 55

Kim Y.S., Neumann L., Scherer P., 2013, Einsatz einer quantitativen Bildanalyse zur Beurteilung mikrobieller Prozessparameter von Biogasanlagen. 7th Bioenergy Forum, Rostock, Germany, Oral presentation, ISBN 978-3-86009-207-1, pp.339-349

Kim Y.S., Scherer P., 2014, Microscopic Digital Image Analysis of a Farm-Scale Thermophilic Biogas Plant for Early Detection of Ammonia Inhibition Effects. Biogas in Progress III, Hohenheim, Germany, Oral Presentation, ISBN: 978-3-940706-07-2, pp. 46-47

Kim Y.S., Westerholm M., Scherer P., 2014, Dual investigation of methanogenic processes by quantitative PCR and quantitative microscopic fingerprinting (QMF), FEMS Microbiology, 360, p. 76-84, DOI: 10.1111/1574-6968.12592

Kim Y.S., 2015, Development and application of rapid methods for quantification and cultivation of methanogens in bio-methane producing fermenters, doctoral thesis University of West Scotland.

Maus I., Koeck D.E., Cibis K.G., Hahnke S., **Kim Y.S.**, Langer T., Kreubel J., Erhard M., Bremges A., **Off S.**, Stolze Y., Jaenicke S., Goesmann A., Sczyrba A., **Scherer P.**, König H., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schlüter A., Klocke M. (2016): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels* 9:171 Online: <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0581-3>

Maus I., **Kim Y.S.**, Wibberg D., Stolze Y., **Off S.**, Antonczyk S., Pühler A., **Scherer P.**, Schlüter A. (2017): Biphasic study to characterize agricultural biogas plants by high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing and microscopic analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(2), 321-334.

Torres G., **Kim Y.S.**, Maus I., Wibberg D., Winkler A., **Off S.**, Pühler A., **Scherer P.**, Schlüter A.: Genome sequence of *Methanobacterium congolense* strain Buetzberg, a hydrogenotrophic, methanogenic archaeon, isolated from a mesophilic industrial-scale biogas plant utilizing bio-waste. *J. Biotechnol.* (submitted).

## 8 Referenzen

- ABENDROTH C., VILANOVA C., GUENTHER T., LUSCHNIG O., PORCAR M. (2015):** Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 87–97.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., WYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990):** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- ANTONCZYK S., ARTHUR R., SCHERER P. (2015):** Prozesscharakteristik und lösliche Spurenelemente der Startup-Phase einer thermophilen Güllebiogasanlage. In „Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven“, S. 379-381, Hrsg. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. KTBL ISBN 978-3-945088-07-4, Darmstadt.
- ARGYROPOULOS D.N., VARZAKAS T.H., ... BENZIE J.A.H. (2013):** Microbial communities and their dynamics in biomethane production. In: *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion*, ed. By N.E.Korres, P. o’Kiely, J.A.H. Benzie & J.S. West, Publisher Routledge (Earthscan), pp. 261-289.
- ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E., LE PASLIER D., YAMADA T., MENDE D.R., BERTALAN M. (2011):** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- BALCH W.E., WOLFE R.S. (1976):** New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 781-791.
- BARKER H.A. (1936):** Studies upon the methane-producing bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*. 7, 420-438.
- BAST E. (2010):** Mikrobiologische Methoden, Verlag: Springer Spektrum.
- BOONE D.R., MAH R.A. (1987):** Effects of calcium, magnesium, pH, and extent of growth on the morphology of *Methanosarcina mazei* S-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1699-1700.
- BOONE D.R. (2001):** Genus IV. *Methanothermobacter*. In Garrity, G. M. (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, Springer publisher, Berlin, pp. 230-233.
- BRYANT M.P., MCBRIDE B.C., WOLFE R.S. (1968):** Hydrogen-oxidizing methane bacteria. *J. Bacteriol.* 95(3), 1118-1123.
- BRYANT M.P., WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S. (1967):** *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 59, 20–31.
- BREWER J.H., ALLGEIER D.L. (1966):** Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. *Appl. Microbiol.* 14, 985-988.
- CHEN Y., CHENG J.J. (2007):** Effect of potassium inhibition on the thermophilic anaerobic digestion of swine waste. *Wat. Environ. Resear.* 79, 667-674.
- CHO K., LEE J., KIM W., HWANG S. (2013):** Behavior of methanogens during start-up of farm-scale anaerobic digester treating swine wastewater. *Process Biochem.* 48, 1441-1445.
- CONRAD R., SCHINK B., PHELPS T.J. (1986):** Thermodynamics of H<sub>2</sub>-consuming and H<sub>2</sub>-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under *in situ* conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 353–360.

- DANIELS L., BELAY N., RAJAGOPAL B.S., WEIMER P.J. (1986):** Bacterial methanogenesis and growth from CO<sub>2</sub> with elemental iron as the sole source of electrons. *Science*. 237, 509-511.
- DANIELS L., ZEIKUS J.G. (1975):** Improved culture flask for obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 29(5), 710-711.
- DEMIREL B., SCHERER P.A. (2011):** Trace elements requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass & Bioenergy* 35: 992-998.
- DEMIREL B. (2014):** Major pathway of methane formation from energy crops in agricultural biogas digesters. *Crit. Rev. Environm. Sci. Technol.* 44(3), 199-222.
- DEPPENMEIER U., MÜLLER V., GOTTSCHALK G. (1996):** Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* 165, 149-163.
- DODDEMA H.J., VOGELS G.D. (1978):** Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(5), 752-754.
- EDWARDS T., MCBRIDE B.C. (1975):** New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 540-545.
- FERGUSON T.J., MAH, R.A. (1983):** Isolation and characterization of an H<sub>2</sub>-oxidizing thermophilic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1), 265-274.
- FOTIDIS I.A., KARAKASHEV D., KOTSPOULOS T.A., MARTZOPOULOS G.G., ANGELIDAKI I. (2013):** Effect of ammonia and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 38-48.
- FUNG D.Y.-C. (1988):** Methodology of anaerobic cultivation. *In* Erickson, L. E. & Fung, D. Y.-C. (eds.), pp. 3-25. *Handbook on anaerobic fermentations*. Marcel Dekker, New York.
- GANTNER S., ANDERSSON A.F., ALONSO-SÁEZ L., BERTILSSON S. (2011):** Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Methods.* 84, 12-18.
- HERMANN M., NOLL K.M., WOLFE R.S. (1986):** Improved agar bottle plate for isolation of methanogens or other anaerobes in a defined gas atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5), 1124-1126.
- HANIA W.B., GODBANE R., POSTEC A., HAMDY M., OLLIVIER B., FARDEAU M.L. (2012):** *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1377-1382.
- HANREICH A., HEYER R., BENNDORF D., RAPP E., PIOCH M., REICHL U., KLOCKE M. (2012):** Metaproteome analysis to determine the metabolically active part of a thermophilic microbial community producing biogas from agricultural biomass. *Can. J. Microbiol.* 58, 917-922.
- HANREICH A., SCHIMPF U., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., BENNDORF D., HEYER R., RAPP E., PÜHLER A., REICHL U., KLOCKE M. (2013):** Metagenome and metaproteome analyses of mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermenters indicate concerted plant carbohydrate degradation. *System. Appl. Microbiol.* 36, 330-338.
- Davis R.P., Harris J.E. (1985):** Spontaneous protoplast formation by *Methanosarcina barkeri*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1481-1486.
- HARRIS J.E., PINN P.A., DAVIS R.P. (1984):** Isolation and characterization of a novel thermophilic freshwater methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(6), 1123-1128.
- HILTON B., OLESZKIEWICZ J. (1988):** Sulfide-induced inhibition on anaerobic digestion. *J. Environ. Eng.* 111, 1377-1391.
- HUNGATE R.E. (1950):** The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14(1), 1-49.

- HUNGATE R.E. (1969):** A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, *In* Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (eds.) *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, pp. 117-132. Academic Press, Inc., New York.
- JARRELL K.F., KALMOKOFF M.L. (1988):** Nutritional requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* 34, 557-576.
- JUNICKE H., FELDMAN H., VAN LOOSDRECHT M.C., KLEEREBEZEM R. (2015):** Impact of the hydrogen partial pressure on lactate degradation in a coculture of *Desulfovibrio* sp. G11 and *Methanobrevibacter arboriphilus* DH1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99,3599-3608.
- JONES G.A., PICKARD M.D. (1980):** Effect of Titanium(III) citrate as reducing agent on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(6), 1144-1147.
- KAMAGATA Y., MIKAMI E. (1991):** Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *J. Syst. Bacteriol.* 41(2), 191-196.
- KERN T., LINGE M., ROTHER M. (2015):** *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(6), 1975-1980.
- KIENER A., LEISINGER T. (1983):** Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 4, 305-312.
- KIM Y.S. (2015):** Development and application of rapid methods for quantification and cultivation of methanogens in bio-methane producing fermenters. Dissertation, UWS (University of the West of Scotland).
- KIM Y.S., SCHERER P. (2014):** Microscopic Digital Image Analysis of a Farm-Scale Thermophilic Biogas Plant for Early Detection of Ammonia Inhibition Effects. *Biogas in Progress III*, Hohenheim, Germany, Oral Presentation, ISBN: 978-3-940706-07-2, pp. 46-47.
- KLANG J., THEUERL S., SZEWZYK U., HUTH M., TÖLLE R., KLOCKE M. (2015):** Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microb. Biotechnol.* 8(5), 764-775.
- KOECK D.E., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2014):** Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: Genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 311-319.
- KRAKAT N., WESTPHAL A., SCHMIDT S., SCHERER P. (2010a):** Anaerobic digestion of renewable biomass – thermophilic temperature governs population dynamics of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1842-1850.
- KRAKAT N., WESTPHAL A., SATKE K., SCHMIDT S., SCHERER P. (2010b):** The microcosm of a biogas fermenter: Comparison of moderate hyperthermophilic (60°C) with thermophilic (55°C) conditions. *Eng. Life Sci.* 10, 520–527.
- KRAKAT N., SCHMIDT S., SCHERER P. (2011):** Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Biores. Technol.* 102, 5692-5701.
- KRAUSE L., DIAZ N.N., EDWARDS R.A., GARTEMANN K.H., KRÖMEKE H., NEUEWGER H., ... SZCZEPANOWSKI R. (2008):** Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136(1), 91-101.
- KTBL Autorenkollektiv (2013):** *Faustzahlen Biogas*. 3. Auflage. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft eV (KTBL) & Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe (FNR), Darmstadt, ISBN 978-3-941583-85-6.
- KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., NEI M. (2001):** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.

- LANE D.J. (1991):** 16S/23S rRNA sequencing, *In* Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, London, United Kingdom, pp. 115–175.
- LIESEGANG H., KASTER A.K., WIEZER A., GOENRICH M., WOLLHERR A., SEEDORF H., GOTTSCHALK G., THAUER R.K. (2010):** Complete genome sequence of *Methanothermobacter marburgensis*, a Methanoarchaeon model organism. *J. Bacteriology*. 192, 5850-5851.
- 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*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 545-556.
- LIU Y., BEER L.L., WHITMAN W.B. (2012):** Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. *Trends in Microbiol.* 20, 251-258.
- LIU Y., BOONE D.R., SLEAT R., MAH R.A. (1985):** *Methanosarcina mazei* LYC, a new methanogenic isolate, which produces a disaggregating enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 608-613.
- LIU J., WANG H., YANG H., ZHANG Y., WANG J., ZHAO F., QI J. (2013):** Composition-based classification of short metagenomic sequences elucidates the landscapes of taxonomic and functional enrichment of microorganisms. *Nucleic Acids Res.* 41(1), e3.
- LJUNGDAHL L.G., WIEGEL J. (1986):** Working with anaerobic bacteria. *In* Demain, A. L. & Solomon, N. A. (eds.), pp. 84-96. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- LOVLEY D.R., KLUG M.J. (1983):** Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 187-192.
- LUCAS R., KUCHENBUCH A., FETZER I., HARMS H., KLEINSTEUBER S. (2015):** Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, doi: 10.1093/femsec/fiv004
- MAUS I., KIM Y.S., WIBBERG D., STOLZE Y., OFF S., ANTONCZYK S., PÜHLER A., SCHERER P., SCHLÜTER A. (2017):** Biphasic study to characterize agricultural biogas plants by high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing and microscopic analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(2), 321-334.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., CIBIS K., EIKMEYER F.G., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2013):** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1 isolated from a production-scale biogas plant. *J. Biotechnol.* 168, 734-736.
- MAUS I., CIBIS K.G., WIBBERG D., WINKLER A., STOLZE Y., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015a):** Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J. Biotechnol.* 3, 17-18.
- MAUS I., WIBBERG D., STANTSCHIEFF R., STOLZE Y., BLOM J., EIKMEYER F.G., FRACOWIAK J., KÖNIG H., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015b):** Insights into the annotated genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* MS2(T), related to dominant methanogens in biogas-producing plants. *J. Biotechnol.* 201, 43-53.
- MILLER T.L., WOLIN M.J. (1974):** A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27(5), 985-987.
- MUNK B., BAUER C., GRONAUER A., LEBUHN M. (2010):** Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng. Life Sci.* 10, 496-508.
- NAKAMURA K., TERADA T., SEKIGUCHI Y., SHINZATO N., MENG X.Y., ENOKI M., KAMAGATA Y. (2006):** Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family *Methanobacteriaceae*. *App. Environ. Microbiol.* 72(11), 6907-6913.

- NETTMANN E., BERGMANN I., PRAMSCHÜFER S., MUNDT K., PLOGSTIES V., HERRMANN C., KLOCKE M. (2010):** Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2540-2548.
- OLSON K.D. (1992):** Modified bottle plate for the cultivation of strict anaerobes. *J. Microbiol. Meth.* 14, 267-269.
- PLUGGE C.M. (2005):** Anoxic media design, preparation, and considerations. *Methods Enzymol.* 397, 3-16.
- RADEMACHER A., HANREICH A., BERGMANN I., KLOCKE M. (2012):** Black-Box-Biogasreaktor — mikrobielle Gemeinschaften zur Biogaserzeugung. *In Methoden Biogas-Mikrobiologie BIOspektrum.* Volume 18, Issue 7, pp. 727-729.
- REGUEIRO L., VEIGA P., FIGUEROA M., ALONSO-GUTIERREZ J., STAMS A.J.M., LEMA J.M., CARBALLA M. (2012):** Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Micriobiol. Res.* 167, 581-589.
- SCHERER P. (1987):** Medium design for mass cultivation of methylotrophic methanogens: optima curves for gas evolution rates and growth yields of some new, precisely dosable inorganics and organic sulfur sources in comparison with H<sub>2</sub>S, *In Dechema biotechnology conference 1*, VCH Verlagsgesellschaft. pp. 447-456.
- SCHERER P. (1989):** Vanadium and molybdenum requirement for the fixation of molecular nitrogen by two *Methanosarcina* strains. *Arch. Microbiol.* 151, 44-48.
- SCHERER P.A. (2001):** Mikrobiologie der Vergärung von festen Abfallstoffen. *In: Kämpfer, P. & Weißenfels, W. (eds.) Biologische Behandlung organischer Abfälle.* Springer Verlag, Heidelberg, pp. 45-80.
- SCHERER P., SAHM H. (1981):** Influence of sulphur containing compounds on the growth of *Methanosarcina barkeri* in a defined medium. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 28-35.
- SCHERER P., KNEIFEL H. (1983):** Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 154, 1315-1322.
- SCHERER P.A., BOCHEM H.-P. (1983):** Ultrastructural investigation of 12 *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphate-like inclusions. *Canad. J. of Microbiol.* 29, 1190-1199.
- SCHERER P., LIPPERT H., WOLFF G. (1983):** Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria determined by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Biol. trace element Resear.* 5, 149-163.
- SCHINK B. (1997):** Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- SCHINK B., STAMS A.J.M. (2006):** Syntrophism among prokaryotes. *In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H & Stackebrandt, E. (eds.) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.* 3rd edn. Vol. 2. New York: Springer, pp. 309–335.
- SCHNELLEN C.G.T.P. (1947):** Onderzoekingen over de Methaangisting. Dissertation, Technische Universiteit Delft, Nederlande.
- SCHNÜRER A., ZELLNER G., SVENSSON B.H. (1999):** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 249-261.
- SCOTT R.I., WILLAMS T.N., LLOYD D. (1983):** Oxygen sensitivity of methanogenesis in rumen and anaerobic digester populations using mass spectrometry. *Biotechnol. Letters.* 5(6), 375-380.

- SOLLI L., HÅVELSRUD O.E., HORN S.J., RIKE A.G. (2014):** A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol. Biofuels*, 7(1), 1.
- SOWERS K.R., BOONE J., GUNSALUS R.P. (1993):** Disaggregation of *Methanosarcina* spp. and growth as single cells at elevated osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59,3832-3839.
- SOUSA D.Z, SMIDT H., ALVES M.M., STAMS A.J.M. (2009):** Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 257–272.
- STANTSCHIEFF R., KUEVER J., RABENSTEIN A., SEYFARTH K., DRÖGE S., KÖNIG H. (2014):** Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5719-5735.
- STOLZE Y., ZAKRZEWSKI M., MAUS I., EIKMEYER F., JAENICKE S., ROTTMANN N., SIEBNER C., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2015):** Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol. Biofuels*. 8:14.
- ST. PIERRE B., WRIGHT A.D. (2013):** Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. *Bioresour. Technol.* 138, 277–84.
- SUNDBERG C., AL-SOUD W.A., LARSSON M., ALM E., YEKTA S.S., SVENSSON B.H., SORENSEN S.J., KARLSSON A. (2013):** 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 612–626.
- THAUER R.K., KÄUFER B., SCHERER P. (1975):** The active species of CO<sub>2</sub> utilized in ferredoxin-linked carboxylation reactions. *Arch. Microbiol.* 104, 237-240.
- THEUERL S., KOHRS F., BENNDORF D., MAUS I., WIBBERG D., SCHLÜTER A., KAUSMANN R., HEIERMANN M., RAPP E., REICHL U., PÜHLER A., KLOCKE M. (2015):** Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(18), 7791-803.
- TOKURA M., CHAGAN I., USHIDA K., KOJIMA Y. (1999):** Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbiol.* 39, 123–128.
- TORRES G., KIM Y.S., MAUS I., WIBBERG D., WINKLER A., OFF S., PÜHLER A., SCHERER P., SCHLÜTER A. (2016):** Genome sequence of *Methanobacterium congolense* strain Buetzberg, a hydrogenotrophic, methanogenic archaeon, isolated from a mesophilic industrial-scale biogas plant utilizing bio-waste (*J. Biotechnol.*, in press).
- UFFEN R.L., WOLFE R.S. (1970):** Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions. *J. Bacteriol.* 104(1), 462-472.
- WACHENHEIM D.E., HESPELL R.B. (1984):** Inhibitory effects of Titanium(III) citrate on enumeration of bacteria from rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2), 444-445.
- WASSERFALLEN A., NOLLING J., PFISTER P., REEVE J., DE MACARIO E.C. (2000):** Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 43-53.
- WEILAND P., FRICKE K., HEUBNER C., HÜTTNER A., TURK T. (2015):** Anlagen zur Erzeugung von Bioenergie, S. 603-741. In Rosenwinkel, K.-H., Kroiss, H., Dichtl, N., Seyfried, C.-F. & Weiland, P. (Hrsg.) *Anaerobtechnik*. 3. Auflage, Springer Vieweg Verlag, Darin Kap. 8.1 Landwirtschaftliche Vergärungsanlagen (S. 605-635) und Kap. 8.2. Beispiele landwirtschaftlicher Vergärungsanlagen (S. 635-645).

- WILKINS D., RAO S., LU X., LEE P.K.H. (2015):** Effects of sludge inoculum and organic feedstock on active microbial communities and methane yield during anaerobic digestion. *Front. Microbiol.* Vol. 6 Nr. 01114
- WIRTH R., KOVÁCS E., MARÓTI G., BAGI Z., RÁKHELY G., KOVÁCS K.L. (2012):** Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for biofuels*, 5, 41-57.
- WOLFE R.S. (1971):** Microbial formation of methane. *Adv. Microb. Physiol.* 6, 107-146.
- WOLFE R.S. (2011):** Techniques for cultivating methanogens. *Methods Enzymol.* 494, 1-22.
- WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S. (1963):** Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238(8), 2882-2886.
- XUN L., MAH R.A., BOONE D.R. (1990):** Isolation and characterization of disaggregatase from *Methanosarcina mazei* LYC. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3693-3698.
- ZEHNDER A.J.B., WUHRMANN K. (1976):** Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science.* 194, 1165-1166.
- ZEIKUS J.G. (1977):** The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews.* 41(2): 514-541.
- ZEIKUS J.G., WOLFE R.S. (1972):** *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 109, 707-15.
- ZHANG Z.Y., MAEKAWA T. (1996):** Effects of sulfur containing compounds on the growth and methane production of acclimated-mixed methanogens. *Biomass and bioenergy.* 10, 45-56.

## Danksagung

Für die gute Zusammenarbeit und besonders für die zahlreichen chemischen Analysen möchten wir Herrn Nils Scharfenberg und Herrn Dr. Christian Rösner danken. Für die Unterstützung im Labor danken wir herzlich Frau Monika Unbehauen. Für die tatkräftige Mithilfe bei der Kultivierung und einigen Versuchen bedanken wir uns bei Frau Magdalena Rogalla und Herrn Mark Goldenthal. Auch der Doktorand Dipl. Ing. (FH) Sebastian Antonczyk stand immer wieder bei technischen Problemen mit Rat und Tat bereitwillig zur Seite. Nicht zuletzt gilt unser Dank Herrn Franz-Josef Butschen, dem Betreiber.

## 9 Anhang

### 9.1 Materialien zu den molekularbiologischen Arbeiten

#### Pipettierschema für einen PCR-Ansatz (1 x, 50 µL)

PCR-Wasser (nukleasfrei)	28,7 µL
PCR-Puffer (10 x)	5 µL
dNTP-Mix (2 mM)	6 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µL
Forward-Primer (50 pmol/µL)	1 µL
Reverse-Primer (50 pmol/µL)	1 µL
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µL
Template-DNA	3 µL
Gesamtvolumen	50 µL

Der PCR-Puffer ist speziell auf die DNA-Polymerase abgestimmt und wird daher mit der Polymerase zusammen verkauft (Fermentas GmbH). Die PCR-Primer-Sets wurden von Eurofins Genomics bezogen, weitere Details siehe 3.1.1.

#### TAE-Laufpuffer für die Agarosegel-Elektrophorese (25 x)

Tris	242,0 g
EDTA (Titriplex III)	18,6 g
Eisessig	57,1 mL
Aqua dest.	ad 2000 mL

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,8 eingestellt.

#### Agarosegel (1,5%)

1 x TAE-Puffer	200 mL
Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)	3,0 g
Ethidiumbromid-Lösung (1%)	20 µL

## 9.2 Protokoll zur DNA-Extraktion

### Protokoll der DNA-Extraktion der Biogas-Fermenterproben aus Viersen

1. Abwiegen von 2 x 5 g Probe pro biologisches Replikat
2. Zugabe von 10 ml PBS (1 x, 4°C)
3. Mischung in entsprechend große Zentrifugengefäße überführen (50 ml Tube)
4. Zentrifugieren bei 9000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur (RT)
5. Überstand verwerfen (Dreck im Überstand, Bakterien im Pellet)
6. Pellet aufnehmen in 10 ml PBS (1 x, 4°C)
7. Zugabe von je 2 g steriler Glasperlen (0,75-1,0 mm und 1,7-2,1 mm)
8. 10 Minuten auf Schüttler schütteln, RT, höchste Stufe
9. Zentrifugieren 200 x g, 5 Min, RT
10. Überstand sammeln (50 ml Tube)
11. 2 x wiederholen von Schritt 8-10 (Bakterien befinden sich im Überstand)
12. Gesammelter Überstand (ca. 30 ml) zentrifugieren 9000 x g, 5 min, 4°C
13. Pellet kann bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren werden
14. Pellet auftauen und in 840 µl ml 1 x PBS-Puffer aufnehmen (in 2 ml Tube)
15. Zugabe von 450 µl Lysozym (10 mg/ml) und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
16. Schütteln bei 180 Upm (Umdrehungen pro Minute), 37°C, 1 Stunde
17. Zugabe von 180 µl SDS (10% w/v)
18. Inkubieren bei 65°C (Wasserbad), 1 Stunde, alle 15 Minuten invertieren (nicht schütteln!)
19. Aufteilen auf 2 x 2 ml Tubes mit je ca. 0,75 ml
20. Zugabe von 0,75 ml Lysepuffer (1,4 M NaCl, 2% CTAB, 20 mM Na-EDTA, 100 mM Tris)
21. Inkubieren bei 65°C (Wasserbad), 1 Stunde, alle 15 Minuten invertieren (nicht schütteln!)
22. Abkühlen lassen auf Raumtemperatur
23. Zugabe von 10 µl RNase A in TE-Puffer (32 mg/ml) -> 0,2 mg Endkonzentration
24. Inkubation 1 Std. bei 37°C
25. Reinigung zur letzten Entfernung von Huminsäuren und anderer Störstoffe durch Benutzung des DNA-Extraktionskits: PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit der Firma MoBio. Die Durchführung wurde anhand der Angaben des Herstellers vorgenommen.

### 9.3 Verwendete Lösungen zur Medienherstellung (Beschriftung in Englisch)

#### Macroelement solution (1 L stock solution)

Ingredients	Molar mass each [g/mol]	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/L]	Concentration in medium [mM]	ppm in medium
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	24.3 Mg	203.3	1	5	121.25 Mg
NaCl	23 Na	58.44	1.75	30*	1034 Na
NH <sub>4</sub> Cl	18 NH <sub>4</sub>	53.49	1	18.6	335 NH <sub>4</sub>
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	40.1 Ca	147.02	73.5 mg	0.5	20 Ca
KCl	39.1 K	74.55	4.78	64.1	2500 K

\*Max. 40-50 mM sodium in medium. Otherwise inhibition possible. Including sodium acetate, sodium formate, Na<sub>2</sub>S, sodium polyphosphate

#### Trace-element solution (100 mL stock solution)

Ingredients	Molar mass each [g/mol]	Molar mass [g/mol]	Stock solution [mg/L]	Concentration in stock solution [μM]	Concentration in medium (1:100) [μM]	ppb in medium
(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>x</sub>	22.9/31/16	101.96x	10g/L	102mM	1mM	31 P ppm
ZnCl <sub>2</sub>	65.4 Zn	136.28	6.81	50	0.5	33 Zn
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	54.9 Mn	197.91	1.98	10	0.1	5.5 Mn
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.8 B	61.83	0.62	10	0.1	1.1 B
CuCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	63.5 Cu	170.48	1.70	10	0.1	6.4 Cu
NaWO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	183.8 W	329.86	3.30	10	0.1	18.4 W
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	58.9 Co	237.93	11.89	50	0.5	29.5 Co
NiCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	58.7 Ni	237.71	11.88	50	0.5	29.3 Ni
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> *5H <sub>2</sub> O	78.9 Se	263.01	2.63	10	0.1	7.9 Se
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	95.9 Mo	241.45	2.41	10	0.1	9.6 Mo
Fe(III)Cl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	55.85 Fe	270.30	270	1000	10	558 Fe

Filtrated

Vitamin solution (100 mL stock solution) (WOLIN *et al.* 1963)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [mg/500 mL]	Concentration in stock solution [ $\mu$ M]	Concentration in medium (1:100) [ $\mu$ M]	ppb in medium
Biotin	244.3	1.0	8.20	0.08	19.54
Folic acid	441.41	1.0	4.53	0.05	22.07
Pyridoxinhydrochlorid	205.64	5.0	48.6	0.49	100.76
Riboflavin	376.37	2.5	13.3	0.13	48.92
Thiamin-HCl	337.27	2.5	14.8	0.15	50.6
Nicotine acid	123.11	2.5	40.6	0.41	50.5
D-Ca-Pantothenate	476.54	2.5	10.5	0.10	47.65
Vitamin B <sub>12</sub>	1355.4	0.1	0.147	0.0015	2.03
p-Aminobenzoic acid	137.14	2.5	36.5	0.36	49.37
Lipoic acid	206.33	2.5	24.2	0.24	49.52

Filtrated

Fe-Cysteine solution (50 mL stock solution) (SCHERER & KNEIFEL 1983)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/50mL]	Concentration in stock solution [mM]	1:500 in 200 mL medium	Concentration in medium [mM]	Note	ppm in medium
Cysteine-HCl-Monohydrate	175.64	1.87	212.5	400 $\mu$ L	0.425	10 $\mu$ l in 5 mL tube	74 cysteine
Fe(II)citrate	245.95	61 mg	5		0.01		0.558 Fe

Filtrated obtained by Merck, 1.02839.0100, Darmstadt, Germany

Polyphosphate (100 mL stock solution; Phosphate source)

Ingredients	Molar mass each [g/mol]	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/L] (1 g / 10 mL)	Concentration in stock solution [mM]	Concentration in medium (1:2000) [ $\mu$ M]	ppm in medium
(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>x</sub>	22.9/31/16	101.96x	10g/100mL	1000 mM	0.5 mM	15.5 (P) ppm

Obtained by Riedel – de Haën, 50690, Germany

Imidazole-Solution (100 mL stock solution; pH-Buffer)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/100 mL]	Concentration in stock solution [M]	Concentration in medium (1:100) [mM]	ppm
Imidazole	68.08	6.81	1	10	680
HCL 25%	36.545	Ca. 6 mL			

Filtered by activated carbon filter and oxygen excluded, obtained by J.T.Baker, UN3263, Deventer, Netherlands

Na<sub>2</sub>S Solution (100 mL stock solution) (SCHERER & SAHM 1981)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/100mL]	Concentration in Stock solution [mM]	1:250 in 200 mL medium	Concentration in medium [mM]	Note	ppm in medium
Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	240	6 (or 0.6g / 10 mL)	250	800 µL	1	20µl in 5mL tube	32 S

Make new solution every month, autoclaved, obtained by Sigma Aldrich, 016-009-00-8, Steinheim, Germany

Resazurin solution (100 mL stock solution) (SCHERER & KNEIFEL 1983)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [mg/100mL]	Concentration in stock solution [mM]	1:500 in 200 mL medium	Concentration in Medium [µM]	ppm in Medium
Resazurin	257.17	100	4	400 µL		2.06

Autoclaved, obtained by SERVA, 34226, Heidelberg, Germany

Titan-Citrate-solution (50 mL stock solution) (ZEHNDER & WUHRMANN 1976)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/50mL]	Concentration in stock solution [mM]	1:1000 in 200 mL medium	Concentration in medium [mM]	Note	ppm in medium
Tri-Na-citrate*2H <sub>2</sub> O	294.1	2.94	200	200 µL	0.2	10 µl in 5 mL tube	38.4 Citrate
Titan-III-chloride	154.26	5 mL	83.9		0.083	100 µl in 5 mL tube	3.9 Titan

Adjust pH 6.8 with 2mol NaOH, autoclave, oxygen exclusion with N<sub>2</sub>, obtained by Merck, 1.10789.0001, Darmstadt, Germany

Sodium acetate solution (100 mL stock solution)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/L]	Concentration in Stock solution [mM]	Concentration in Medium (1:100) [mM]	ppm in Medium
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> (Na-Acetate)	82.03	41	500	5	295 Acetate

Autoclaved

Sodium formate solution (100 mL stock solution)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/L]	Concentration in stock solution [M]	Concentration in medium (1:100) [mM]	ppm in medium
HCOONa	68.01	68	1	10	460 formate

Autoclaved

NaHCO<sub>3</sub>-Solution (100 mL stock solution; Additional CO<sub>2</sub> source)

Ingredients	Molar mass CO <sub>3</sub> [g/mol]	Molar mass [g/mol]	Stock solution [g/L]	Concentration in stock solu- tion [M]	Concentration in medium (1:200) [mM]	ppm
NaHCO <sub>3</sub>	60.0	84.01	84.01	1	5	300 (CO <sub>3</sub> )

Thiosulfate solution (100 mL stock solution) (ZEHNDER & WUHRMANN 1976)

Ingredients	Molar mass [g/mol]	Stock so- lution [g/100 mL]	Concentra- tion in stock solution [mM]	1:100 in 200 mL medium	Concentra- tion in Me- dium [mM]	Note	ppm in medium
Na- Thiosulfate- pentahy- drate	248.18	0.12	5mM	2 mL	0.05	50 µl in 5 mL tube	5.6 Thi- osulfate

## 9.4 Lösungen verwendeter Antibiotika

Antibiotics (10 mL stock solution) (KAMAGATA & MIKAMI 1991, FERGUSON & MAH *et al.* 1983, HARRIS *et al.* 1984)

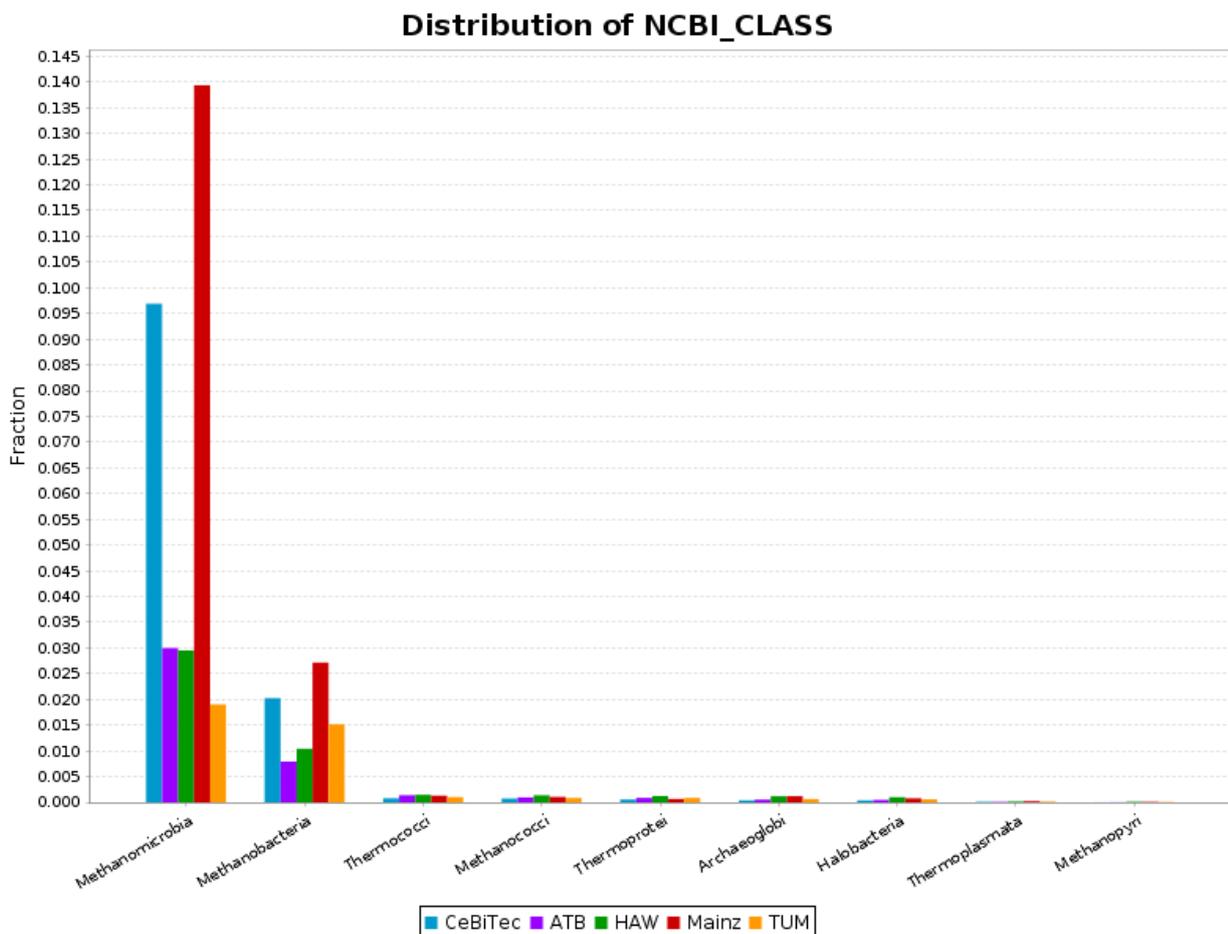
Nr.	Antibiotics	Stock solution	Storage	Working solution in 10 mL serum flask	For 5 mL tube [100 µl, 1:50]
1	Cefoxitin (Roth, 4156.1)	100 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
2	Cefsulodin (Roth, 4014.1)	20 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 200 µg/mL)	4 µg/mL in medium
3	Vancomycin (Roth, 0242.1)	100 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
4	Cycloserin (Roth, CN37.1)	100 mg/mL in buffer*	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
5	Cefotaxime (VWR, EHERC11064400)	100 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
6	Chloramphenicol (Roth, 3886.2)	100 mg/mL in ethanol	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
7	Ampicillin (Roth, HP62.1)	250 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 2500 µg/mL)	50µg/mL in medium
8	Rifampicin (Roth, 4163.1)	100 mg/mL in DMSO	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium
9	Bacitracin (VWR, EHER10418000)	100 mg/mL in water	100 µl aliquot at -20°C	100 µl aliquot in 10 mL PBS (1:100; 1000 µg/mL)	20 µg/mL in medium

\*Note: Sodium carbonate buffer 0.05 M) 0.294 g NaHCO<sub>3</sub> (35 mM) + 0.159 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15 mM) in 100 mL sterile water; pH ca. 9.5

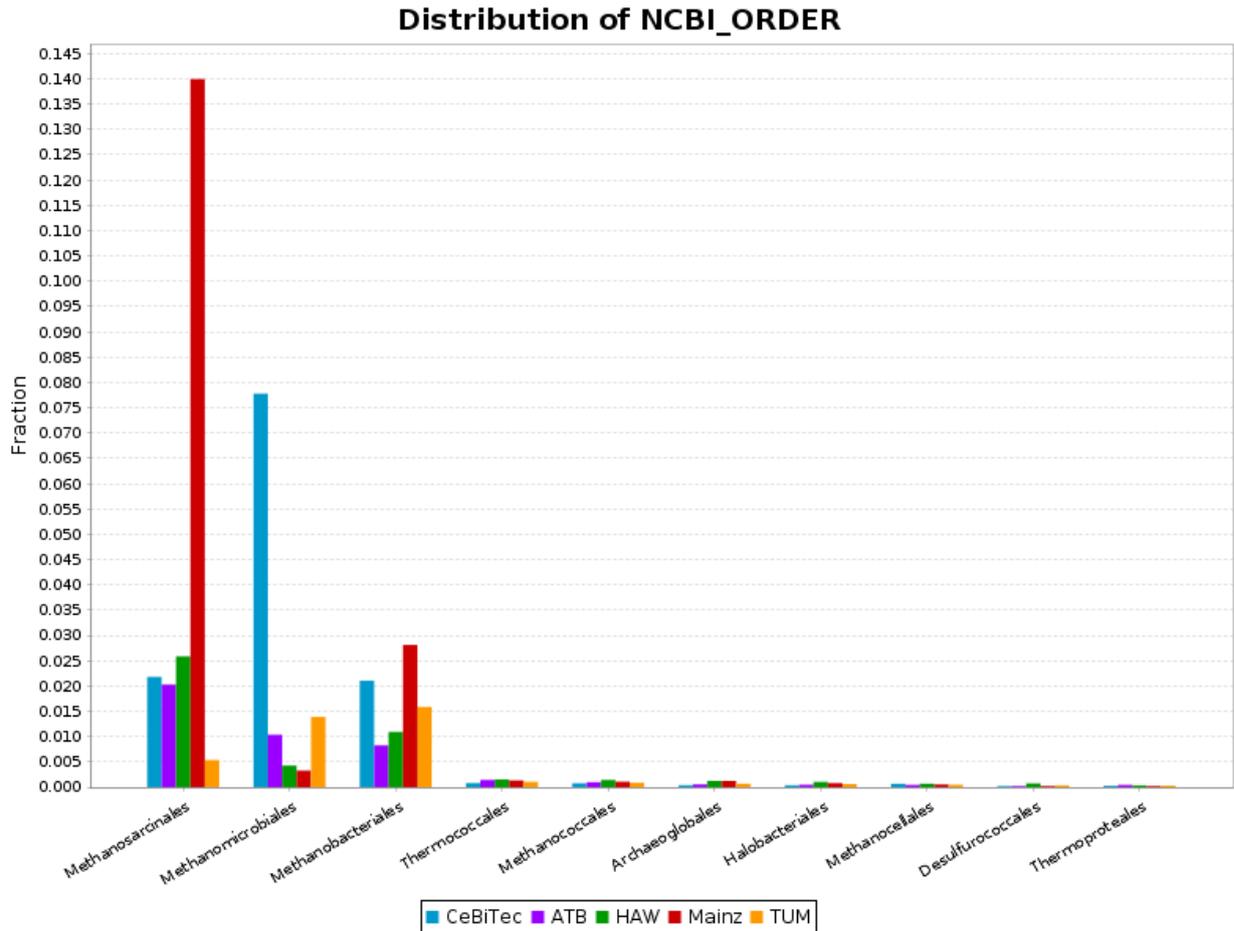
## 9.5 Metagenom der thermophilen Biogasanlage Viersen

### 9.5.1 Darstellung der Metagenomanalyse in Balkendiagrammen

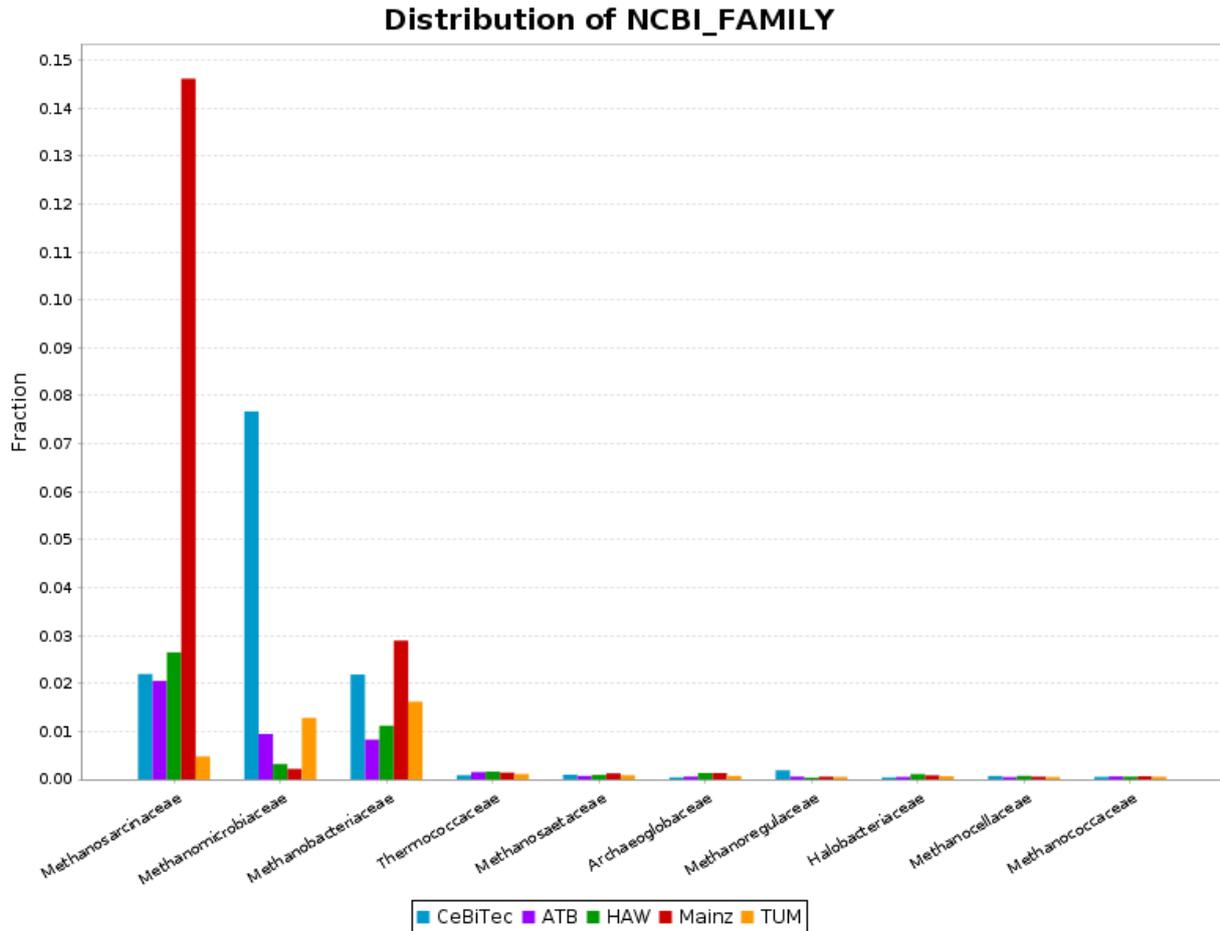
Im Folgenden sind die einzelnen Taxa der Metagenom-Analyse der Biogasanlage Viersen in den **Abbildungen 25 bis 29** dargestellt. Diese Abbildungen wurden von Irena Maus aus der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Schlüter am CeBiTec (Universität Bielefeld) angefertigt und zur Verfügung gestellt. Geordnet sind die Abbildungen nach der Reihenfolge der taxonomischen Klassifizierung: Klasse, Ordnung, Familie und Gattung.



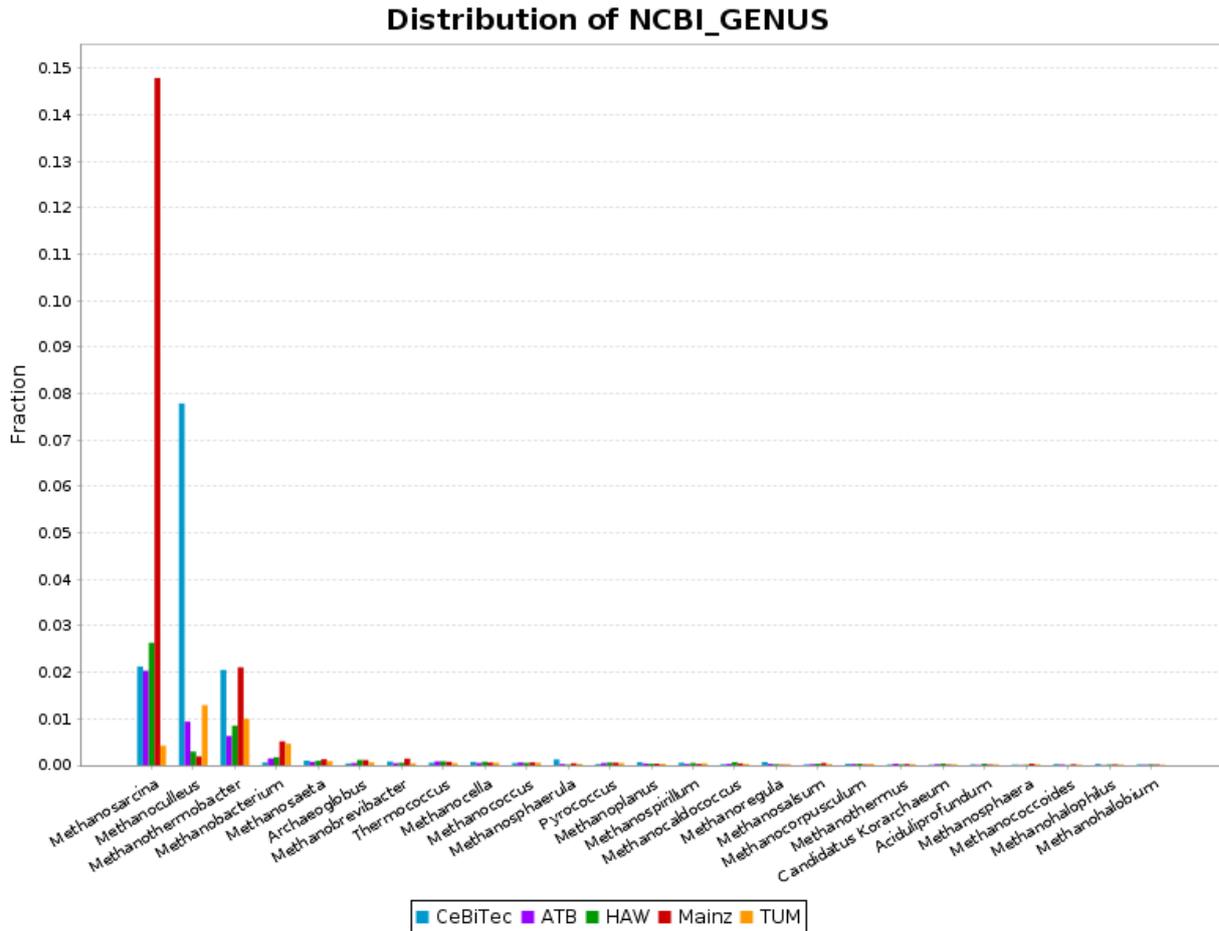
**Abbildung 25:** Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf **Klassen-Ebene**. Vergleich der Häufigkeit detektierter Klassen resultierend aus den fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. Mit abnehmender Häufigkeit traten folgende Klassen an Archaeen auf: *Methanomicrobia* und *Methanobacteria*, dann deutlich weniger *Thermococci*, *Methanococci*, *Thermoprotei*, *Archaeoglobi*, *Halobacteria*, *Thermoplasmata* und *Methanopyri*.



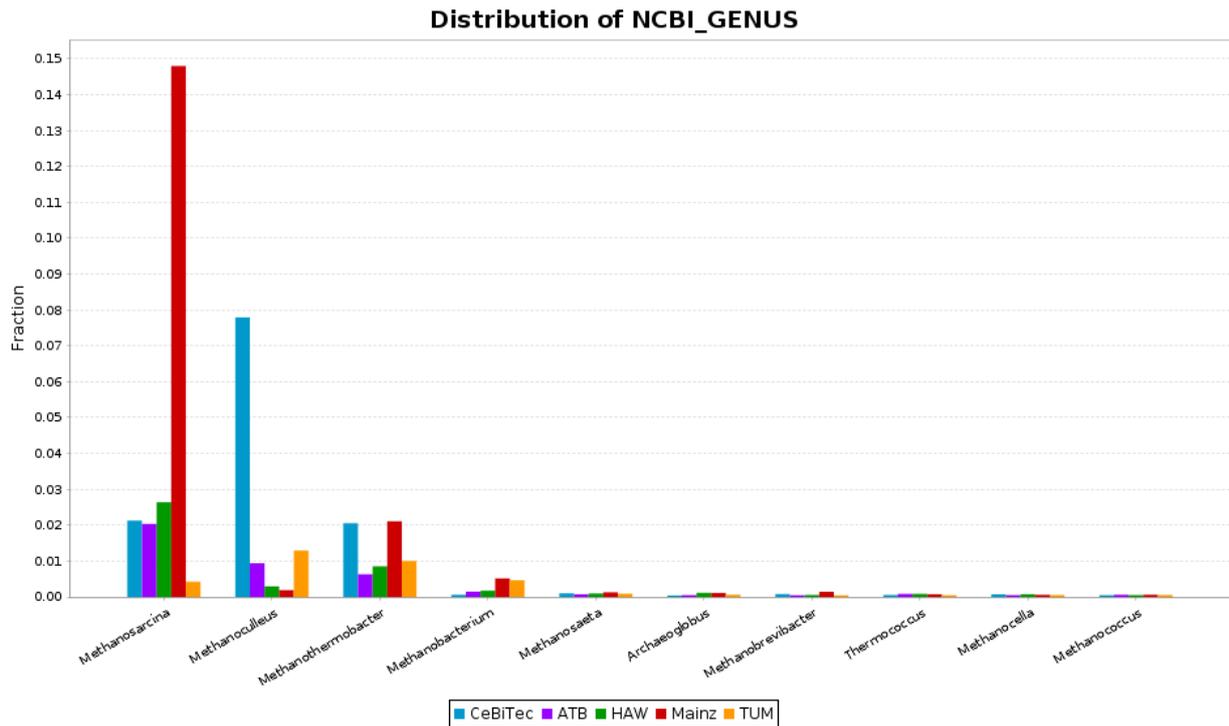
**Abbildung 26:** Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf **Ordnungs-Ebene**. Vergleich der Häufigkeit detektierter Ordnungen resultierend aus den fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. Mit abnehmender Häufigkeit traten folgende Ordnungen an Archaeen auf: *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* und *Methanobacteriales*, dann weit weniger *Thermococcales*, *Methanococcales*, *Archaeoglobales*, *Halobacteriales*, *Methanocellales*, *Desulfococcales* und *Thermoproteales*.



**Abbildung 27:** Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf **Familien-Ebene**. Vergleich der Häufigkeit detektierter Familien resultierend aus den fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. Mit abnehmender Häufigkeit traten folgende Familien an Archaeen auf: *Methanosarcinaceae*, *Methanomicrobiaceae* und *Methanobacteriaceae*, dann weitaus weniger *Thermococcaceae*, *Methanosaetaceae*, *Archaeoglobaceae*, *Methanoregulaceae*, *Halobacteriaceae*, *Methanocellaceae* und *Methanococcaceae*.



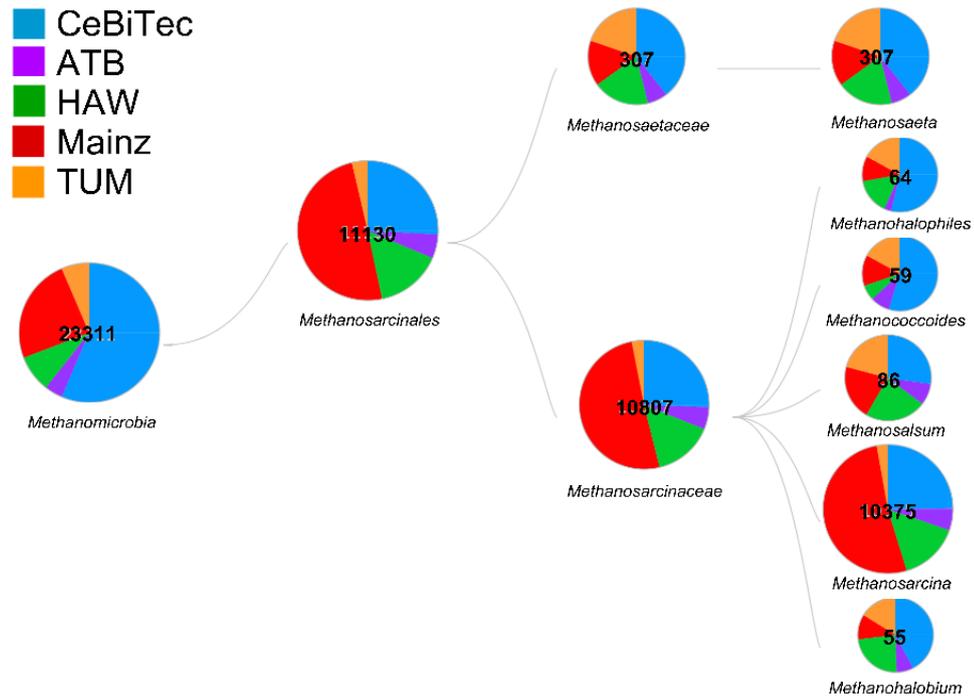
**Abbildung 28:** Prominente Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf **Gattungsebene**. Vergleich der Häufigkeit detektierter Gattungen resultierend aus den fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. Mit abnehmender Häufigkeit traten folgende Gattungen an Archaeen auf: *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanothermobacter* und *Methanobacterium*, dann deutlich weniger *Methanosarcina*, *Archaeoglobus*, *Methanobrevibacter*, *Thermococcus*, *Methanocella*, *Methanococcus*, *Methanosphaerula*, *Pyrococcus*, *Methanoplanus*, *Methanospirillum*, *Methanocaldococcus*, *Methanoregula*, *Methanosalsum*, *Methanocorpusculum*, *Methanothermus*, *Candidatus Korarchaeum*, *Acidilipifundum*, *Methanosphaera*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus* und *Methanohalobium*.



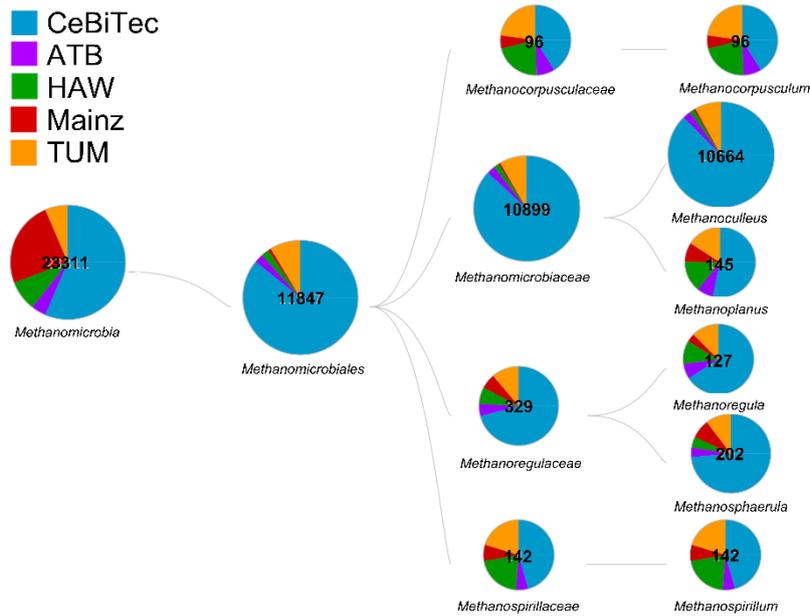
**Abbildung 29:** Die **Top-Ten** Taxa der archiellen Gemeinschaft der untersuchten Biogas-Produktionsanlage Viersen auf **Gattungs-Ebene**. Vergleich der Häufigkeit detektierter Gattungen resultierend aus den fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden. Mit abnehmender Häufigkeit traten die Top-Ten der detektierten Gattungen der Archaeen auf: *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanothermobacter*, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Archaeoglobus*, *Methanobrevibacter*, *Thermococcus*, *Methanocella* und *Methanococcus*.

### 9.5.2 Darstellung der Metagenomanalyse in Tortendiagrammen

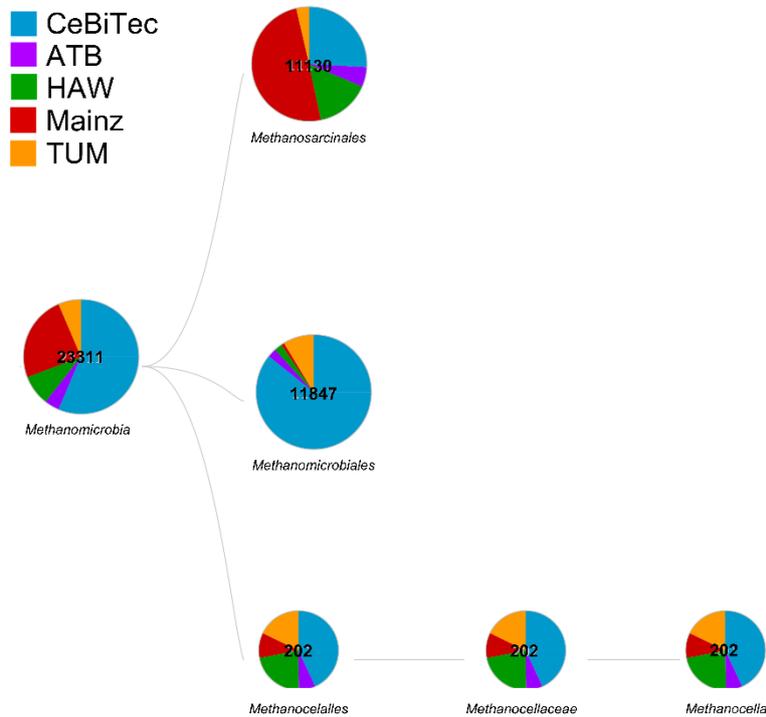
Hauptsächlich für interne Zwecke sind die Metagenomanalysen im Folgenden als Tortendiagramme mit einer anderen Aufteilung und der Readanzahl dargestellt. Auch diese wurden von Irena Maus aus der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Schlüter am CeBiTec (Universität Bielefeld) angefertigt und zur Verfügung gestellt.



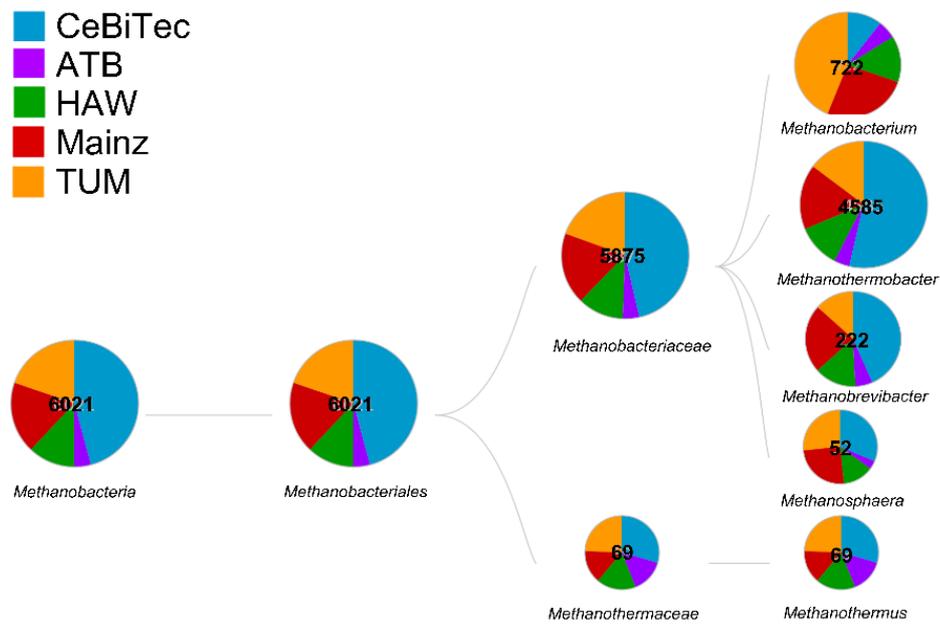
**Abbildung 30:** Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Methanomicrobia* mit der Ordnung *Methanosarcinales*. *Methanosarcinales* setzen sich zusammen aus *Methanosaetaceae* mit der einzigen Gattung *Methanosaeta* und aus *Methanosarcinaceae* mit der am häufigsten vorkommenden Gattung *Methanosarcina* sowie vier weiteren wenig abundanten Gattungen.



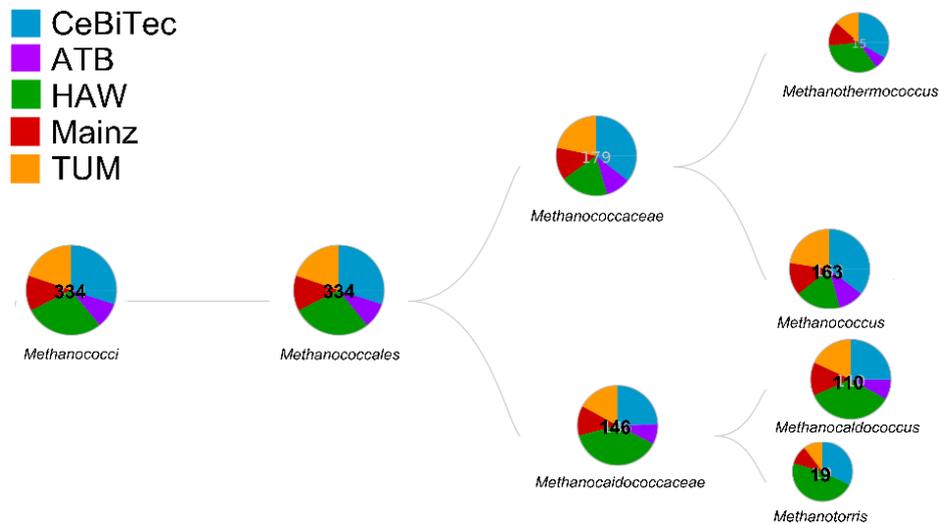
**Abbildung 31:** Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Methanomicria* mit der Ordnung *Methanomicribiales*. *Methanomicribiales* setzen sich aus der Familie *Methanomicrobiaceae* und drei wenig abundanten Familien zusammen. Bei den *Methanomicrobiaceae* dominiert die Gattung *Methanoculleus*.



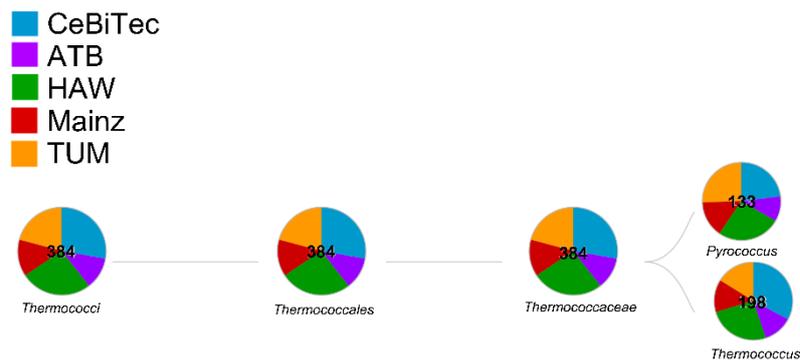
**Abbildung 32:** Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Methanomicria* mit der Ordnung *Methanocellales* und der Familie *Methanocellaceae*. Als einzige Gattung dieser wenig vorkommenden phylogenetischen Linie konnte *Methanocella* in geringer Anzahl nachgewiesen werden.



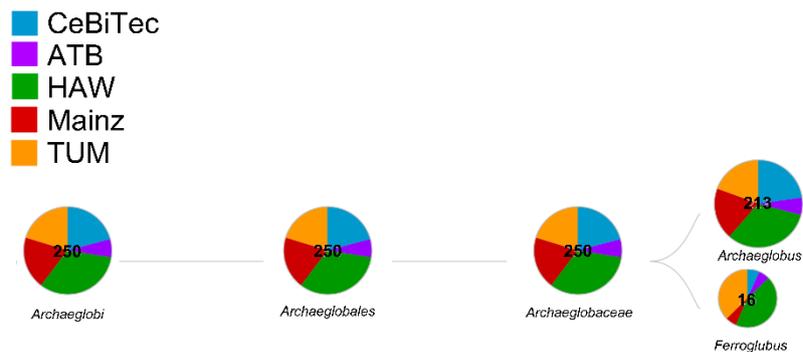
**Abbildung 33:** Darstellung der Zusammensetzung methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Methanobacteria* mit der Ordnung *Methanobacteriales*. *Methanobacteriales* setzen sich aus der Familie *Methanobacteriaceae* und einer weiteren wenig vorkommenden Familie zusammen. Bei den *Methanobacteriaceae* dominiert die Gattung *Methanothermobacter*.



**Abbildung 34:** Darstellung der Zusammensetzung wenig vorkommender methanogener Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Methanococci* mit der Ordnung *Methanococcales*. *Methanococcales* setzen sich aus den beiden Familie *Methanococcaceae* mit der dominierenden Gattung *Methanococcus* und *Methanocaldococcaceae* mit der am häufigsten detektierten Gattung *Methanocaldococcus* zusammen.



**Abbildung 35:** Darstellung der Zusammensetzung wenig redundanter Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Thermococci* mit der Ordnung *Thermococcales* und der Familie *Thermococcaceae*. *Thermococcaceae* setzt sich aus den beiden Gattungen *Pyrococcus* und *Thermococcus* zusammen.



**Abbildung 36:** Darstellung der Zusammensetzung wenig redundanter Archaeen der Biogasanlage Viersen der Klasse *Archaeoglobi* mit der Ordnung *Archaeoglobales* und der Familie *Archaeoglobaceae*. Bei der phylogenetischen Linie der *Archaeoglobi* dominiert eindeutig die Gattung *Archaeoglobus*.

## Danksagung

Für die gute Zusammenarbeit und besonders für die zahlreichen chemischen Analysen möchten wir Herrn Nils Scharfenberg und Herrn Dr. Christian Rösner danken. Für die Unterstützung im Labor danken wir herzlich Frau Monika Unbehauen. Für die tatkräftige Mithilfe bei der Kultivierung und einigen Versuchen bedanken wir uns bei Frau Magdalena Rogalla und Herrn Mark Goldenthal. Auch der Doktorand Dipl. Ing. (FH) Sebastian Antonczyk stand immer wieder bei technischen Problemen mit Rat und Tat bereitwillig zur Seite. Nicht zuletzt gilt unser Dank Herrn Franz-Josef Butschen, dem Betreiber und Besitzer der untersuchten Referenz-Biogasanlage in Viersen, der uns immer bereitwillig alle technischen Details und Daten der Anlage zur Verfügung stellte.

# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema: **Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen**  
**Teilvorhaben 5: Hydrolytische Bakterien**

Förderkennzeichen: 22007012

Zuwendungsempfänger: Technische Universität München  
Lehrstuhl für Mikrobiologie  
Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising-Weihenstephan

Berichtverfasser: Dr. Daniela Köck  
Dr. Wolfgang H. Schwarz  
Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Kontakt: Prof. Dr. Wolfgang Liebl  
Tel.: 08161/71-5450, Fax: 08161/71-5475  
Email: [wliebl@wzw.tum.de](mailto:wliebl@wzw.tum.de)

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Ziele.....</b>	<b>337</b>
<b>1</b>	<b>Aufgabenstellung und Zusammenfassung.....</b>	<b>338</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Technik.....</b>	<b>339</b>
<b>3</b>	<b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....</b>	<b>344</b>
<b>II</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>345</b>
<b>1</b>	<b>Erzielte Ergebnisse .....</b>	<b>345</b>
1.1	Arbeitspaket 1: .....	345
1.1.1	Auswahl repräsentativer Biogasanlagen und Probenahme durch die Projektpartner.....	345
1.1.2	Vorarbeiten .....	346
1.1.3	Isolierung von <i>Clostridium thermocellum</i> .....	349
1.1.4	Genotypisierung verschiedener <i>Clostridium thermocellum</i> Isolate .....	350
1.1.5	SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der Spektren unter- schiedlicher <i>Clostridium thermocellum</i> Isolate.....	355
1.1.6	Physiologische Unterschiede der <i>Clostridium thermocellum</i> Isolate aus unterschiedlichen Biogasanlagen .....	357
1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse von Arbeitspaket 1 .....	361
1.3	Arbeitspaket 2: .....	363
1.3.1	Auswahl eines thermophilen Modellfermenters .....	363
1.3.2	Auswahl eines mesophilen Modellfermenters.....	364
1.3.3	Entwicklung von Isolierungsstrategien für cellulolytische und acido- gene Bakterien .....	364
1.3.4	Thermophile Isolate .....	367
1.3.5	Charakterisierung ausgewählter thermophiler Isolate.....	371
1.3.6	Hochdurchsatz Identifizierung von Isolaten mittels MALDI-TOS MS (RIPAC).....	388
1.3.7	Isolate aus der mesophilen Biogasanlage Pellmeyer (T3).....	390
1.3.8	Charakterisierung ausgewählter mesophiler Isolate .....	393
1.3.9	„ <i>In sacco</i> “ Versuche.....	397
1.3.10	Charakterisierung ausgewählter „ <i>in sacco</i> “ Isolate .....	399
1.3.11	Amplikonsequenzierung der „ <i>in sacco</i> “ Anreicherung.....	402
1.3.12	Schlussfolgerungen .....	410
1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse von Arbeitspaket 2.....	411
<b>2</b>	<b>Verwertung .....</b>	<b>414</b>
<b>3</b>	<b>Erkenntnisse von Dritten.....</b>	<b>416</b>
<b>4</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>416</b>

## I Ziele

Für ein vertieftes Verständnis der Hydrolyse lignocellulose-reicher Biomasse ist es unerlässlich, bei weitem verbesserte Kenntnisse über cellulolytische Bakterien und deren Kultivierungs-Anforderungen zu gewinnen, um damit eine Effizienzsteigerung der Biogasproduktion in Biogasanlagen zu erreichen. Mehrere Forschungsarbeiten beschäftigten sich bisher mit der Bakterienzusammensetzung in Biogasanlagen; trotzdem muss die Biogas-Mikrobiologie im Allgemeinen noch als „*black box*“ bezeichnet werden (CIRNE *et al.* 2007, ZIGANSHIN *et al.* 2013). Metagenom-Analysen lieferten zwar einen Überblick über die taxonomische Zusammensetzung, konnten aber das Artspektrum aufgrund von fehlenden Referenzdaten nicht bis in eine ausreichende, aussagekräftige Tiefe auflösen. Da der überwiegende Anteil der am Biomasseabbau beteiligten Mikroben-Gemeinschaft aus dem Phylum Firmicutes stammt, sind die Einzelsequenzen zwar verschiedenen Ursprungs, aber durch die hohe Sequenzähnlichkeit schwer abzugrenzen und zuzuordnen. Zudem ist die große Anzahl von Sequenzen aus bisher unbekanntarten keiner Funktion zuzuordnen. Auch gibt der Nachweis des Vorkommens einer Art allein noch keinen Aufschluss über deren aktive Rolle bzw. Bedeutung bei der Substratumsetzung. Um tatsächlich die Schlüsselorganismen für den Abbau zu identifizieren und deren Wege zur Substratumsetzung bis hin zum Methan aufzuklären, muss das gesamte zur Verfügung stehende Methodenspektrum zur Identifikation der beteiligten Bakterien ausgenutzt werden. Eine Kombination von klassischer Stammissolierung, Charakterisierung und anschließender Genomsequenzierung mit Metagenom- und Metatranskriptom-Analysen ist ein dabei vielversprechender Ansatz.

**Zu Beginn der Projektlaufzeit wurden in einem gemeinsamen Auftakt-Workshop zwei zentrale Arbeitspakete formuliert:**

**Arbeitspaket 1:** Ermittlung der genetischen Variation einer für den anaeroben Abbau wichtigen, eng definierten Gruppe von Mikroorganismen.

**Arbeitspaket 2:** Isolierung möglichst vieler Arten/Stämme aus einer thermophilen und einer mesophilen Modellbiogasanlage, um die Diversität der Mikroorganismen im Biogasprozess für jede Art von Abbauleistung abzubilden. Die gewonnenen Isolate bilden die Basis für weitere molekulargenetische Untersuchungen zur Bereitstellung von Referenzdaten für die Interpretation von kulturunabhängigen Analysen (z.B. Metagenomanalysen).

## 1 Aufgabenstellung und Zusammenfassung

Das BIOGAS-CORE Verbundvorhaben widmete sich der Frage, welche Mikroorganismen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen am anaeroben Abbau organischer, hier insbesondere pflanzlicher Biomasse zu Biogas beteiligt sind. Aufgrund der mangelhaften Verfügbarkeit von Referenzdaten war die umfassende Auswertung von Daten aus Metagenomanalysen zu Beginn des Projektes nicht möglich. Hierzu musste die klassische mikrobiologische Forschung verstärkt werden. Für jede Art von Abbauleistung sollten Referenzorganismen aus Biogasanlagen isoliert und charakterisiert werden. Grundsätzlich muss für jede neu identifizierte Art das Genom vollständig sequenziert werden. Die Kenntnis der Stoffwechseleigenschaften der jeweiligen Mikroorganismen *in vivo* in Verbindung mit den hierfür zugrunde liegenden genetischen Daten schafft erst die Basis zur Interpretation von kulturunabhängigen Analysen von Biogasreaktoren. Zu Beginn des Vorhabens wurden für alle Verbundpartner drei zentrale Arbeitsziele definiert:

- Beprobung der Praxisanlagen
- Entwicklung und Anreicherung von Isolaten
- Genomsequenzierung und Entwicklung eines *core*-Mikrobioms

Innerhalb des Verbundes sollten von Seiten der TUM vor allem Isolate hydrolytischer Bakterien gewonnen werden und neue Verfahren zur Isolierung hydrolytischer Mikroorganismen etabliert werden. Dazu wurden zunächst verschiedene Strategien und Techniken zur Isolierung neuer Bakterienstämme entwickelt und getestet. Hierzu wurde unter anderem die sogenannte „*in sacco*“-Methode zur direkten Anreicherung von cellulolytischen Bakterien in Laborfermentern entwickelt. Zusätzlich wurde eine Metagenom-Analyse von einer Probe aus dem thermophilen Reaktor durchgeführt, welche zeigte, dass die bakteriellen Phyla Firmicutes, Thermotogae und Bacteroidetes die Biogas-Community dominieren. Cellulolytische Bakterien konnten jedoch nur aus dem Phylum Firmicutes isoliert werden. Besonders solche neuen Isolate lieferten neue Genomdaten und damit auch den Zugang zu neuartigen Lignocellulose-abbauenden Enzymen für verschiedene industrielle Anwendungen. Ein Isolat aus jeder bisher unbekanntem Gruppe wurde für weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften und der cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzym-Systeme ausgewählt. Zudem wurden diese Isolate an das CeBiTec zur Genomsequenzierung und zur Einpflege der Genomsequenzen in die NCBI-Referenzdatenbank geschickt.

Im Rahmen der Isolierungen wurden in dieser Studie erstmals eine große Zahl neuer *C. thermocellum* Stämme aus verschiedenen Biogasanlagen isoliert und die genetische und phänotypische Variation zwischen den Stämmen bestimmt. Ferner wurden verschiedene Genotypisierungsmethoden für *C. thermocellum*-Isolate evaluiert. Ein neuer Genotypisierungsansatz, die Amplifikation einer unbekanntem Zielsequenz zwischen den Kopien eines mobilen Elements (IS1447), war das Genotypisierungsverfahren mit der höchsten Trennschärfe, bei dem jede Biogasanlage ein unterschiedliches Bandenmuster ergab. Unabhängig davon, welche Methode zur Genotypisierung gewählt wurde,

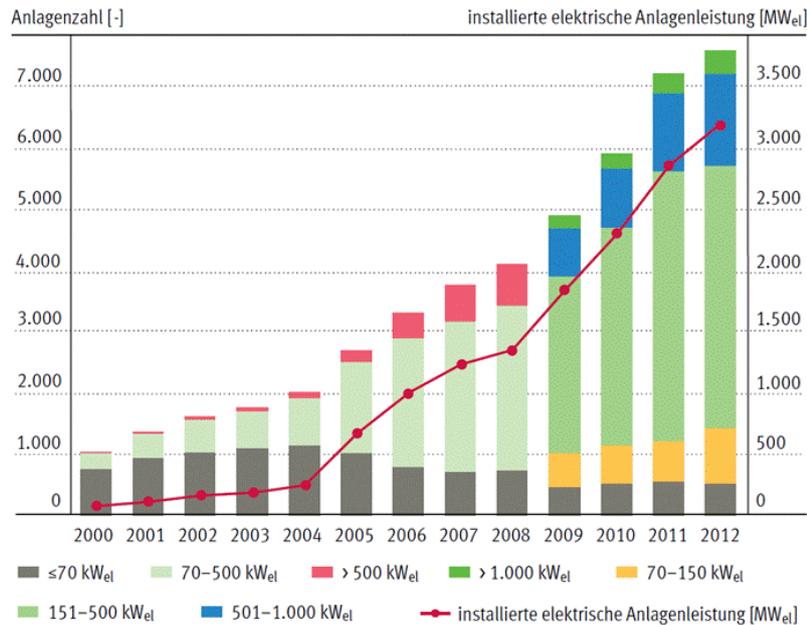
zeigten alle Isolate jeder einzelnen Biogasanlage immer ein identisches Bandenmuster. Es kann daher gefolgert werden, dass in jeder Biogasanlage ein optimal angepasster Stamm von *C. thermocellum* zu dominieren scheint.

Die physiologische Charakterisierung der Isolate spiegelt diese Ergebnisse wieder. In den meisten Fällen konnten zwei unabhängig gewonnene Isolate aus einer Biogasanlage die gleichen Substrate verstoffwechseln und zeigten ähnliche spezifische Cellulase-Aktivitäten. Auf der anderen Seite unterscheiden sich Stämme aus verschiedenen Biogasanlagen in ihrem Genotypisierungsmuster und den physiologischen Eigenschaften.

## 2 Stand der Technik

Heutzutage werden immer noch etwa 80% des globalen Energiebedarfs aus der Verbrennung fossiler Energieträger gewonnen. Der weltweite Energiebedarf wird in diesem Jahrhundert noch um das Zwei- bis Dreifache ansteigen. Ohne Gegenmaßnahmen wird dies in Zukunft durch die Anreicherung von CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre zu drastischen klimatischen Veränderungen führen. In diesem Kontext wächst das Interesse an der Bereitstellung von Energie aus nachwachsenden Rohstoffen, die fossile Brennstoffe zum größten Teil ersetzen können (KAZAMIA & SMITH 2014). Die Biogas-Erzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen ist derzeit die attraktivste Technologie für eine nachhaltige und Kohlenstoffdioxid-neutrale Energieproduktion mit dem höchsten Energieertrag pro Hektar verglichen mit anderen Pflanzen basierten Bioenergiequellen (ANTONI *et al.* 2007, WEILAND 2006).

Auch die energie- und umweltpolitischen Diskussionen in Deutschland werden maßgeblich durch die energiebedingten Umweltauswirkungen mitbestimmt (FNR 2013). Seit Inkrafttreten des Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) in Jahr 2000 hat die Erzeugung und Nutzung von Biogas erheblich zugenommen (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Entwicklung der Biogasanlagen in Deutschland – Anzahl der Anlagen differenziert nach Leistungsklassen und installierter elektrischer Anlagenleistung MW<sub>el</sub> ohne Biogasaufbereitungsanlagen, Deponie- und Klärgasanlagen (FNR 2013)

Das primäre Ziel von Biogasanlagen ist es, organische Substanz, darunter zunehmend Cellulose haltige Biomasse, unter anaeroben Bedingungen mikrobiell zu einem überwiegend methanhaltigen Gas abzubauen. Dieser natürliche Abbauprozess ist weitverbreitet und findet z.B. auch in Flüssen, Seen, Sumpfen, Mooren, schlecht durchlüfteten Böden, sowie in Klärgruben statt. Abhängig von der Substratzusammensetzung und dem Fermentationsverfahren besteht das gebildete Gasgemisch überwiegend aus Methan (50-75 Vol-%) und Kohlendioxid (FNR 2013). Aus dem im Biogas enthaltenen Methan wird durch kontrollierte Verbrennung in Blockheizkraftwerken (BHKWs) elektrische und thermische Energie erzeugt (GÖRISCH & HELM 2006). Der gesamte Abbauprozess im Biogasfermenter besteht im Wesentlichen aus vier Stufen, in denen jeweils unterschiedliche Bakteriengruppen aktiv sind.

In der ersten Stufe, der „**Hydrolyse**“, bauen in erster Linie hydrolytische Bakterien die eingespeisten hochmolekularen, organischen Substanzen (Proteine, Kohlenhydrate, Fette) mit Hilfe hydrolytischer Exoenzyme zu niedermolekularen Aminosäuren, Zuckern und Fettsäuren ab. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse ist dabei von der Aktivität der extrazellulären Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pectinasen, Amylasen, Proteasen, Xylanasen oder Lipasen abhängig (EDER & SCHULZ 2007). Bei mikrobiell schwer abbaubaren Stoffen (wie Cellulose) ist dieser Schritt im Gesamtprozess geschwindigkeitsbestimmend und daher für die Effizienz von Substratabbau und Biogasbildung von ganz besonderer Bedeutung; Clostridien sind in dieser ersten Stufe dann die dominierenden Organismen (GÖRISCH & HELM 2006). Sie verwenden die gebildeten Stoffe zum Teil selbst und stellen sie zum Teil anderen Mikroorganismen zur Verfügung.

Die durch die hydrolytischen Bakterien in ihrem Stoffwechsel gebildeten Zwischenprodukte werden in der zweiten Phase, der sogenannten „**Acidogenese**“ oder Fermentation, durch säurebildende Mikroorganismen in kurzkettige Carbonsäuren (z.B. Butter-, Essig-, Ameisen-, Propionsäure), niedermolekulare Alkohole, Wasserstoff, CO<sub>2</sub> und Wasser umgewandelt. Dabei wird der pH-Wert abgesenkt und der noch vorhandene Sauerstoff vollständig verbraucht. Dadurch werden die anaeroben Bedingungen für die methanogenen Archaeen sichergestellt (FNR 2013).

Durch weitere biochemische Umsetzungen produzieren acetogene Bakterien aus den genannten Stoffen hauptsächlich Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als Ausgangsprodukte für die anschließende Methanbildung. Dieser Vorgang wird auch als „**Acetogenese**“ bezeichnet. Diese Wasserstoff bildenden Bakterien sind sehr temperaturempfindlich (EDER & SCHULZ 2007). Der Abbau von Butter- und Propionsäure zu Essigsäure ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende und thermodynamisch schwierigste Schritt des Gesamtabbaus. Ein zu hoher Wasserstoffpartialdruck verhindert aus thermodynamischen Gründen die Umsetzung und führt zur Anreicherung der organischen Säuren, wodurch wiederum die Methanbildung gehemmt wird (STAMS *et al.* 1993).

Im letzten Schritt der Biogasbildung, der „**Methanogenese**“, werden vor allem Essigsäure sowie Wasserstoff und Kohlendioxid von strikt anaeroben methanogenen Archaeen zu Methan umgewandelt. Man unterscheidet zwischen hydrogenotrophen Methanogenen, welche aus Wasserstoff und Kohlendioxid Methan produzieren, und acetoclastischen Methanogenen, welche durch Essigsäurespaltung Methan bilden. Unter den in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorherrschenden Bedingungen erfolgt die Methanbildung bei höheren Raumbelastungen vorwiegend über den Wasserstoff verwertenden Reaktionsweg und nur bei relativ geringer Raumbelastung über den Essigsäure spaltenden Reaktionsweg (BAUER *et al.* 2008).

Während die fermentativen Prozesse durch eine Reihe verschiedener Bakterien hauptsächlich aus den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes, aber auch durch Proteobacteria umgesetzt werden, besitzen nur Archaeen des Phylums Euryarchaeota die notwendige enzymatische Ausstattung zur Methanogenese. Jeder der Schritte von der Biomasse bis zum Biogas kann im Prozess ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt sein und sollte analysiert werden.

Zur spezifischen Detektion von Mikroorganismen stehen generell drei alternative Analyseverfahren zur Verfügung: der Nachweis der Mikroorganismen *in situ*, die Kultivierung der Mikroorganismen mittels spezieller Nähr- und Selektionsmedien und der kulturunabhängige Nachweis der Mikroorganismen auf Basis artspezifischer Moleküle. Die gewonnenen Isolate können durch spezifische genetische Marker, z.B. 16S rRNA Gene oder alternativ auch auf Basis der Erzeugung spezifischer Zellproteinprofile mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden. Mit unterschiedlichen PCR basierten Genotypisierungsmethoden können auch einzelne Stämme einer Art voneinander differenziert werden (BRAZIER 2001). Trotz einer Reihe von Studien muss die Biogas-Mikrobiologie im

Allgemeinen noch als „*black box*“, also als weitestgehend unbekannter Mikrokosmos angesehen werden (CIRNE *et al.* 2007, ZIGANSHIN *et al.* 2013). Deshalb wird die Aufklärung der mikrobiellen Zusammenhänge allgemein als Schlüssel für die weitere verfahrenstechnische Optimierung der Biogasfermentation betrachtet (WIETSCHER *et al.* 2010). Die mikrobiologische Analytik wird jedoch dadurch erschwert, dass die Mikrobengemeinschaft aus hunderten der unterschiedlichsten Arten von Mikroorganismen besteht, welche aufgrund der anaeroben Lebensweise und syntropher bzw. symbiotischer Wechselbeziehungen häufig (noch) nicht oder nur schwer kultivierbar sind. Viele Arten sind bislang weder taxonomisch noch physiologisch beschrieben.

In den letzten Jahren konnten durch verschiedene kulturunabhängige Hochdurchsatzverfahren in der mikrobiologischen Analytik technologische Durchbrüche erzielt werden, welche es möglich erscheinen lassen, die „*black box*“ der Biogas-Mikrobiologie allmählich zu entschlüsseln. Hierzu zählen insbesondere sog. OMIK-Technologien, wie Genomik (Analyse des gesamten Erbguts einer Zelle), Transkriptomik (Analyse der exprimierten Gene einer Zelle), Proteomik (Analyse der Proteine in einer Zelle) und Metabolomik (Analyse des Stoffwechsels einer Zelle). Alle diese Technologien können mit allerdings sehr viel größerem Aufwand auch auf Bakteriengemeinschaften angewendet werden (Meta-Techniken). Mit der Entwicklung neuer Sequenzierungstechnologien können ganze Metagenome mikrobieller Gemeinschaften schnell und kostengünstig entschlüsselt werden (KRAUSE *et al.* 2008, RADEMACHER *et al.* 2012, SCHLUTER *et al.* 2008, ZAKRZEWSKI *et al.* 2013). Aufgrund mangelnder Referenzsequenzen von bereits beschriebenen Spezies und der hohen Anzahl an noch nicht beschriebenen Spezies, sowie der relativ kurzen DNA-Fragmentlängen sind die hiermit erhaltenen Datenmengen bislang jedoch nur ansatzweise auswertbar.

Im Rahmen der BMBF/PtJ geförderten Vorhaben FABES (03SF0346B) und BiogasPlusProjekt (03SF0349C) wurden in Zusammenarbeit von ATB und CeBiTec mehrere Metagenom-Analysen von Biogasfermentationen durchgeführt. Bislang resultierten aus diesen Arbeiten DNA-Sequenzinformationen im Umfang von 441 Mio. Basenpaaren (Mb) verteilt auf 1,1 Mio. DNA-Stücken (*environmental gene tags*, EGTs). Ein großer Anteil dieser Sequenzen (ca. 40 – 50%) ist bislang jedoch nicht interpretierbar, da in den verfügbaren Datenbanken keine vergleichbaren (bekannten) DNA-Sequenzen hinterlegt sind. Ein weiterer Teil dieser Sequenzen kann nur „ungenau“ bestimmten taxonomischen Gruppen und metabolischen Funktionen zugeordnet werden, da sie größere Unterschiede zu den verfügbaren Referenzsequenzen aufweisen. Eine Ursache hierfür liegt darin begründet, dass bislang nur wenige Mikroorganismen aus Biogasanlagen isoliert und mikro- bzw. molekularbiologisch charakterisiert worden sind. Wesentlich häufiger finden sich in den Datenbanken Informationen von Mikroorganismen aus natürlichen, teilweise extremen Lebensräumen.

Aktuelle Schätzungen gehen aufgrund kulturunabhängiger Methoden davon aus, dass 61 bakterielle Phyla existieren, von denen 31 nicht kultiviert werden können (VARTOUKIAN *et al.* 2010). Nach bisherigem Wissensstand ist es nicht möglich, die natür-

lichen Wachstumsbedingungen für alle Mikroorganismen bereit zu stellen. Mit künstlichen Medien schafft man es im Labor meist nicht, die abiotischen und biotischen Bedingungen, die ein bestimmtes Bakterium zu seinem Wachstum im Labor benötigt, exakt nachzustellen. Auch können sich Mikroorganismen oft nicht schnell genug an veränderte Bedingungen anpassen (ALAIN & QUERELLOU 2009). Dennoch wurden in den letzten 25 Jahren große Fortschritte bei der Entwicklung neuer Kultivierungstechniken erzielt, welche enorm zu einem besseren Verständnis der mikrobiellen Diversität beitragen.

Folgende Ansätze wurden dabei verfolgt: (i) verbesserte Medien, (ii) Veränderung der Wachstumsbedingungen, (iii) Kokultivierung, (iv) Einsatz von Transwellplatten mit Membranen, (v) optische Pinzetten und Mikromanipulatoren, (vi) Hochdurchsatz-Mikrobioreaktoren, (vii) Diffusionskammern, um das natürliche Milieu zu simulieren, und vieles mehr (KAEBERLEIN *et al.* 2002, PHAM & KIM 2012). Die Gewinnung neuer Isolate hilft zu verstehen, welche Typen von Bakterien existieren, und deren Rolle in der Umwelt aufzuklären. Dies eröffnet neue Einblicke in die ökologische Bedeutung einer Bakterienart für die stoffliche Umsetzung von Biomasse und deren potentielle Anwendung für industrielle Anforderungen. Besonders die vielfältigen Anwendungsbereiche neuer Isolate rechtfertigen eine stetige Weiterentwicklung der Kultivierungsmethoden und den (doch erheblichen) Aufwand für die Isolierung neuer Arten und deren Charakterisierung. Zur Erreichung dieser Ziele ist ein umfassendes Verständnis der chemischen, physikalischen und biologischen Prozesse des Milieus erforderlich, in dem die Bakterien leben. Dieses Wissen muss dann in den entsprechenden Kultivierungsansatz einfließen. Die Hauptaufgabe für eine erfolgreiche Kultivierung ist die möglichst exakte Nachstellung des natürlichen Systems (PHAM & KIM 2012).

Das Isolieren von Bakterien aus natürlichen (und nicht menschlichen oder tierischen) Habitaten ist nicht trivial. Für eine erfolgreiche Kultivierung einzelner Mikroorganismen ist es erforderlich, die Kultivierungsbedingungen mit der Einstellung unterschiedlicher Parameter (Kultivierungsmedium, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und andere) optimal und vor allem spezifisch an die Bedürfnisse des jeweiligen Zielorganismus anzupassen. Die Entwicklung angepasster und spezifischer Kultivierungsmedien ist aber ein zeitaufwendiger Prozess, der darüber hinaus für jede Organismengruppe von Neuem wiederholt werden muss. Bei der meist initial vorgenommenen Anreicherung von Bakterien kommt es außerdem oft zu einer Verschiebung der Populationszusammensetzung. Dadurch werden Organismen, die auf dem eingesetzten Kultivierungsmedium schnell wachsen können, häufiger isoliert als langsam wachsende Organismen, auch wenn die langsam wachsenden Organismen zahlenmäßig häufiger in der Ausgangspopulation vertreten waren. Eine allein auf der Kultivierung mit Standardmedien beruhende Beschreibung der Biozönose ist also limitiert und repräsentiert nicht die tatsächlichen Verhältnisse im untersuchten mikrobiologischen Habitat (WENZEL 2002).

Eine weitere Herausforderung stellt die Reinigung eines neuen Isolates von allen Kontaminationen dar, die u.U. (unbewusst) gezielt mitisoliert wurden. Liegt das Isolat in

Reinkultur vor, kann es zunächst anhand seiner 16S rRNA Gensequenz taxonomisch eingeordnet werden. Für die genaue Zuordnung zu einem Taxon muss beachtet werden, dass zwei Stämme, die weniger als 97% Sequenzähnlichkeit im 16S rRNA Gen aufweisen, nicht derselben Art zugeordnet werden können. Sequenzähnlichkeiten unter 95% weisen auf unterschiedliche Gattungen hin (TINDALL *et al.* 2010). Zu ihrer Charakterisierung müssen andere Merkmale, wie zum Beispiel die Physiologie der Organismen sowie andere definierte Merkmale, herangezogen werden.

### 3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

#### RIPAC GmbH:

- MALDI-TOF MS zur Analyse von isolierten Bakterien
- Aufbau einer MALDI-TOF MS Datenbank der analysierten Bakterien
- Diese Zusammenarbeit wurde u.a. dazu genutzt, die Neuisolate von *C. thermocellum* im Referenzsystem zu evaluieren

#### Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie:

- Genomsequenzierung ausgewählter Neuisolate
- Bioinformatische Datenauswertung, u.a. Annotation der Genome

#### Landesanstalt für Landwirtschaft (Freising):

- Betrieb von Laborfermentern, mit denen die „*in sacco*“ Versuche durchgeführt wurden
- Bereitstellung zahlreicher Gärrestproben als Medienzusatz
- Probenahmen

Mit allen Partnern wurden grundsätzliches Vorgehen und Versuchsplanung in intensiven Vorgesprächen abgestimmt, und einzelne Versuche durch (bilaterale) Treffen oder Telefon- und Email-„Konferenzen“ besprochen. Der Daten- und Materialaustausch (u.a. von Biogasproben und Bakterienstämmen) war äußerst intensiv und erfolgte zeitnah und lückenlos. Ohne diese intensiven Kooperationen wären die meisten Ergebnisse nicht zustande gekommen. Dies spiegelt sich auch in der Anzahl der gemeinsamen Publikationen wider.

## II Ergebnisse

### 1 Erzielte Ergebnisse

#### 1.1 Arbeitspaket 1:

Als Zielorganismus wurde für die ersten Experimente *Clostridium thermocellum* ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein sowohl auf genomischer als auch auf metabolischer Ebene sehr gut charakterisiertes cellulolytisches, thermophiles, anaerobes Bakterium, welches in Voruntersuchungen als Bestandteil des hydrolytischen Konsortiums in Biogasanlagen (BGA) nachgewiesen wurde (1-3). Die genetische Variation zwischen den Isolaten von *Clostridium thermocellum* aus verschiedenen Biogasanlagen sollte u.a. anhand der Unterschiede des Zellproteinprofils (vorrangig ribosomale Proteine) mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden. Aus den Ergebnissen sollte abgeleitet werden, inwieweit sich die Stämme verschiedener BGAs unterscheiden. Daraus können wiederum Rückschlüsse über die Variation des mikrobiellen Konsortiums zwischen verschiedenen Biogasanlagen gezogen werden.

#### 1.1.1 Auswahl repräsentativer Biogasanlagen und Probenahme durch die Projektpartner

Das Probenmaterial sollte aus einer Auswahl an verschiedenen Praxisanlagen mit konstanter Fütterung, aus sowohl mesophilen als auch thermophilen Anlagen stammen. Bei der Wahl des Substrates wurden vorrangig NawaRo-Anlagen berücksichtigt. Von allen Projektteilnehmern wurden Proben aus ein bis drei Biogasanlagen an die Technische Universität München übergeben. Die wichtigsten Parameter der beprobten Anlagen sind in folgender **Tabelle 1** gelistet.

**Tabelle 1:** Auswahl der Biogasanlagen zur Isolierung von *C. thermocellum*

Name	Operator	Temp.	Substrate
<b>ATB2 (A2)</b>	BGP 07: BiogasNord	40°C	Maissilage, Grünroggen, Rinder- und Schweinegülle
<b>TUM1 (T1)</b>	BGP 18/E	43°C	Maissilage, Grassilage
<b>TUM3 (T3)</b>	Pellmeyer	38°C	Maissilage, Grassilage
<b>JGU1 (J1)</b>	Biogasplant Bioenergie GbR	43/53°C	Maissilage, Schweinegülle
<b>JGU2 (J2)</b>	Biogasplant Obere Blies GmbH & Co. KG	40°C	Maissilage, Grassilage, Festmist, Rindergülle
<b>JGU3 (J3)</b>	Biogasplant Wagner	45/46°C	Maissilage
<b>HAW1 (H1)</b>	4Biogas	54°C	Mais, Gülle, Gras
<b>HAW2 (H2)</b>	Beta-Biomethan Schuby GmbH	40°C	Zuckerrübensilage
<b>HAW3 (H3)</b>	Agraferm Technologies AG	42°C	Gras, Mais

### 1.1.2 Vorarbeiten

Um die Stabilität der MALDI-TOF-MS Analyse mit dem zur Isolierung verwendeten Medium zu gewährleisten und um *C. thermocellum* Referenzspektren für die Datenbank des RIPAC Labors zu generieren, wurde zunächst eine MALDI-TOF-MS Analyse mit einigen *C. thermocellum* Typstämmen und vorexistierenden Eigenisolaten, sowie eines *C. stercorarium* Typstammes (als Außenmarker) durchgeführt. Diese sind in der folgenden **Tabelle 2** aufgeführt.

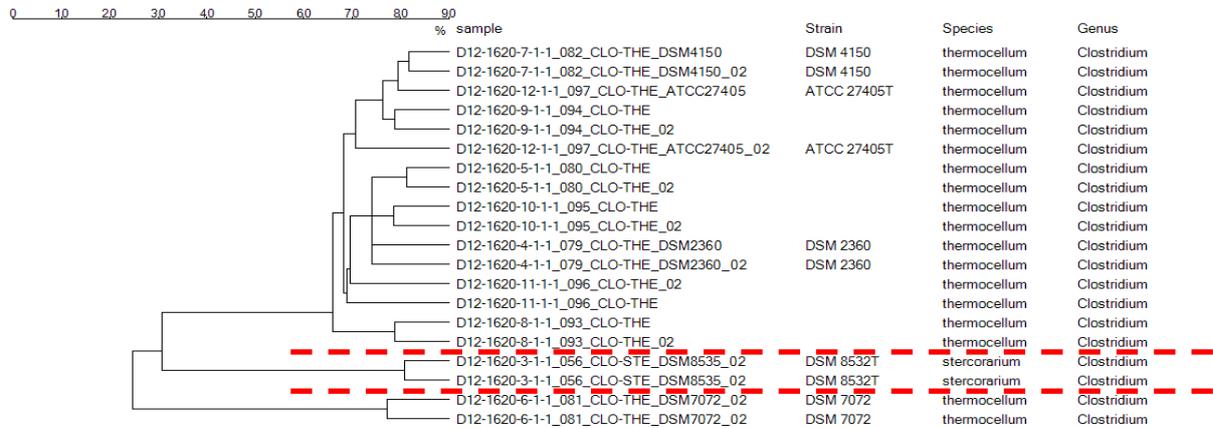
**Tabelle 2:** *C. thermocellum* (*C. stercorarium*) Typstämmen und Eigenisolate für die Evaluierung der Methode

Nummer	Bezeichnung	Stamm
001	Medium	
002	Medium	
056	<i>Clostridium stercorarium</i>	DSM 8532
079	<i>Clostridium thermocellum</i>	DSM 2360
080	<i>Clostridium thermocellum</i>	F7
081	<i>Clostridium thermocellum</i>	DSM 7072
082	<i>Clostridium thermocellum</i>	DSM 4150
093	<i>Clostridium thermocellum</i>	NB2
094	<i>Clostridium thermocellum</i>	5G
095	<i>Clostridium thermocellum</i>	T2
096	<i>Clostridium thermocellum</i>	BC
097	<i>Clostridium thermocellum</i>	ATCC 27405

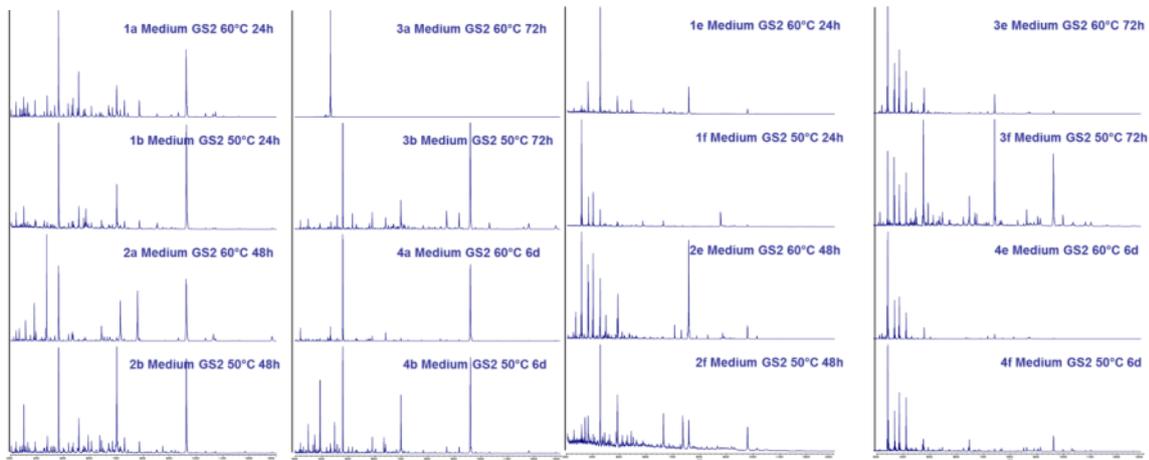
Die Anzucht erfolgte auf GS2 Medium mit 0,5% Cellobiose für 48 h bei 55°C. Die Zellen wurden nach Protokoll geerntet und in 70% Ethanol konserviert an den Projektpartner RIPAC Labor verschickt.

Die **Abbildungen 2, 3 und 4** zeigen die Auswertung der aufgenommenen MALDI TOF MS Spektren. Aufgrund einer Verunreinigung der Ausgangskultur weicht Stamm DSM 7072 *Clostridium thermocellum* von den anderen Stämmen ab. Alle anderen Stämme von *Clostridium thermocellum* zeigen ähnliche Spektren und ein gutes Subcluster. Die nah verwandte thermophile Spezies *Clostridium stercorarium* DSM 8532 zeigt eine eindeutige Trennung von den *Clostridium thermocellum* Stämmen. Von den *Clostridium thermocellum* Spektren konnte ein Subspektrum erstellt werden. Bei den hier getesteten Bedingungen verhalten sich die Stämme bei der MALDI-TOF MS Analyse wie die anderen Bakterien. Somit eignet sich die Methode sowohl zur Identifizierung als auch zur Feindifferenzierung verschiedener *C. thermocellum* Isolate.

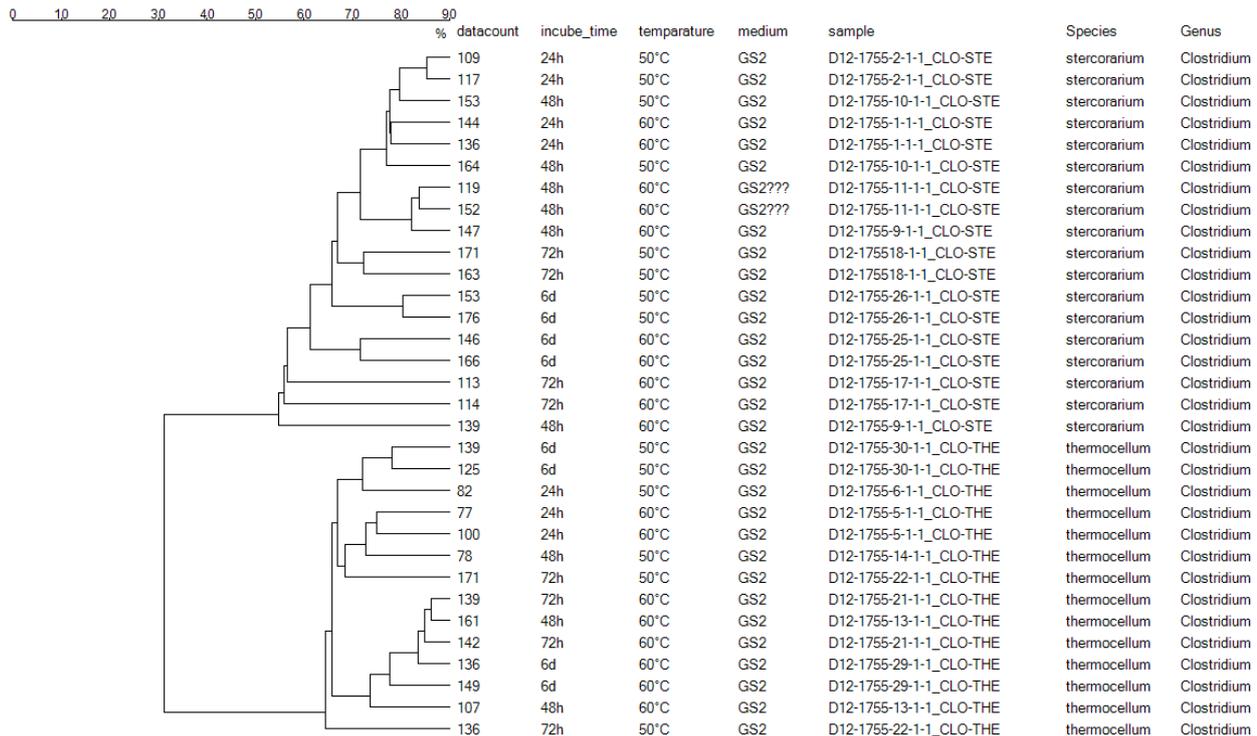
Zusätzlich wurde noch der Einfluss von Inkubationstemperatur und –zeit der Kulturen auf die Analyse bestimmt.



**Abbildung 2:** SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der *C. thermocellum* und *C. stercorarium* Stämme (vgl. Tabelle 1)



**Abbildung 3:** MALDI TOF MS Spektren zu unterschiedlichen Wachstumsbedingungen von *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium*



**Abbildung 4:** SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der Spektren bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen von *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium*

Von allen Proben, welche im GS2 Medium angezüchtet wurden, konnten bei 60 und 50 Grad C Inkubationstemperatur qualitativ gute Spektren aufgenommen werden: die Spektren zeigen eine ausreichende Stabilität der Massensignale bezüglich der Identifizierung und der Clusteranalyse. Somit kann festgehalten werden, dass auch längere Inkubationszeit (bis zu sechs Tage) und höhere Inkubationstemperaturen die MALDI TOF MS Analyse nicht negativ beeinflussen.

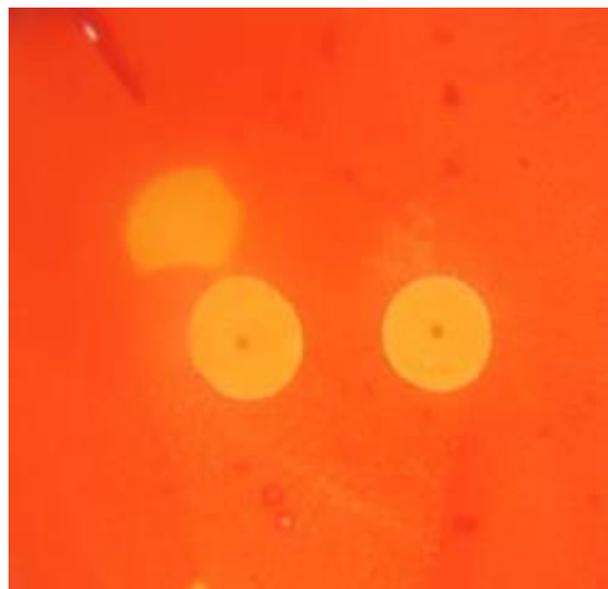
Zur Überprüfung und Etablierung der Isolierungsmethode wurde zunächst ein Vorversuch mit dem *Clostridium thermocellum* Typstamm (ATCC 27405) durchgeführt. Dazu wurde eine  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  Verdünnung des Stammes auf GS2 Agarplatten mit verschiedenen Methoden ausplattiert:

- Kultur in Topagar mit 0,5% PASC (**Phosphoric Acid Swollen Cellulose**; amorph)
- Kultur auf Topagar mit 0,5% PASC
- Kultur unter Topagar mit 0,5% PASC

Nach einer Woche Inkubation bei 60°C wurde die Cellulose im Topagar mit Kongorot angefärbt, die farblosen Lysehöfe (**Abbildung 5**) ausgezählt und die cfu ml<sup>-1</sup> ermittelt (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** Ermittlung der cfu ml<sup>-1</sup> aus der Anzahl der Lysehöfe nach Kongorotfärbung

Ausstrich	Verdünnung	Lysehöfe	cfu/ml
Unter Topagar	10 <sup>-3</sup>	200	2*10 <sup>5</sup>
	10 <sup>-5</sup>	20	2*10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-7</sup>	6	6*10 <sup>7</sup>
Über Topagar	10 <sup>-3</sup>	3	3*10 <sup>3</sup>
	10 <sup>-5</sup>	22	2,2*10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-7</sup>	0	0
In Topagar	10 <sup>-3</sup>	X (Agar fest)	X
	10 <sup>-5</sup>	ca. 150	1,5*10 <sup>7</sup>
	10 <sup>-7</sup>	13	1,3*10 <sup>8</sup>



**Abbildung 5:** Lysehöfe in PASC Overlay mit Kolonie im Zentrum.

Lysehöfe waren mit PASC deutlich sichtbar und es wurden signifikant mehr Kolonien erhalten, wenn die Bakterien von Agar umgeben waren (in Agar eingegossen).

### 1.1.3 Isolierung von *Clostridium thermocellum*

Die Methoden zur Anreicherung cellulolytischer Bakterien wurden am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TUM bereits in Vorprojekten etabliert, mussten jedoch noch an die jeweiligen Anforderungen der Aufgabenstellung angepasst werden. Hier wird die Anreicherung anaerob auf GS2-Medium mit Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 3) bei 55°C durchgeführt.

Für die anschließende Isolierung von *C. thermocellum* aus den Anreicherungen der Biogasanlagenproben wurde aufgrund der positiven Vorversuche (siehe oben) immer mit Topagar gearbeitet. Nach 2 Wochen Inkubation der GS2 Platten bei 60°C mit MN301 Cellulose im Topagar, wurden schließlich deutliche Lysehöfe auf den Platten aller Biogasanlagen (außer ATB1) erhalten. Von jeder Biogasanlage wurden mindestens zwei unabhängige Kolonien gepickt und dreimal Vereinzlungsausstriche durchgeführt. Nach Überimpfung in Flüssigkultur und Verifizierung der cellulolytischen Aktivität durch einen Filterpapierstreifen im Medium wurde von allen Isolaten eine 16S rDNA Sequenzanalyse durchgeführt, durch die gleichzeitig auch die Reinheit der Kultur überprüft werden konnte. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4:** 16S rDNA Sequenzanalyse der Isolate

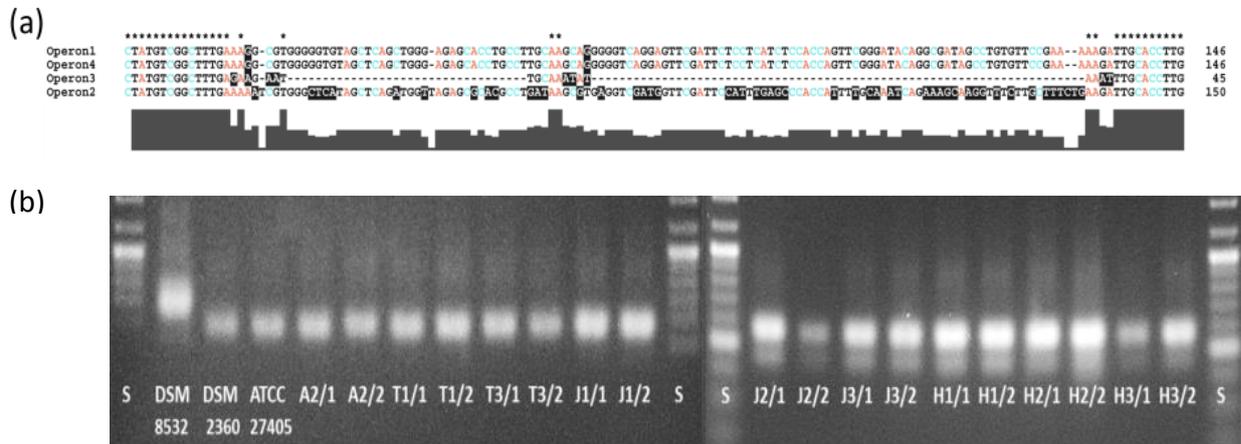
Biogasanlage	Anzahl der Isolate	Max. Sequenceidentity (99%)	Bemerkung
T1	3	<i>Clostridium thermocellum</i>	
T3	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
J1	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
J2	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
J3	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
H1	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
H2	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
H3	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	
A1	0		Keine Lysehöfe
A2	2	<i>Clostridium thermocellum</i>	

Insgesamt wurden 19 Isolate mit einer 16S rDNA Sequenzidentität > 99% als *Clostridium thermocellum* identifiziert.

#### 1.1.4 Genotypisierung verschiedener *Clostridium thermocellum* Isolate

Im Folgenden wird die Etablierung verschiedener Methoden zur Genotypisierung von *C. thermocellum* beschrieben. Verschiedene auf Bandenmustern basierte Methoden, wie PCR Ribotypisierung, RAPD (Random amplified polymorphic DNA) und VNTR (Variable Number Tandem Repeat) wurden für alle *C. thermocellum* Isolate getestet. Zudem wurde eine neue Methode, basierend auf zufällig ins Genom integrierten mobilen Elementen (**R**andom **I**nserted **M**obile **E**lement), entwickelt.

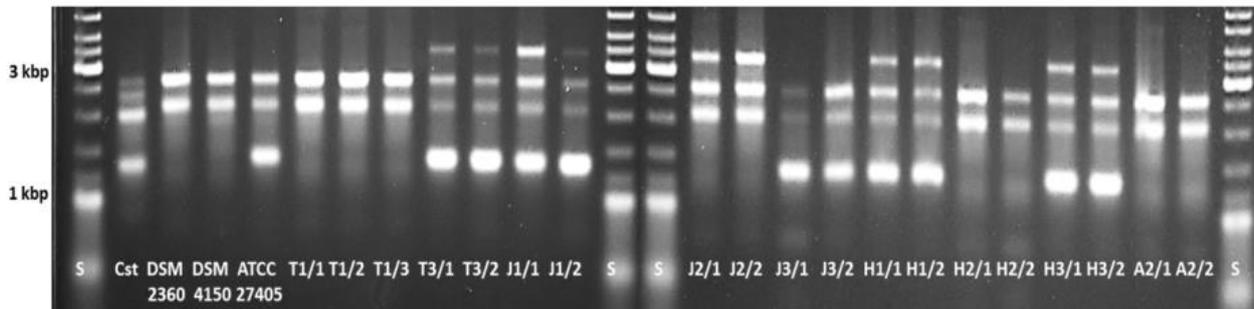
### 1.1.4.1 PCR Ribotypisierung



**Abbildung 6:** (a) Multiples Sequenz Alignment des „Intergenic Spacer“ der vier rRNA Operone von *Clostridium thermocellum* (DSM 1313). Lücken in dem unteren Balken symbolisieren Sequenzunterschiede oder Lücken. Basen mit Sequenzunterschieden sind schwarz hinterlegt. Basen, die in allen Sequenzen identisch sind, sind mit einem Stern markiert. (b) Agarosegel der PCR Produkte der Ribotypisierung aller *C. thermocellum* Isolate aus den verschiedenen BGAs und der DSM Referenzstämmen und *C. stercorarium* DSM 8532 (KOECK *et al.* 2014d)

Die bisher sequenzierten Genome von *C. thermocellum* besitzen nur vier Kopien des rRNA Operons, bei welchen sich innerhalb eines Stammes die „Spacer“ in Sequenz und Länge unterscheiden (**Abbildung 6a**). Die Resultate der Ribotypisierung der verschiedenen Isolate zeigten jedoch identische, überlappende Bandenmuster (**Abbildung 6b**). Eine genauere Analyse der Operone von bereits sequenzierten Stämmen zeigte, dass Unterschiede nur zwischen den vier Operonen eines Stammes auftauchen, aber die einzelnen Operone sich nicht zwischen den Stämmen unterscheiden. Daher ist im Unterschied zu pathogenen Clostridien bei *C. thermocellum* die PCR-Ribotypisierung nicht geeignet, um verschiedene *C. thermocellum* Isolate auf DNA-Ebene zu unterscheiden. Anhand des geringeren Molekulargewichtes konnte aber das Amplifikat von *C. stercorarium* (DSM 8532) von den übrigen Banden differenziert werden.

### 1.1.4.2 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

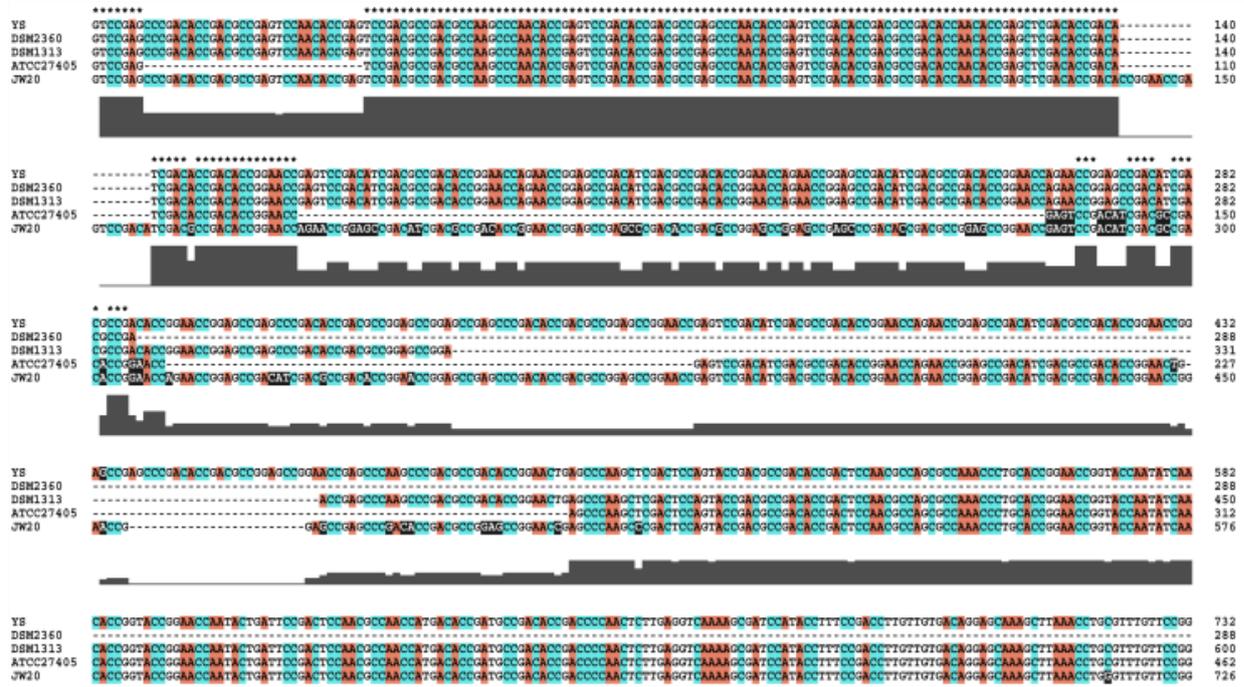


**Abbildung 7:** RAPD Bandenmuster aller *C. thermocellum* Isolate und Referenz Stämme und *C. stercorarium* DSM 8532 (Cst) (KOECK *et al.* 2014d)

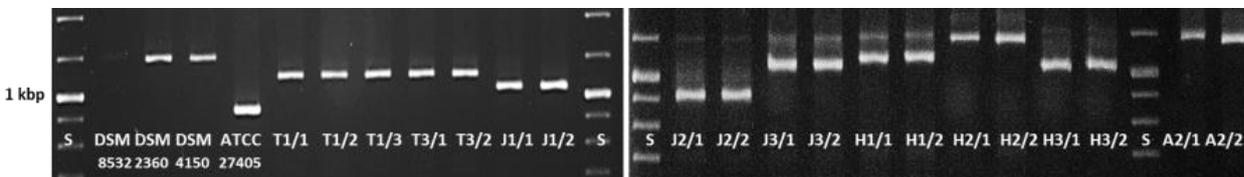
Mit der RAPD Methode wurden von 19 Isolaten nur vier verschiedene Typen von Bandenmustern erhalten (**Abbildung 7**). Zwei Banden sind, außer bei *C. stercorarium* DSM 2360 (Cst), in jedem Muster präsent. Die durchschnittliche Ähnlichkeit zwischen zwei Bandenmustern unterschiedlicher BGAs lag bei 77%. Zwischen den Bandenmustern der zwei Isolate einer Biogasanlage gab es keine Unterschiede. Aber in einigen Fällen gab es auch keine Unterschiede zwischen den Bandenmustern von Isolaten verschiedener Biogasanlagen (z.B. T3 und J1). Die Ergebnisse, die mit zwei Primern (M13 forward und M13 reverse) erzielt wurden, konnten die Diskriminierung zwischen den Stämmen verschiedener Biogasanlagen nicht erhöhen.

1.1.4.3 VNTR (Variable Number Tandem Repeat)

(a)



(b)

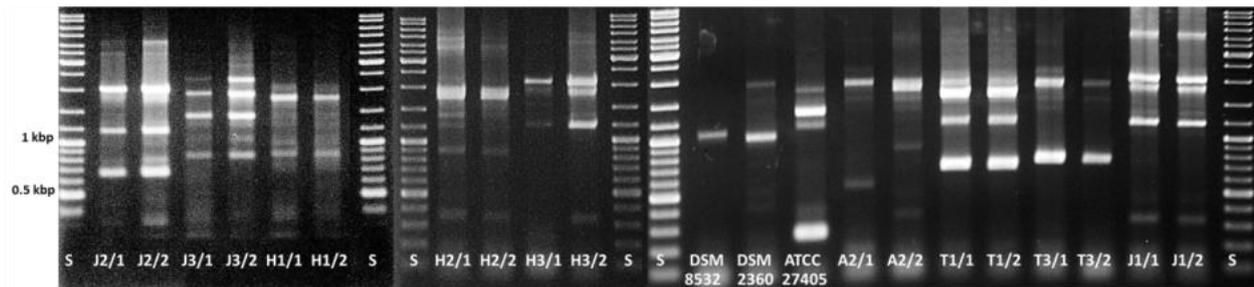


**Abbildung 8:** (a) Segment des multiplen Alignments des Clo1313\_0090 Gens von den *C. thermocellum* Referenzstämmen (YS, DSM2360, DSM 1313; ATCC 27405, JW20) mit variabler Anzahl an repetitiven Sequenzen. Lücken in dem unteren Balken symbolisieren Sequenzunterschiede oder Lücken. Basen mit Sequenzunterschieden sind schwarz hinterlegt. Basen die in allen Sequenzen identisch sind, sind mit einem Stern markiert. (b) Ergebnisse der PCR Amplifikation dieser variablen Region von allen Isolierten Spezies und *C. stercorarium* (DSM8532) und *C. thermocellum* Referenzstämmen (DSM2360, DSM4150, ATCC 27405) (KOECK *et al.* 2014d).

Ein multiples Alignment des Zielgens Clo1313\_0090 von verschiedenen *C. thermocellum* Stämmen (ATCC 27405, DSM 1313, JW20, DSM2360), zeigte eine variable Anzahl von repetitiven Sequenzen innerhalb der variablen Region des Gens. Aufgrund der unterschiedlichen Kopienzahl wies der Locus einen ausgeprägten Längenpolymorphismus auf. Die Sequenzen der einzelnen Wiederholungen unterschieden sich nur geringfügig (**Abbildung 8a**). Mit PCR Primern komplementär zu den flankierenden Regionen des repetitiven Bereichs konnten reproduzierbare Produkte von allen Isolaten und Referenzsequenzen generiert werden. Von der genomischen DNA der 22 Isolate konnten sechs verschiedene Längen des Gens amplifiziert werden. Aufgrund

der hohen Primer-Spezifität wurde von der *C. stercorarium* (DSM 8532) DNA kein Amplifikat erhalten. Alle Isolate einer BGA weisen dieselbe Amplifikatlänge auf, aber Isolate unterschiedlicher BGAs ergaben meist unterschiedliche Längen. Durch den Längenpolymorphismus des Clo1313\_0090 Gens konnten somit die meisten *C. thermocellum* Stämme aus verschiedenen Biogasanlagen voneinander abgegrenzt werden (**Abbildung 8b**).

#### 1.1.4.4 RIME (Random Inserted Mobile Element)



**Abbildung 9:** Ergebnisse der PCR Amplifikation der Regionen zwischen zwei Kopien des Mobilelements 1447 im Chromosom aller Isolierten Stämme und Referenzstämmen DSM 8532 (*C. stercorarium*) und DSM 2360, ATCC 27405 (*C. thermocellum*) (KOECK *et al.* 2014d).

*In silico* konnten 18 Kopien des mobilen Elements IS1447 in der Genomsequenz von *C. thermocellum* ATCC 27405 identifiziert werden (ZVERLOV *et al.* 2008), sowie 15 vollständige und zwei fragmentierte Mobilelemente im Genom von Stamm DSM 1313. Mit den PCR Primern IS1447F und IS1447R, komplementär zu den gegenläufigen Wiederholungssequenzen im Randbereich des mobilen Elements, konnte das Transposon in der genomischen DNA aller Isolate nachgewiesen werden. Die Amplifikation der Regionen zwischen zwei Mobilelementen lieferte sehr variable komplexe Bandenmuster (**Abbildung 9**). Die beiden Isolate einer BGA zeigten dabei bis auf Biogasanlage A2 das gleiche oder sehr ähnliche Muster, die sich nur in der Intensität der Banden unterschieden. Da auch die aus der DNA von *C. stercorarium* eine schwache Bande amplifiziert werden konnte, besitzt auch dieser Stamm vermutlich mindestens eine Kopie von IS1447, welche auch mit 87% Sequenzübereinstimmung in der *C. stercorarium* DSM 8532 Genomsequenz zu finden ist.

#### 1.1.4.5 Zusammenfassung

Die höchste Diskriminierung zwischen den Isolaten verschiedener Biogasanlagen lieferte die Amplifikation der Sequenzen zwischen den Mobilelementen IS1447. Zwei Bandenmuster verschiedener Biogasanlagen weisen im Schnitt nur eine Ähnlichkeit von 24% auf (**Tabelle 5**). Damit ist diese Methode hervorragend geeignet, um *C. thermocellum*-Stämme nachzuweisen und zu unterscheiden. Wie diese Methode in der Diagnostik von Biogasanlagen eingesetzt werden kann, muss in weiterführenden Untersuchungen ausgearbeitet werden.

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der Ergebnisse von RAPD (Random amplified polymorphic DNA), VNTR (variable number of tandem repeats), Ribotypisierung und RIME (Random inserted mobile element) Assays für die Genotypisierung der *C. thermocellum* Isolate aus verschiedenen Biogasanlagen

<sup>a</sup> Nur ein Stamm jeder BGA wurde mit einbezogen

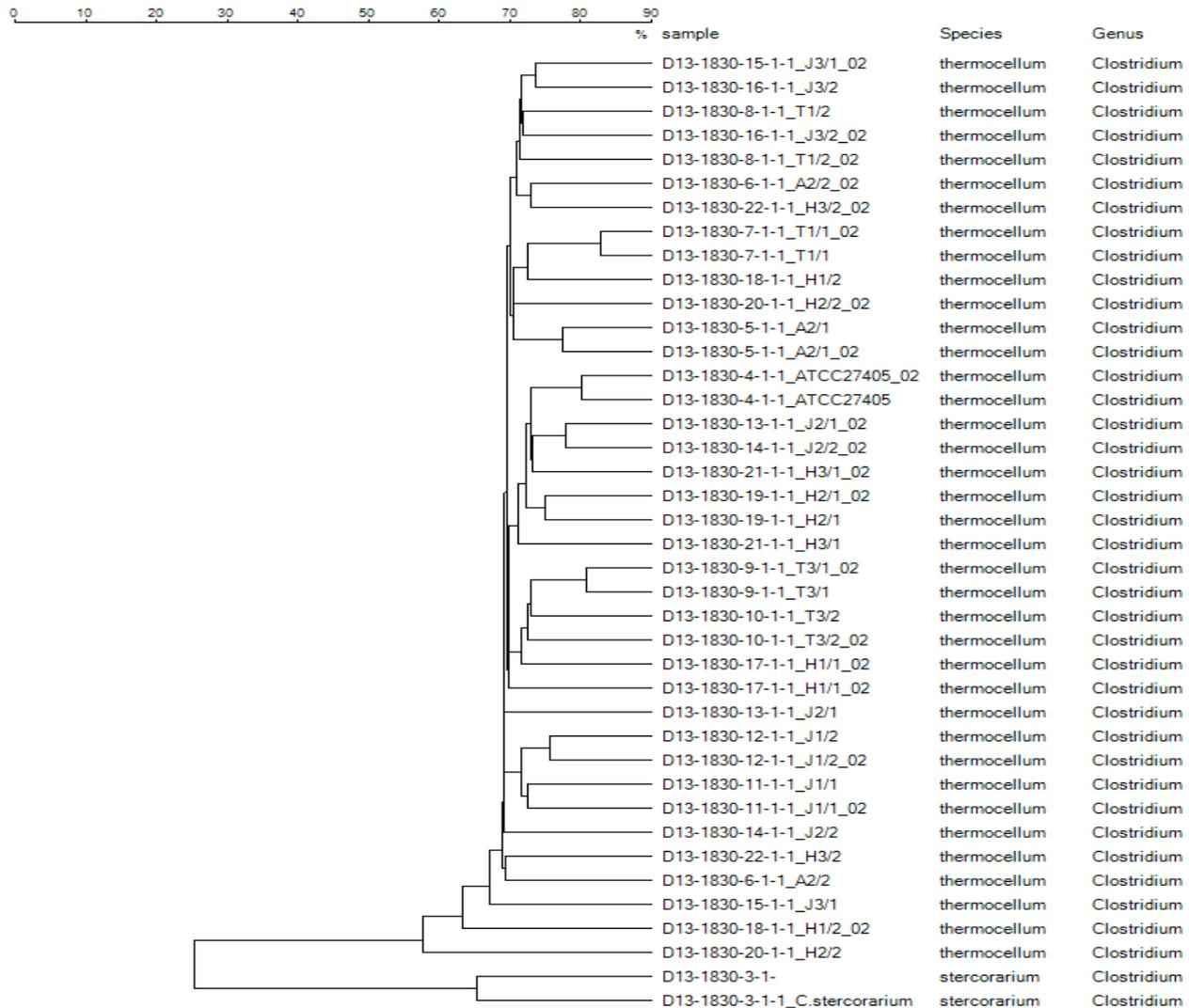
<sup>b</sup> Gemeinsame Banden aller Bandenmuster einer Methode

<sup>c</sup> Ähnlichkeiten wurden mit dem „Coincidence index“ berechnet

Assay	Anzahl Isolate <sup>a</sup>	Anzahl Bandenmuster	Anzahl Banden		Bandengröße (kb)	% Ähnlichkeit <sup>c</sup>	
			Total	Gemeinsam <sup>b</sup>		Mittel	Bereich
<b>Ribotyp</b>	11	1	1	1	~ 0.6	100	100
<b>RAPD</b>	12	4	2-4	2	1 – 3.5	77	66 -100
<b>VNTR</b>	12	6	1	0	0.9 – 1.2	-	0 - 100
<b>RIME</b>	11	11	2-7	0	0.3 - 5	24	0 – 66

#### 1.1.5 SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der Spektren unterschiedlicher *Clostridium thermocellum* Isolate

Bei einem Vergleich der Zellproteinprofile durch eine Samaris MALDI-TOF MS Analyse clustern die beiden Isolate einer Biogasanlage nur zum Teil. Die beiden Proben der Anlage H3 liegen relativ weit voneinander entfernt. Somit ist die MADLI TOF MS Methode bei Umweltisolaten nur für eine Auflösung bis auf Artebene sehr gut geeignet (**Abbildung 10**). Ähnlich wie bei der Ribotypisierung, konnte die MALDI-TOF MS Analyse die Isolate nicht eindeutig bis auf Subspezieslevel auflösen, aber alle *C. thermocellum* Isolate eindeutig von *C. stercorarium* abgrenzen. Ebenso wie die ribosomalen rRNA Operone scheinen auch die ribosomalen Proteine zwischen zwei *C. thermocellum* Stämmen hoch konserviert zu sein.



**Abbildung 10:** SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der Spektren unterschiedlicher *C. thermocellum* Isolate aus ausgewählten Biogasanlagen mit *C. stercorarium* Cluster

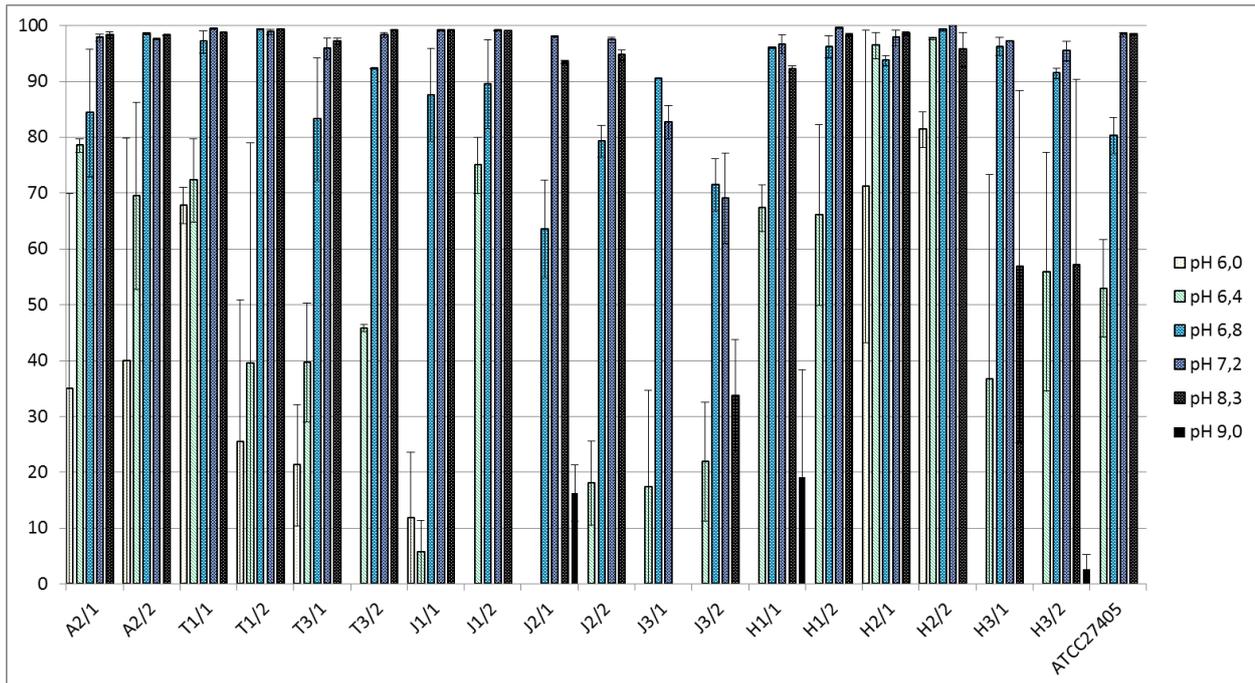
### 1.1.6 Physiologische Unterschiede der *Clostridium thermocellum* Isolate aus unterschiedlichen Biogasanlagen

Zur Ermittlung der physiologischen Unterschiede zwischen den Isolaten verschiedener Biogasanlagen wurden optimale Wachstumsbedingungen, Substratspektrum, cellulolytische Aktivität etc. bestimmt. Alle Stämme hatten die höchste Zellproteinkonzentration (und damit das optimale Wachstum) bei 50 bis 60°C Wachstumstemperatur. Bei Temperaturen über 60°C sinkt die Zellproteinkonzentration wieder und bei 70°C kann keines der Isolate wachsen. Nur die Isolate J2/1 und H3/2 konnten innerhalb von 6 Tagen bei 45°C auf Cellulose merkliches Wachstum zeigen (**Tabelle 6**). Der optimale pH Wert liegt für alle Isolate, außer J2/1, H2/1 und H2/2, zwischen pH 7,2 und pH 8,3. Die Zellproteinkonzentrationen waren bei pH 7,2 und 8,3 signifikant höher ( $p = 0,0001$ ) als bei pH 6. Die Isolate der Biogasanlage H2 scheinen jedoch niedrigere pH Werte zu tolerie-

ren als die Isolate der anderen Biogasanlagen. Obwohl einige der Isolate (A2/1, A2/2, T3/1, T3/2, J2/2, H1/1, H1/2, H3/1, H3/2) auch noch bei pH 6,0 langsam wachsen können, sind die gemessenen Zellproteinkonzentration der Stämme aus Biogasanlage H2, mit 0,06 mg/ml für H2/1 bzw. 0,08 mg/ml für H2/2, signifikant höher ( $p = 0,00112$ ).

**Tabelle 6:** Zellproteinkonzentration von allen isolierten Stämme und *C. thermocellum* ATCC 27405 nach Inkubation für sechs Tage bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen in GS2 Medium mit 0.5% Avicel (wt/vol).

	Temperatur °C					pH					
	45	50	55	60	65	6	6,4	6,8	7,2	8,3	9,2
A2/1	0	0,06	0,07	0,14	0,04	0,03	0,09	0,12	0,14	0,14	0
A2/2	0	0,05	0,06	0,11	0,04	0,01	0,07	0,11	0,11	0,16	0
T1/1	0	0,05	0,04	0,19	0,04	0	0,07	0,12	0,19	0,17	0
T1/2	0	0,06	0,05	0,18	0,05	0	0,05	0,12	0,18	0,18	0
T3/1	0	0,07	0,06	0,06	0,07	0,02	0,02	0,05	0,06	0,10	0
T3/2	0	0,06	0,05	0,12	0,04	0,01	0,05	0,09	0,12	0,09	0
J1/1	0	0,06	0,09	0,18	0,06	0	0,06	0,16	0,18	0,19	0
J1/2	0	0,05	0,09	0,17	0,04	0	0,07	0,13	0,17	0,15	0
J2/1	0,02	0,08	0,09	0,07	0,02	0	0,06	0,05	0,03	0,01	0,07
J2/2	0	0,05	0,09	0,09	0,03	0,02	0,07	0,09	0,09	0,13	0
J3/1	0	0,05	0,07	0,11	0,03	0	0,08	0,08	0,11	0,14	0,02
J3/2	0	0,05	0,07	0,13	0	0	0,07	0,14	0,13	0,17	0,10
H1/1	0	0,07	0,09	0,11	0,03	0,03	0,15	0,10	0,11	0,12	0,08
H1/2	0	0,07	0,06	0,18	0,04	0,06	0,11	0,17	0,18	0,17	0,08
H2/1	0	0,07	0,10	0,10	0,03	0,06	0,07	0,08	0,06	0,05	0,02
H2/2	0	0,06	0,13	0,13	0,03	0,08	0,10	0,04	0,04	0,04	0
H3/1	0	0,07	0,07	0,12	0,05	0,05	0,05	0,18	0,12	0,08	0,07
H3/2	0,01	0,07	0,11	0,17	0,05	0,04	0,11	0,14	0,17	0,13	0,06
ATCC	0	0,05	0,04	0,11	0,05	0	0	0,08	0,11	0,12	0



**Abbildung 11:** Cellulose Abbau (%) (y-Achse) aller Isolate und des *C. thermocellum* Typstammes ATCC 27405 bei verschiedenen pH Werten. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung

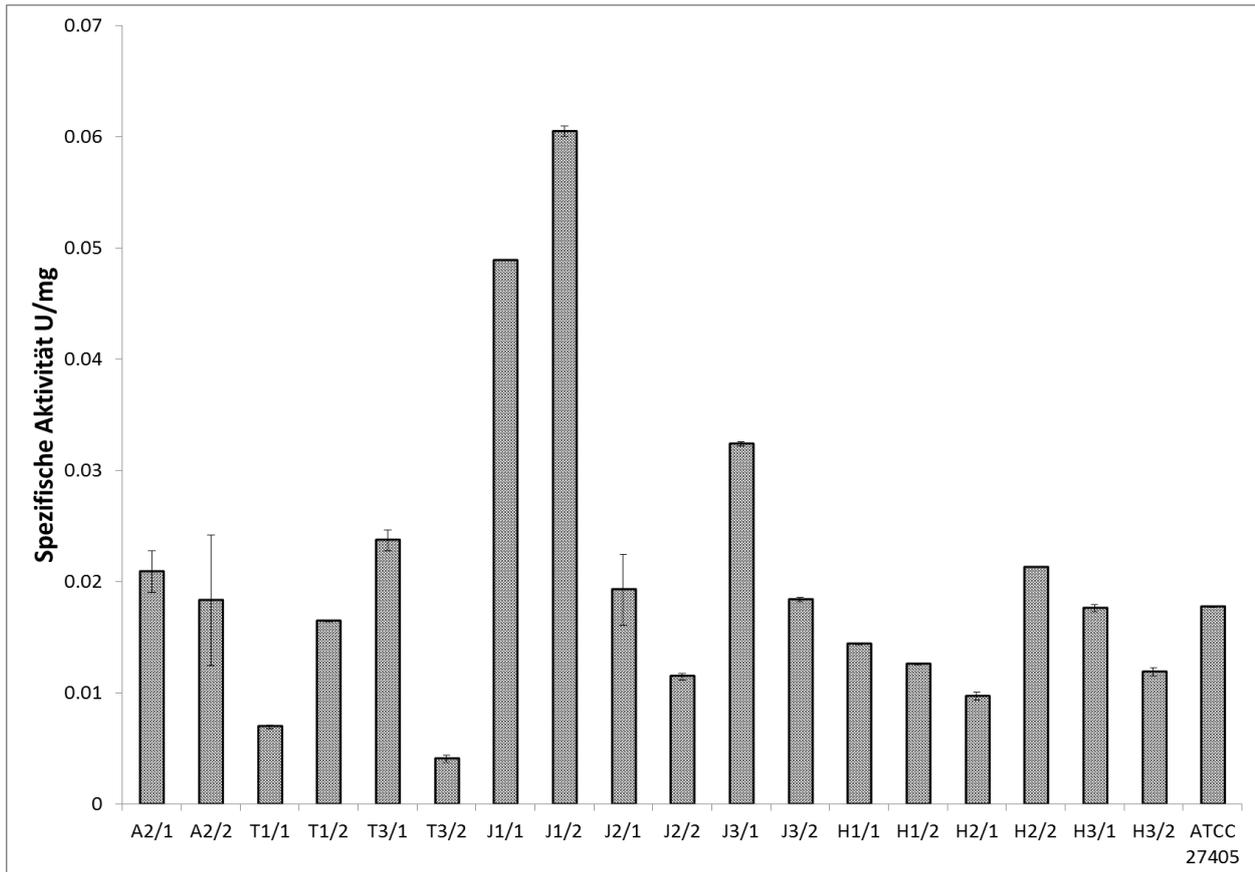
Auch der Celluloseabbau der Isolate der Biogasanlage H2 ist bei pH 6,0 signifikant ( $p = 0.002$ ) höher als bei allen anderen getesteten Isolaten (**Abbildung 11**). Die beste Abbauleistung lieferten alle Isolate bei pH-Werten zwischen 7,2 und 8,3. Nur die Isolate J2/1, H1/1 und H3/2 konnten bei pH 9,2 noch Cellulose abbauen. Die Ergebnisse des Celluloseabbaus zeigen eine positive Korrelation mit der Zellproteinkonzentration bei den entsprechenden Temperaturen/-pH Werten. In den meisten Fällen gibt es ebenfalls eine positive Korrelation zwischen den beiden Isolaten einer Biogasanlage bei der Bestimmung des Celluloseabbaus und der Zellproteinkonzentration, besonders bei niedrigen pH Werten. Verglichen mit den anderen Isolaten wuchs der Typstamm am schlechtesten bei pH Werten und Temperaturen außerhalb des für die neuen *C. thermocellum* Stämme üblichen Bereichs.

Alle Isolate wuchsen, wie für bisher charakterisierte *C. thermocellum* Stämme beschrieben, auf kristalliner Cellulose (Filterpapier und Avicel) und Cellobiose (FREIER *et al.* 1988, MC BEE 1954). Nach längerer Inkubation für mindestens sieben Tage konnten einige Isolate auch Glucose, Fructose oder Sorbitol als Kohlenstoffquelle verwerten (**Tabelle 5**). Keines der Isolate konnte Xylan, Xylose, Stärke, Galactose, Mannose, Inulin, Sucrose, und Arabinose verwerten. In den meisten Fällen konnten beiden Isolate einer Biogasanlage auf denselben Substraten wachsen, zeigten also auch auf der physiologischen Ebene einen hohen Grad an Übereinstimmung. Nach einer zweiten Überimpfung auf Glucose, Fructose und Sorbitol konnte eine Trübung des Mediums bereits nach zwei Tagen Inkubation beobachtet werden. Eine 16S rRNA Sequenz Analyse be-

stätigte, dass es sich nach der zweiten Überimpfung immer noch um *C. thermocellum* Reinkulturen handelte: das Wachstum war also nicht auf Kontaminationen zurückzuführen. Die Adaption ging nach einer darauf folgenden Kultivierung auf Cellulose wieder verloren, war also nicht auf Mutationen zurückzuführen. Der Typstamm ATCC 27405 konnte ebenfalls auf Fructose und Sorbitol angezogen werden.

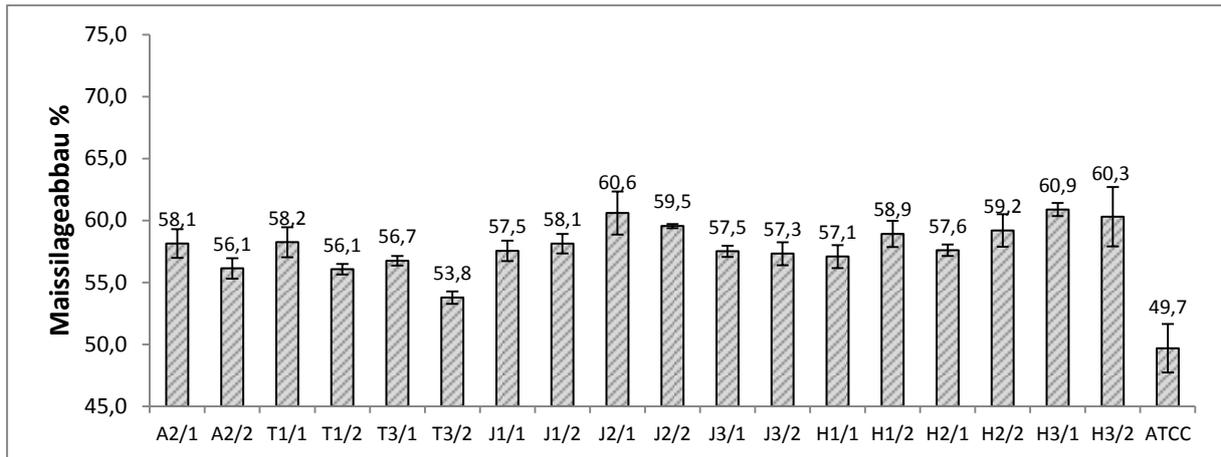
**Tabelle 7:** Verwertung verschiedener Kohlenhydrate durch *C. thermocellum* Isolate in GS2 Medium. Bestimmung der Zellproteinkonzentration, um Wachstum nachzuweisen. Keines der Isolate konnte auf Xylan, Xylose, Stärke, Galactose, Mannose, Inulin, Sucrose, und Arabinose wachsen.

<b>Substrat:</b>	Cellulose	Glucose	Fructose	Sorbitol
A2/1	0,139	0,052	0,039	0,049
A2/2	0,113	0,049	0,042	0,031
T1/1	0,195	0,064	0,054	0,042
T1/2	0,177	0,084	0,051	0,038
T3/1	0,057	0,064	0,045	0,041
T3/2	0,125	0,042	-	0,06
J1/1	0,182	-	-	-
J1/2	0,169	-	-	-
J2/1	0,029	-	-	-
J2/2	0,091	-	-	-
J3/1	0,109	0,05	0,028	0,032
J3/2	0,128	0,067	0,027	-
H1/1	0,112	0,025	0,014	0,018
H1/2	0,184	0,054	0,026	0,02
H2/1	0,058	0,038	0,026	0,037
H2/2	0,035	-	0,022	0,038
H3/1	0,119	-	-	-
H3/2	0,167	-	-	-
ATCC 27405	0,108	-	0,077	0,128



**Abbildung 12:** DNSA Assay zur Ermittlung der spezifischen Cellulase-Aktivität des Kulturüberstandes aller Isolate und *C. thermocellum* ATCC 27405 auf Avicel unter Standardbedingungen. Ausgedrückt als  $\mu\text{mol}$  Glucose Äquivalent pro mg Protein aus Zellüberstand und Minute (U/mg). Von jeder Proteinprobe wurden drei Replikate gemessen und die numerische Standardabweichung mit Fehlerbalken dargestellt

Zur Ermittlung der spezifischen Cellulase Aktivität von allen Isolaten und *C. thermocellum* ATCC 27405, wurden diese in GS2 Medium mit Filter Papier (0,5%) als C-Quelle bis zum vollständigen Abbau des Filterpapiers bei 60°C angezogen (**Abbildung 12**). Die spezifische Cellulase-Aktivität des Kulturüberstandes wurde mittels DNSA Assay bestimmt. Diese war bei den Isolaten J1/1 und J2/1 signifikant höher ( $p > 0.0001$ ) als bei allen anderen Isolaten. Die Stämme T1/1 und T3/1 zeigten die niedrigste Aktivität.



**Abbildung 13:** Abbau von Maissilage aller Isolate und des *C. thermocellum*-Typstamms ATCC 27405 nach Inkubation in GS2 Medium mit 0.5% Maissilage (wt/vol) für sechs Tage

Auf Maissilage, einem „natürlichen“ Substrat, zeigten alle Isolate ähnliche Abbaueffizienzen (61-54%). Der Typstamm dagegen zeigte einen signifikant ( $p = 0.0006$ ) niedrigeren Abbau von Maissilage (49.7%) (**Abbildung 13**).

## 1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Arbeitspaket 1

Bisher wurde die Isolierung von *C. thermocellum* Reinkulturen aus Biogasanlagen nicht beschrieben, obwohl diese Art unlängst häufig als wichtiger Bestandteil des mikrobiellen Konsortiums in Biogasanlagen nachgewiesen wurde (KRAUSE *et al.* 2008, WIRTH *et al.* 2012). Im Rahmen dieses Verbundprojekts wurden erfolgreich jeweils zwei *C. thermocellum* Stämme aus neun verschiedenen Biogasanlagen gewonnen und deren genetische und metabolische Unterschiede, sowie deren cellulolytisches Potential ermittelt.

Eine verlässliche Technik für die Genotypisierung von *C. thermocellum* Stämmen sollte dabei folgende Kriterien erfüllen: Eignung für Hochdurchsatzanalysen, geringe Kosten, Reproduzierbarkeit, sowie die Möglichkeit zur digitalen Datenspeicherung und Archivierung (SAUER *et al.* 2008). Alle getesteten PCR-basierten Methoden lassen sich schnell und einfach implementieren. Diese Genotypisierungstechniken hatten dabei aber jeweils ihre Vor- und Nachteile: für den RADP-Assay muss von dem Zielorganismus vorher keinerlei Sequenzinformation vorliegen; für eine Ribotypisierung muss zumindest die Sequenz des/der rRNA Operons bekannt sein; und für VNTR oder RIME sollte für die Primer-Entwicklung die Genomsequenz bekannt sein. Dadurch, dass die genomische DNA Sequenz über einen längeren Zeitraum stabil bleibt und sich nicht abhängig von Umwelteinflüssen ändert, können PCR-basierte Identifizierungs- und Genotypisierungsmethoden verlässliche und reproduzierbare Informationen von bakteriellen Proben generieren (SAUER *et al.* 2008). Ein großer Nachteil dieser auf Bandenmustern basierenden Techniken ist allerdings die schlechte Übertragbarkeit der generierten Daten (ZAIß *et al.* 2009). Im Rahmen dieses Projektes wurde gezeigt, das PCR-

Ribotypisierung nicht geeignet ist, um verschiedene *C. thermocellum* Stämme zu unterscheiden. Der RADP- und der VNTR-Assay ergaben zwar verschiedene Bandenmuster bzw. Amplikonlängen, konnten aber nicht alle Isolate aus unterschiedlichen Biogasanlagen voneinander abgrenzen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Verwendung des mobilen Elements IS1447 für die Genotypisierung (RIME Assay) zeigt die beste Differenzierung zwischen verschiedenen *C. thermocellum* Stämmen und lieferte einen Genotyp für jede Biogasanlage. Verbunden mit der Suche nach *C. thermocellum* Mutanten mit unvollständiger Cellulosehydrolyse wurde dieses neue und aktive Insertionselement (IS) IS1447 entdeckt, welches zur IS3 Familie gehört und in den *cipA* Leserahmen integriert ist (ZVERLOV *et al.* 2008). Die IS-Sequenz besteht aus einem Transposase-Gen und den invertierten Wiederholungen IRR und IRS an den Enden. Die Insertion führt zu einer Vervielfältigung von 3 Basenpaaren innerhalb der nicht-spezifischen Zielsequenz. Dies hohe Unspezifität der Target-Erkennung ermöglicht die Integration an variablen Positionen im *C. thermocellum* Genom (ZVERLOV *et al.* 2008). Dies macht IS1447 interessant für die Entwicklung eines einfachen und günstigen genetischen Markers zur Genotypisierung verschiedener *C. thermocellum* Stämme. Kopien desselben IS1447 wurden auch in den Genomen von eng verwandten Bakterien wie *C. stercorarium* und *C. clariflavum* gefunden. Daher sollte die einfache Übertragung dieser Methode auf andere nahe verwandte cellulolytische Spezies möglich sein. Es sollte sogar möglich sein durch die Verwendung von anderen, zufällig integrierbaren und noch aktiven mobilen Elementen die Methode auf andere taxonomische Gruppen zu übertragen. Da die Sequenz des Transposons bekannt ist, können die generierten Daten zudem zwischen verschiedenen Laboren übertragen und verglichen werden.

Die Genotypisierung anhand der Zellproteinprofile würde ebenfalls all diese Kriterien erfüllen und offenbarte sich auch als gute und einfache Methode, um Bakterien bis zum Spezieslevel zu unterscheiden. Ähnlich wie die Ribotypisierung ist diese Methode aber nicht geeignet, um *C. thermocellum*-Isolate verlässlich bis auf Subspezieslevel zu unterscheiden. Zum einen sind in vielen Fällen die Klassifizierungsergebnisse aus Massenspektraldaten und 16S ribosomalen Gensequenzen durch die Koevolution ribosomaler Proteine und ribosomaler Nukleinsäuren zu ähnlich (SAUER *et al.* 2008); zum anderen können Variationen der Kultivierungsbedingungen oder Extraktionsmethoden auch in denselben Bakterien unterschiedliche Spektren erzeugen (SAUER & KLIEM 2010).

Generell unterschieden sich die Stämme verschiedener Biogasanlagen anhand ihrer Genotypisierungsergebnisse und physiologischen Eigenschaften. Beide Stämme einer Biogasanlage zeigten aber immer identische Bandenmuster mit jeder der angewandten Genotypisierungsmethoden. Diese Ergebnisse wurden durch die Berechnungen der Bandenmusterähnlichkeit mit dem „coincidence index“ bestätigt. Bezüglich der optimalen Wachstumsbedingungen, cellulolytischen Aktivität und Substratspezifität zeigten die Isolate einer Biogasanlage ebenfalls ähnliche Charakteristika. Die Resultate lassen

vermuten, dass alle Isolate einer Biogasanlage aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zur selben *C. thermocellum* Subspezies (Stamm) gehören. Jeweils ein einziger Stamm scheint in jeder Biogasanlagen dominant vorzukommen und somit angereichert und isoliert zu werden. Dieser ist vermutlich an die biologischen und die Prozess-Parameter der entsprechenden Biogasanlage am besten angepasst und hat sich durchgesetzt. Dies lässt die Vermutung zu, dass dies auch auf andere Spezies der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Biogasanlagen zutrifft. Dieses Ergebnis ist daher ein wichtiger Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur Biologie in Biogasanlagen und hat unter Umständen erhebliche Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Inokulationen mit fremden Bakterienkulturen, die zur Steigerung der Leistungsfähigkeit zugegeben werden könnten.

### 1.3 Arbeitspaket 2:

Der zentrale Focus dieses Projekts lag auf dem zweiten Arbeitspaket: der Isolierung möglichst vieler neuer Arten/Stämme aus Modellbiogasanlagen. Dies soll die Diversität der Mikroorganismen im Biogasprozess abbilden, die "black box" der Biogas-Mikrobiologie besser ausleuchten und als Basis für weitere molekulargenetische Untersuchungen dienen. Dazu sollten zunächst geeignete Modellfermenter ausgewählt und neue Isolierungsstrategien für cellulolytische Bakterien entwickelt werden. Anschließend sollten neue Isolate gereinigt, identifiziert und charakterisiert werden. Das Hauptaugenmerk liegt in diesem Teilprojekt auf dem cellulolytischen und hemicellulolytischen Potential der Isolate. Von einigen ausgewählten Isolaten sollte zusätzlich zur physiologischen und molekularbiologischen Charakterisierung der Bakterienkulturen das Genom sequenziert werden. Dies liefert zum einen Referenzdaten für die funktionale Interpretation von Metagenomanalysen; zum anderen soll dadurch die Ausstattung der neuen Isolate mit Glycosylhydrolasen und die Art und Beschaffenheit des cellulolytischen Systems aufgeklärt werden, was zur Identifizierung von Enzymen mit industriellem Anwendungspotential führen kann.

#### 1.3.1 Auswahl eines thermophilen Modellfermenters

Als thermophile Modellbiogasanlage wurde der 4Biogas NOVA-Fermenter in Viersen ausgewählt, welcher Anfang 2013 von den Projektpartnern gemeinsam beprobt wurde. Es handelt sich im Wesentlichen um einen zweistufigen Hochleistungs-Fermenter mit integrierter Hydrolyse und separatem Gärraum. Die Reaktorkenndaten sind in **Tabelle 8** zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Reaktorkennndaten 4 Biogas NOVA-Fermenter Viersen

Prozesstemperatur	52-53°C
Gärvolumen pro Fermenter	115 m <sup>3</sup>
Fermenterhöhe	15 m
Fermenter Durchmesser	3,8 m
Substrat	30% Schweinegülle 70% Maissilage
Typische Verweilzeit des Substrates	21 d
Raumbelastung	7,94 kg oTS/m <sup>3</sup> d

Alle Projektpartner haben aus dem Fermenter eine Probe entnommen, um daraus Isolate zu gewinnen.

### 1.3.2 Auswahl eines mesophilen Modellfermenters

Als mesophiler Fermenter wurde das Biomassekraftwerk Eggertshofen GmbH ausgewählt, welches Anfang 2014 von uns beprobt wurde. Hierbei handelt es sich um einen einstufigen Fermenter (**Tabelle 9**).

**Tabelle 9:** Reaktorkennndaten Biomassekraftwerk Eggertshofen GmbH

Prozesstemperatur	39-40°C
Volumen	2800 m <sup>3</sup>
Substrate	Gülle, Stroh, Grasschnitt, Heu, Silagen

### 1.3.3 Entwicklung von Isolierungsstrategien für cellulolytische und acidogene Bakterien

Für die Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen aus Umweltproben gibt es diverse Ansätze (**Abbildung 14**). In der Arbeit dieses Teilprojektes lag der Focus auf der Isolierung von hydrolytischen, insbesondere cellulolytischen Bakterien aus verschiedenen Biogasanlagen, die mit pflanzlichen Substraten betrieben werden. Bei der Wahl der Isolierungsstrategien wurde angestrebt, eine möglichst große Vielfalt an Organismen zu erhalten. Für eine maximale Diversität an Isolatzen wurden zudem verschiedenste Medien und Kultivierungs-Bedingungen getestet. Im Wesentlichen wurden vier Isolierungsstrategien verfolgt und für die speziellen Anforderungen weiter entwickelt und erprobt. Diese werden nachfolgend kurz beschrieben.

#### Isolierungsstrategie 1:

Bei Strategie 1 erfolgte eine einfache Anreicherung des Inokulums auf dem gewählten Substrat, bis dieses abgebaut bzw. zumindest deutlich angegriffen wurde. In der Regel handelte es sich hierbei um einen Filterpapierstreifen (kristalline Cellulose). Bei löslichen Substraten wurde eine deutliche Gasbildung oder Trübung des Mediums abge-

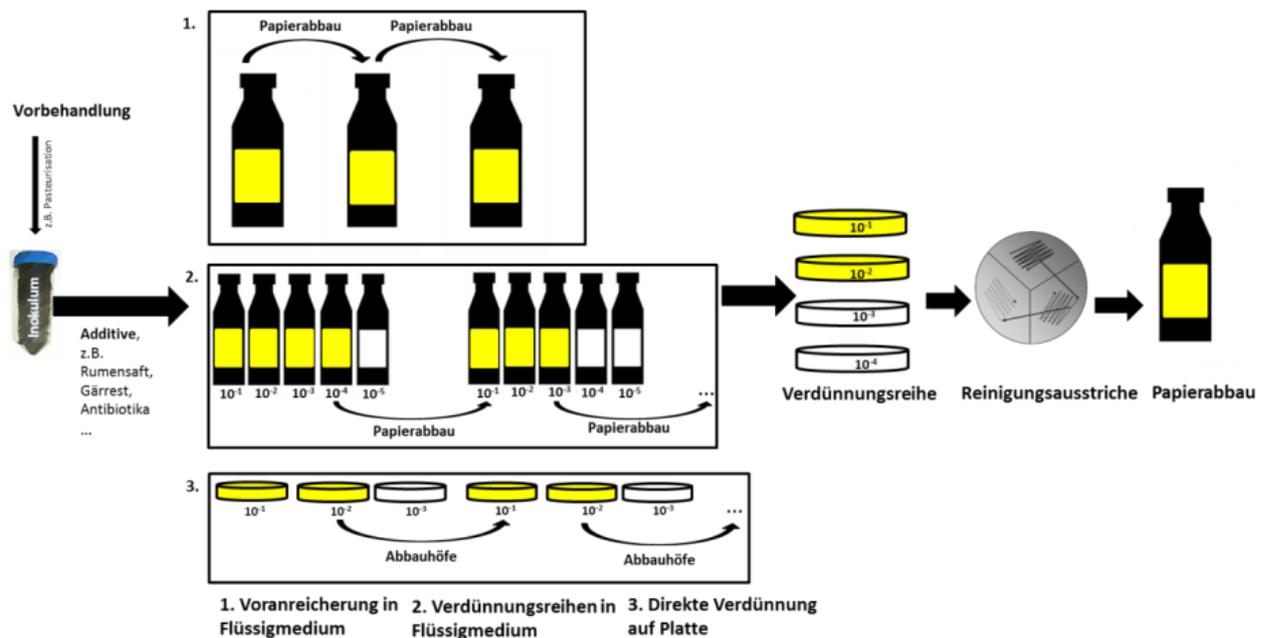
wartet. Anschließend wurde aus der ersten Anreicherung in frisches Medium (1:20) inokuliert. Dieser Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt.

Isolierungsstrategie 2 (SCHOENBORN *et al.* 2004):

Ein zweiter Ansatz ist die Isolierung aus Flüssigmedium mittels mehrfacher Verdünnungsreihen. 1 ml Inokulum aus der ausgewählten Biogasanlage wurde in 50 ml NaCl Lösung (0,2 M) resuspendiert und bis  $10^{-8}$  verdünnt (SCHOENBORN *et al.* 2004). Jede Verdünnung wurde in frisches Medium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle (in der Regel Filterpapier) überimpft. Die Kulturen wurden so lange inkubiert, bis das Filterpapier deutlich angegriffen war. Die höchste Verdünnungsstufe mit sichtbarem Filterpapierabbau wurde wiederum bis  $10^{-8}$  in demselben Medium verdünnt. Nach vier Wiederholungen der Verdünnungsreihe wurde die resultierende Anreicherungskultur erneut verdünnt und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert und mit Cellulose- oder PASC-Topagar (amorpher „*phosphoric acid swollen*“ Cellulose“) überschichtet.

Isolierungsstrategie 3:

Ein dritter Ansatz ist die direkte Isolierung von Agarplatten ohne vorherige Anreicherung in Flüssigmedium (ZHANG *et al.* 2003). Das Inokulum wurde dafür in sterilem Phosphatpuffer (20 mM, 1:100) ausgeschüttelt und anschließend bei 100xg für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in steriler NaCl-Lösung (0,2 M) gewaschen und bis  $10^{-8}$  verdünnt. Verschiedene Verdünnungsstufen wurden dann direkt ausplattiert. Nach Inkubation bei der gewählten Temperatur wurden Kolonien mit deutlichen Lysehöfen im Cellulose-Topagar erneut in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert oder direkt Verdünnungsausstriche angefertigt.



**Abbildung 14:** Zusammenfassung der Isolierungs- und Reinigungsstrategien für ein neues Isolat. Eine gelbe Färbung ist jeweils gleichzusetzen mit Substrat bzw. Filterpapierabbau

Isolierungsstrategie 4 - „*in sacco*“ Anreicherung:

Ein weiterer Ansatz ist die sogenannte „*in sacco*“ Anreicherung von cellulolytischen Bakterien. Nylonsäckchen mit 50 µm Porengröße wurden mit 2 g zerkleinertem Filterpapier (ca. 3 cm lang und 0,5 cm breit) gefüllt und mit Hilfe eines speziellen Keimträgers direkt in die Labor-Fermenter BM1T und BM2T (Betrieb bei 55°C) des Projektpartners LfL eingebracht (vgl. **Abbildung 15**). Mit Hilfe der Cellulose in den für Bakterien permeablen Nylonsäckchen sollte eine selektive Anreicherung von cellulolytischen Bakterien im anaeroben Milieu des Biomassefermenters erreicht werden<sup>1</sup>. Die Säckchen wurden nach einer gewissen Inkubationszeit mit möglichst wenig Sauerstoffkontakt aus dem Fermenter entfernt und anschließend mit 50 ml isotonischer Lösung gespült, um Reste des Fermenter-Inhalts und unspezifische anhaftende Bakterien zu entfernen. Das anverdaute Filterpapier konnte dann zur weiteren Anreicherung und Isolierung von cellulolytischen Bakterien in diverse Medien überführt werden.

Neben der Wahl der Isolierungsstrategie gibt es weitere Möglichkeiten, um die Diversität der erhaltenen Isolate zu erhöhen. Zum einen hängt das Isolat-Spektrum stark von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums und der darin enthaltenen Kohlenstoffquelle ab (PHAM & KIM 2012). Das gewählte Grundmedium für die Zielorganismen wurde z.B. mit Zusätzen wie Gärrest oder Rumensaft versehen, um die Nährstoffbedingungen im natürlichen Habitat zu simulieren, oder mit Antibiotika versehen, um bestimmte Organismengruppen am Wachstum zu hindern (vgl. **Tabelle 10**). Eine weitere Möglichkeit zur Diversifizierung bietet die Variation der Wachstumsbedingungen. In dieser Arbeit wurden vor allem die Temperatur, die Inkubationszeit und der pH des Mediums variiert. Des Weiteren konnte durch Vorbehandlung des Inokulums, z.B. durch Pasteurisierung, eine weitere Variation erreicht werden.



**Abbildung 15:** Nylonsäckchen für die „*in sacco*“ Versuche; Laborfermenter BM1T, BM2T für die „*in vivo*“ Anreicherung

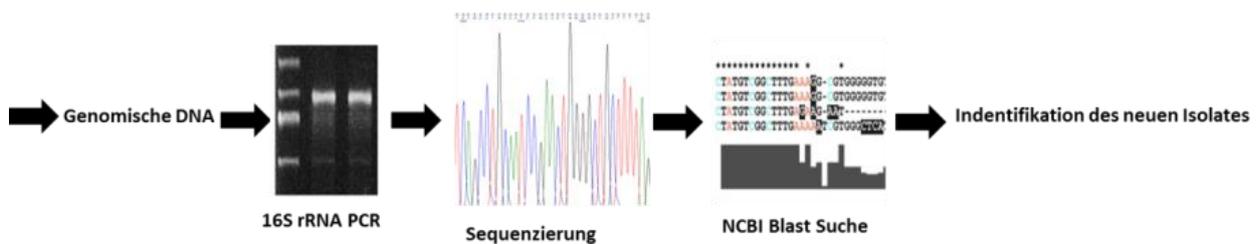
<sup>1</sup> Cellulolytische Bakterien adsorbieren in der Regel an kristalline Cellulose und können somit von nicht-cellulolytischen (=nicht-adsorbierenden) Bakterien freigewaschen werden.

**Tabelle 10:** Wachstumsmedien zur Anwendung in verschiedenen Isolierungsstrategien

Medium Nummer	Grundmedium	Zusätze
1	GS2	25% Gärrest
2	Leitungswasser	25% Gärrest
3	GS2	15% Rumenextrakt
4	Leitungswasser	40% Rumenextrakt
5	Dilute nutrient broth	10% Gärrest/Rumenextrakt
6	Mineralmedium	Vitaminlösung + Spurenelementlösung
7	Mineralmedium	Vitaminlösung + Spurenelementlösung + 1% Rumen
8	Mineralmedium	Vitaminlösung + Spurenelementlösung + 1% Rumen/Gärrest steril
9	GS2 0.1% Hefeextrakt (GS2 neu)	Vitaminlösung + 1% Rumen/Gärrest steril

### 1.3.4 Thermophile Isolate

Die Identifizierung der Isolate und die phylogenetische Zuordnung erfolgte auf Basis der Sequenzierung der 16s rDNA, welche mit spezifischen Oligonucleotid-Primern von der genomischen DNA der Isolate mit PCR gewonnen wurde. Die Sequenzen wurden mit der NCBI- und der RDP-Datenbank verglichen und bioinformatisch ausgewertet. Diese Methodik wurde in Vorarbeiten bereits optimiert und ist am Lehrstuhl gut etabliert – sie wird hier auch laufend weiterentwickelt (**Abbildung 16**).



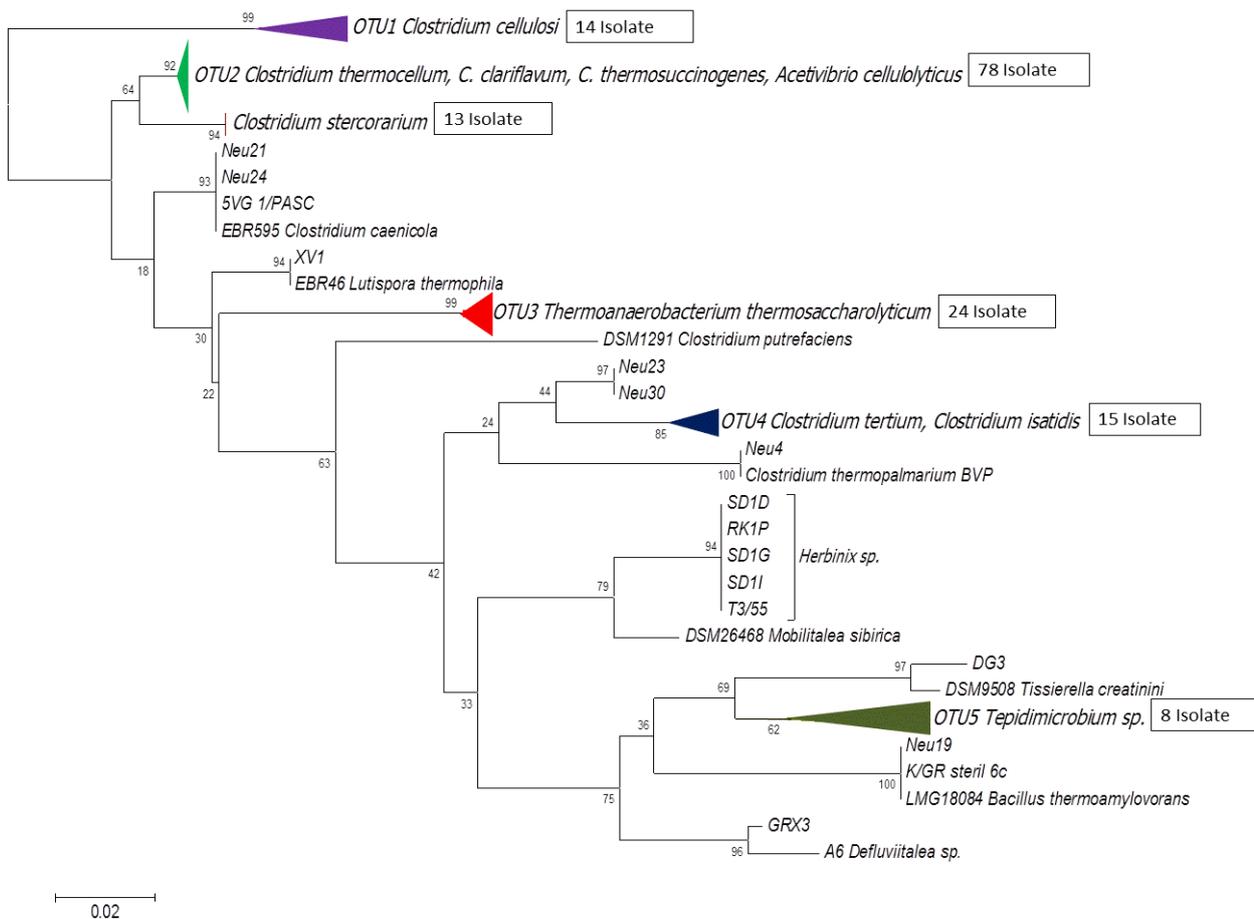
**Abbildung 16:** Zusammenfassung der Identifikationsschritte für ein neues Isolat.

Insgesamt wurden 172 thermophile Reinisolate aus der Biogasanlage Viersen mit den verschiedensten Isolierungsmethoden generiert. Davon sind 91 (56%) in der Lage, in Reinkultur kristalline Cellulose abzubauen. Diese teilen sich auf fünf taxonomische Einheiten auf. Für die genaue Zuordnung zu einzelnen Taxa muss beachtet werden, dass zwei Stämme, die weniger als 97% 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit aufweisen, nicht als derselben Art zugehörig betrachtet werden können. Sequenzähnlichkeiten unter 95% weisen auf unterschiedliche Gattungen hin. Dies muss aber durch andere Methoden wie z.B. DNA-DNA Hybridisierung oder Fettsäureanalyse bestätigt werden (TINDALL *et al.* 2010). Die meisten Isolate konnten aufgrund ihrer 16S rRNA-Sequenzanalysen

bekanntes Spezies zugeordnet werden (91%), wobei von den 15 nicht zuzuordnenden Isolaten acht in der Lage sind, Cellulose zu hydrolysieren. Diese können jedoch zwei nahe verwandten taxonomischen Einheiten zugeordnet werden. Jeweils ein Vertreter wurde für eine weitere, ausführliche Charakterisierung, sowie für die Genomsequenzierung ausgewählt (in fett markiert). Auf diese wird in Kapitel 0 näher eingegangen. **Tabelle 11** zeigt die taxonomische Zuordnung der einzelnen Isolate. Alle Isolate stammen aus dem Phylum Firmicutes und lassen sich wiederum zwei Klassen (Clostridia, Bacilli) zuordnen. Von den 8 isolierten Hauptgattungen gehört jedoch nur *Bacillus* in die Klasse der Bacilli. Der überwiegende Anteil der cellulolytischen Isolate kann der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden.

**Tabelle 11:** Liste aller bisherigen Isolate mit der Zuordnung zu bekannten Spezies anhand der höchsten 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeit (laut NCBI Datenbankvergleich). Isolate wurden der gleichen Zeile zugeordnet, wenn ihre 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeit mindestens 98% betrug. <sup>1</sup>Inc. sed. = *incertae sedis*

Nächster verwandter NCBI Datenbank Treffer		Isolate	Max. Indent. (%)	Indent. Isolate (min. 98 %)	Cellulose-abbau	Strategie
Klasse	Familie					
Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	99%	2	-	1, 2
Clostridia	Clostridiaceae	<i>Clostridium isatidis</i>	99%	2	-	1
		<i>Clostridium putrefaciens</i>	95%	2	-	2
		<i>Clostridium tertium</i>	98%	13	-	1, 2
		<i>Clostridium thermopalmarium</i>	99%	1	-	2
Gracilbacteraceae		<i>Lutispora thermophila</i>	99%	1	-	1
Defluviitaleaceae		<i>Defluviitalea</i> sp.	99%	1	-	1
Lachnospiraceae		<i>Mobilitalea</i> sp.	94%	1	JA	2
		<i>Mobilitalea</i> sp.	95%	8	JA	2, 3
Ruminococcaceae		<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	98%	3	-	2
		<i>Clostridium caenicola</i>	98%	3	-	1, 2
		<i>Clostridium cellulosi</i>	99%	14	JA	1, 2
		<i>Clostridium clariflavum</i>	99%	34	JA	1, 2
		<i>Clostridium stercorarium</i>	98-99%	13	JA	1
		<i>Clostridium thermocellum</i>	99%	27	JA	1, 2, 3
		<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	98%	14	-	1, 2
Inc. sed. <sup>1</sup>		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	99%	24	-	1
		<i>Tissierella creatinini</i>	99%	1	-	1
		<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	97%	2	-	1
		<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	99%	1	-	1
		<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	99%	2	-	1
		<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	97%	2	-	1
		<i>Tepidimicrobium</i> sp.	96%	1	-	1
<b>Summe</b>				<b>172</b>		



**Abbildung 17:** Ungewurzelter phylogenetischer Baum der 16S rRNA Gen-Sequenzen aller thermophilen Isolate und ausgewählter Referenzstämmen unter Verwendung eines maximum likelihood-basierten Algorithmus. Auf den Ästen sind die einzelnen Bootstrap Werte angegeben. Subbäume von taxonomisch eng verwandten Gruppen mit mehr als 5 Isolaten sind in „Operational taxonomic units“ (OTU's) zusammengefasst. Die Höhe des Dreiecks ist abhängig von der Anzahl der Isolate, die Länge ist abhängig vom Maß der Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten einer taxonomischen Einheit. Der Größenbalken indiziert 2% Basenunterschiede.

Vergleicht man die Isolierungsstrategien, so wird deutlich, dass der überwiegende Anteil der Isolate mit Strategie 1 gewonnen wurde (einfache Anreicherung in Flüssigmedium). Vor allem aufgrund der Anreicherung auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Xylan, Cellulose, Maissilage etc.) und der größeren Variation der Medien wurden bei Strategie 1 auch die meisten unterschiedlichen Isolate generiert (**Tabelle 12**). Jedoch waren dies überwiegend Vertreter bereits charakterisierter Spezies. Neue, bisher unbekannte cellulolytische Spezies wurden nur mit Strategie 2 (Verdünnungsreihen in Flüssigmedium) und Strategie 3 (Verdünnungsreihen auf Festmedium) gewonnen. Diese bilden im phylogenetischen Baum aller Isolate ein eigenes Subcluster mit dem erst kürzlich beschriebenen Bakterium *Mobilitalea sibirica* als nächsten Verwandten (PODOSOKORSKAYA *et al.* 2014) (**Abbildung 17**).

**Tabelle 12:** Zusammenfassung der bisherigen Isolate mit drei Isolierungsstrategien

Isolierungsstrategie	Gesamtzahl Isolate	Anhand der 16S rRNA Sequenz unterschiedliche Isolate (min 5% Sequenzunterschied)
1	104 (60,5%)	18
2	54 (31,4%)	12
3	14 (8,1%)	2

Aufgrund fehlender Referenzspektren konnte bis auf *C. thermocellum* keines der Isolate zuverlässig mittels Zellproteinprofilanalyse durch MALDI TOF MS identifiziert werden.

### 1.3.5 Charakterisierung ausgewählter thermophiler Isolate

Insgesamt wurden vier interessant erscheinende thermophile Isolate zur Genomsequenzierung und weiteren Charakterisierung ausgewählt, die in **Tabelle 13** zusammengefasst sind. Die taxonomische Einordnung kann aus **Abbildung 17** und **Tabelle 11** entnommen werden. Auswahlkriterien waren vor allem besondere Eigenschaften (z.B. sehr gute Cellulose-Hydrolyse) und Häufigkeit des Isolates. Bis auf Isolat 1A1 stammen alle Isolate aus der thermophilen Biogasanlage H1 (Viersen). 1A1 wurde aus einer sauren Anreicherungskultur (pH 6,2) von Proben einer thermophilen Biogasanlage bei München isoliert: bei 52°C aus einer Anreicherung in GS2 Medium mit Filterpapier (Isolierungsstrategie 1). In einen zweiten Reinigungsschritt mit Cellobiose statt Cellulose als C-Quelle wurden die Kulturen aufgetrennt. Isolat DG5 wurde ebenfalls mit Strategie 1 aus einer Anreicherung in DNB (dilute nutrient broth) Medium mit 10% Gärrest (v/v) und Filterpapier isoliert. Die Isolate T3/55 und SD1D wurden mit Strategie 2 aus einer Verdünnungsreihe in flüssigem GS2 Medium mit 0,5% steril filtriertem Rumensaft (v/v) gewonnen und mit Agarplatten des selben Mediums mit PASC-Topagar gereinigt.

**Tabelle 13:** Liste der zur genaueren Charakterisierung ausgewählten thermophilen Isolate. BGA = Biogasanlage

Name Isolat	Max. Sequenzident. (NCBI)	Ursprung	EMBL/NCBI Zugangsnummern
<b>1A1</b>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (99%)	Saure (pH 5,6) Anreicherungskultur	Genom: PRJEB6526
<b>T3/55</b>	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i> (100%)	BGA H1 (Viersen)	Genom: CVTD01000001 - CVTD01000075 16S rRNA: LN626355
<b>SD1D</b>	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i> (96%)	BGA H1 (Viersen)	16S rRNA: LN626359
<b>DG5</b>	<i>Clostridium cellulosi</i> (99%)	BGA H1 (Viersen)	Genom: LM995447

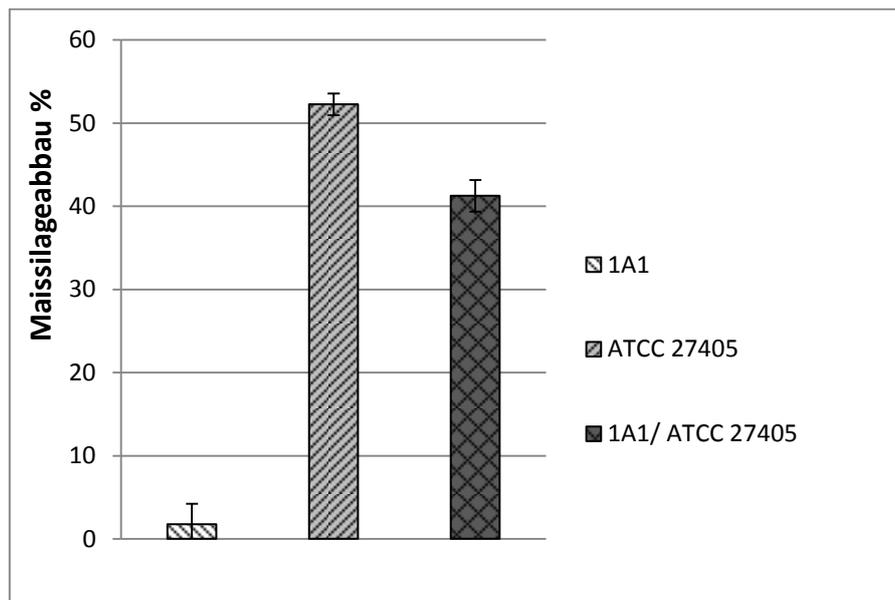
Zur physiologischen Charakterisierung der Isolate wurden zunächst Substratspektrum, Produktspektrum, pH-, Temperaturoptimum und weitere wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 14** zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften von den Isolaten T3/55, SD1D, 1A1, DG5. Filterpapier (Whatman No. 1); n.b. = nicht bestimmt

Charakteristika	1A1	DG5	T3/55	SD1D
Temperatur (°C)	40 - 58	40 - 65	45 - 62	40 - 62
pH	5,4 – 8,5	6,2 – 8,5	6,5 – 9,0	6,5 – 8,5
Katalase	+	–	–	–
Gram Reaktion	+	–	+	+
Flagella	+	+	+	n.b.
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Endosporen	+	+	–	–
Beweglichkeit	+	+	–	–
Abbau von:				
Galactose	+	+	–	+
Arabinose	+	–	+	+
Xylan	+	n.b.	+	–
Xylose	n.b.	+	+	–
Cellulose*	–	+	+	+
Mannose	–	+	+	+
Fructose	+	+	+	–
Sucrose	+	+	+	–
Glucose	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Sorbitol	+	–	+	–
Stärke	+	+	+	+
Haupt-Fermentationsprodukte	Acetat, Ethanol, und Formiat	H <sub>2</sub> , Ethanol, Acetat	H <sub>2</sub> , Ethanol, Acetat, Butyrat, Propionat	H <sub>2</sub> , Ethanol, Acetat, Butyrat

Eine Sequenzierung des 16S rRNA Gens zeigte, dass dieses zu 99% mit der 16S rRNA Gen Sequenz des *Bacillus thermoamylovorans* Typstammes DKP<sup>T</sup> identisch ist. Dies rechtfertigt die Zuordnung von Isolat 1A1 zur Spezies *B. thermoamylovorans*, wobei 1A1 das erste *B. thermoamylovorans* Isolat aus einer industriellen Biogasanlage ist. Bereits bekannte *B. thermoamylovorans* Stämme aus dem Phylum *Firmicutes* und der Familie *Bacillaceae* wurden ursprünglich aus mesophilen Habitaten wie senegalesischem Palmwein, Melkständen, Stroh und Reinräumen der Luft- und Raumfahrt isoliert

(COOREVITS *et al.* 2011, STIEGLMEIER *et al.* 2009). Obwohl *B. thermoamylovorans* 1A1 sein Wachstumsoptimum bei einer Temperatur von 50°C hat und unter 40°C nicht nennenswert wächst, sind andere Isolate dieser Spezies in zahlreichen mesophilen Lebensräumen zu finden. Die Spezies scheint eine wichtige Rolle innerhalb bakterieller Gemeinschaften, die am anaeroben Abbau pflanzlicher Biomasse beteiligt sind, einzunehmen (LAKANIEMI *et al.* 2011, WANG *et al.* 2003). Alle Isolate sind fakultativ anaerob, Gram positiv, amylolytisch und sporulierend. Der Stamm 1A1 wächst anaerob auf diversen Poly- und Monosacchariden wie Xylan, Pectin und Stärke. Dies lässt vermuten, dass er besonders bei leicht sauren pH-Werten eine wichtige Rolle in der hydrolytischen Phase des Biomasseabbaus in Biogasanlagen spielt. Der Typstamm kann dagegen weder auf Xylanen noch auf Pectin wachsen (COMBET-BLANC *et al.* 1995). Da der Stamm *B. thermoamylovorans* 1A1 anfangs in Kokultur mit einem *C. thermocellum* Stamm isoliert wurde, wurde ursprünglich vermutet, dass beim Abbau von natürlichem Substrat (Maissilage) ein Synergismus besteht. Dies konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden (**Abbildung 18**).



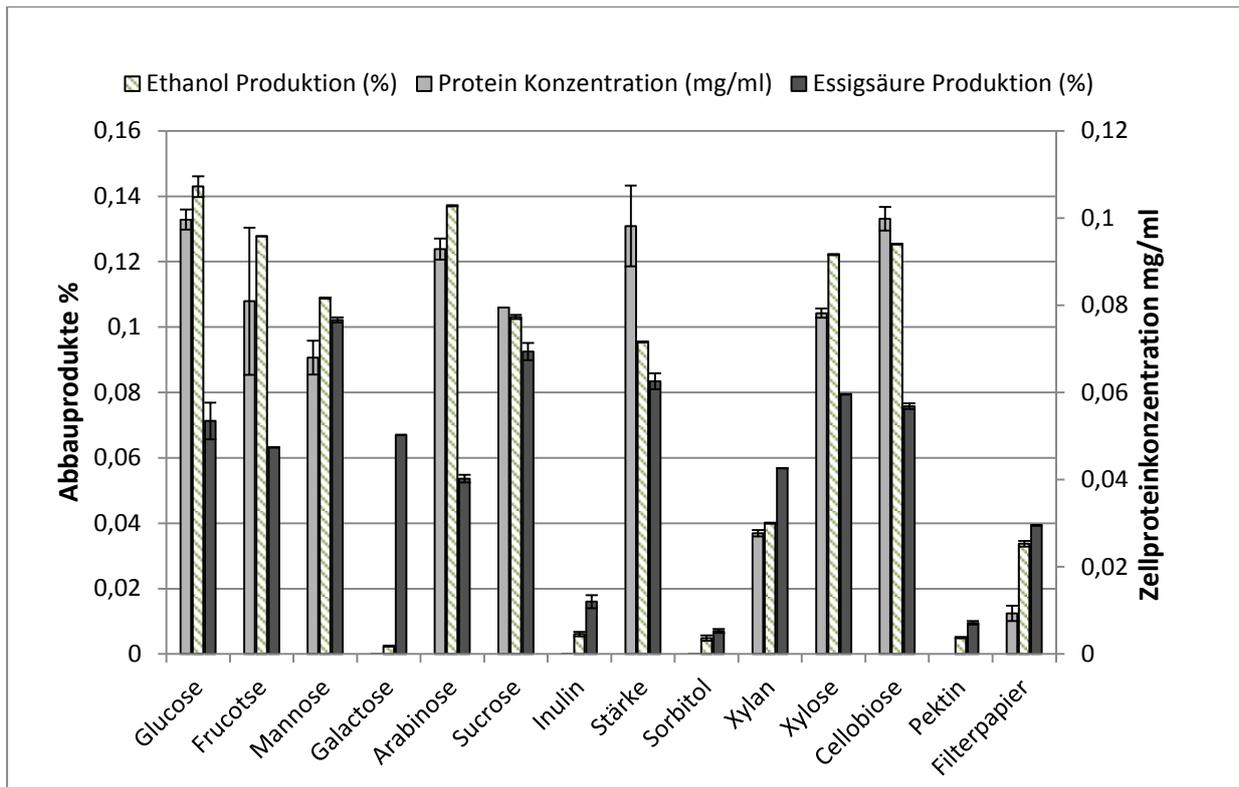
**Abbildung18:** Abbau von Maissilage durch *Clostridium thermocellum* ATCC 27405, *Bacillus thermoamylovorans* 1A1 und einer Kokultur aus beiden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei Messwerten

Das Isolat DG5 konnte aufgrund einer 99%igen Sequenzübereinstimmung mit dem Typstamm AS 1.1777 der Spezies *Clostridium cellulosi* zugeordnet werden. *Clostridium cellulosi* gehört innerhalb des Phylums Firmicutes zur Familie der *Ruminococcaceae* und wurde bisher nur aus Kuhmist und Kompost isoliert (HE *et al.* 1991, YUTIN & GALPERIN 2013). Es handelt sich um ein thermophiles, cellulolytisches Bakterium, welches Wasserstoff, Ethanol und Acetat als Fermentationsprodukte produziert. *C. cellulosi* DG5 ist ein beweglicher Sporulierer, der optimal zwischen 55 und 60°C und bei pH 7,3

– 7,5 wächst (**Tabelle 14**). Genauso wie der Typstamm AS 1.1777 konnte das neue Isolat anaerob eine große Bandbreite an Poly- und Monosacchariden verstoffwechseln (HE *et al.* 1991). DG5 ist das erste bekannte *C. cellulosi* Isolat, welches aus einer großtechnischen Biogasanlage stammt. Bisher konnte *C. cellulosi* in Metagenomanalysen von Biogasfermentern nicht als Bestandteil des für die Hydrolyse verantwortlichen mikrobiellen Konsortiums identifiziert werden (KRAUSE *et al.* 2008, SCHLUTER *et al.* 2008, WIRTH *et al.* 2012). Allerdings weisen aktuelle Ergebnisse von anderen Studien darauf hin, dass diese Spezies eine wichtige Rolle bei der Substrathydrolyse in Biogasanlagen spielen könnte (NISSILA *et al.* 2011, UENO *et al.* 2001, ZHANG *et al.* 2014). DGGE (diskontinuierliche Gradientengelelektrophorese) Analysen haben gezeigt, dass in Kompostproben vor allem mit *C. cellulosi*, *C. stercorarium* und *C. thermocellum* eng verwandte Bakterien für den Celluloseabbau verantwortlich sind (NISSILA *et al.* 2011, UENO *et al.* 2001). Dabei sind vor allem *C. cellulosi* und *C. stercorarium* verantwortlich für den Hemicelluloseabbau (NISSILA *et al.* 2011). ZHANG *et al.* haben einen neuen Stamm von *C. stercorarium* (CS-3-2) und *C. cellulosi* (CS-4-4) aus verrottenden Strohhalmen isoliert (ZHANG *et al.* 2014). Die Endo-Glucanase- und Exo-Glucanase-Aktivitäten im Kulturüberstand von Stamm CS-4-4 waren etwa 3 bis 5 mal höher als die von *C. stercorarium* CS-3-2, was wiederum ein Hinweis auf das hohe Lignocellulose-Hydrolysepotential von *C. cellulosi* ist (ZHANG *et al.* 2014). Außerdem konnte *C. cellulosi* eine größere Bandbreite verschiedener Kohlenhydrate abbauen als *C. stercorarium* und *C. thermocellum* (HE *et al.* 1991).

Die Isolate SD1D und T3/55 bilden, basierend auf den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA Gensequenzen, einen neuen Genus innerhalb der Familie *Lachnospiraceae*. *Lachnospiraceae* ist eine Familie innerhalb der Clostridia, welche bisher hauptsächlich Mikroorganismen des Gastrointestinal-Traktes von Säugetieren beinhaltet (MEEHAN & BEIKO 2014), speziell bei Wiederkäuern (KITTELMANN *et al.* 2013) und Menschen (GOSALBES *et al.* 2011). Vertreter der Familie sind dabei hauptsächlich verantwortlich für den Abbau von komplexem Pflanzenmaterial. Die Familie *Lachnospiraceae* wurde erstmals von RAINEY (2009) auf Basis von phylogenetischen Analysen der 16S rRNA Gensequenzen beschrieben (EUZEBY 2010, LUDWIG *et al.* 2009). Die Familie umfasst derzeit 25 Genera (PARTE 2014). Alle Spezies sind strikt anaerob und bilden keine Sporen. Sequenzähnlichkeitsberechnungen mit der kompletten 16S rRNA Sequenz von Isolat T3/55 ergaben *Mobilitalea sibirica* als nächsten Verwandten unter den gültig beschriebenen Taxa, mit nur 93,9% 16S rRNA Sequenzähnlichkeit. Daher repräsentiert das Isolat T3/55 den Typstamm der kürzlich im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen neuen Gattung und Spezies *Herbinix hemicellulosilytica* (KOECK *et al.* 2015b). Das Isolat SD1D gehört mit 97% Sequenzähnlichkeit zu T3/55 auch zur Gattung *Herbinix*, zählt allerdings zu einer bisher nicht beschriebenen neuen Spezies (TINDALL *et al.* 2010). Beide Isolate unterscheiden sich vor allem in ihrem Substratspektrum und in ihrer Salztoleranz. T3/55 war in der Lage, eine größere Bandbreite an Kohlenhydraten zu verstoffwechseln als SD1D, darunter Xylan, Xylose, Fructose, Sorbitol und Sucrose. SD1D konnte dafür im Gegensatz zu T3/55 auf Galactose wachsen (**Ta-**

**belle 14).** Während Isolat SD1D bei 4% NaCl (w/v) im Medium noch problemlos wächst, toleriert Isolat T3/55 maximal 1% NaCl. Morphologie und Produktspektrum waren weitgehend identisch. Ein Vergleich des Zellwachstums von T3/55, basierend auf der Zellproteinkonzentration, auf verschiedenen Substraten mit der Konzentration der Abbauprodukte zeigte eine direkte Korrelation. Von den Substraten, auf denen die Zellen am besten wuchsen, konnten auch die höchsten Konzentrationen der Abbauprodukte gemessen werden (**Abbildung 19**).



**Abbildung19:** Vergleich der Zellproteinkonzentration von T3/55 auf verschiedenen Substraten mit der Konzentration der Abbauprodukte nach sieben Tagen Inkubation bei 55°C in GS2 Medium

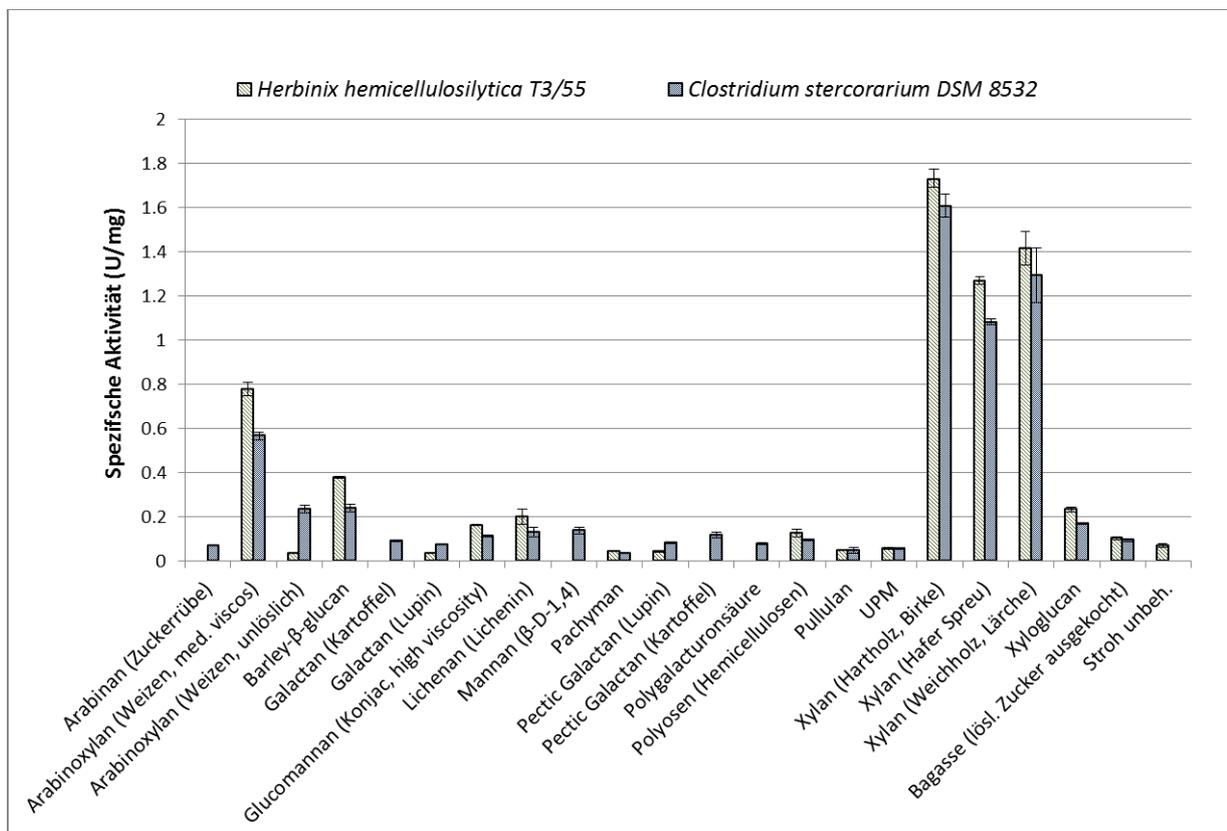
Die Aktivität der Enzyme von SD1D und T3/55 im Zellüberstand wurde zunächst auf Xylan,  $\beta$ -Glucan, CMC, PASC und Avicel getestet (**Tabelle 15**). Die Aktivität der beiden Isolate auf CMC ist gleich, von den anderen Substraten setzen die Enzyme von SD1D mehr reduzierende Zuckerenden frei. Selbst auf Xylan ist die Aktivität von SD1D höher, obwohl das Isolat nicht auf Xylan wachsen konnte. Beide Isolate konnten Cellulose (Filterpapier) abbauen und zeigten auch Enzymaktivität auf kristalliner Cellulose (Avicel).

**Tabelle15:** Spezifische Aktivität (U/mg) der Proteine im Kulturüberstand von Isolat T3/55 und SD1D auf verschiedenen Substraten mit Standardabweichung von drei Messwerten

Isolate	Xylan	β-Glucan	CMC	PASC	Avicel
T3/55	2,27 +/- 0,13	0,23 +/- 0,001	0,09 +/- 0,002	0,02 +/- 0,0007	0,008 +/- 8,66 * 10 <sup>-6</sup>
SD1D	3,58 +/- 0,0003	1,28 +/- 0,05	0,09 +/- 0,003	0,06 +/- 0,0012	0,02 +/- 0,0003

Exemplarisch für beide Vertreter der neuen Gattung *Herbinix* wurden mit dem Isolat T3/55 weitere Enzym- und Physiologietests durchgeführt.

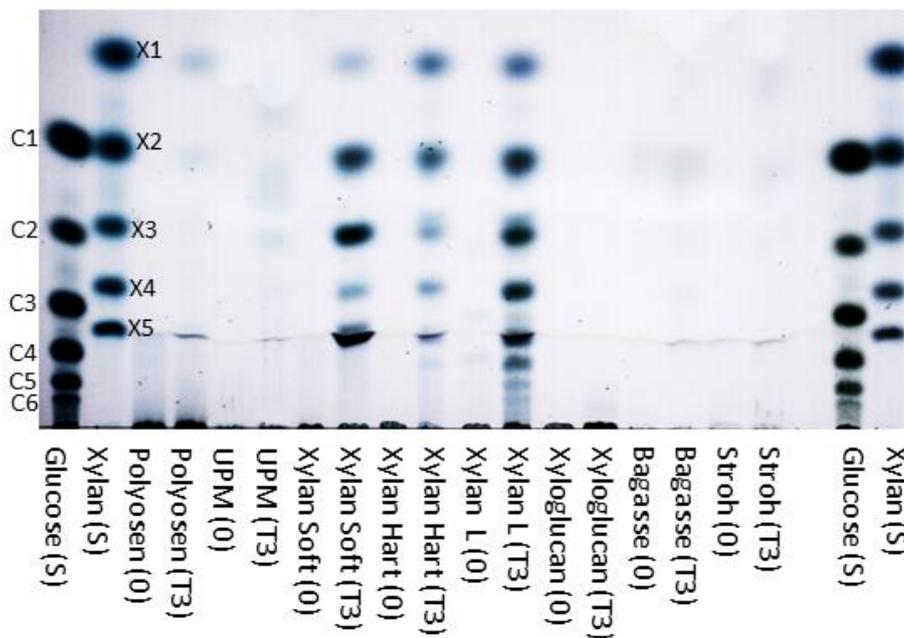
Da T3/55 das breitere Substratspektrum hat, wurde die Enzymaktivität des Zellüberstands zusätzlich auf diversen Hemicellulosen getestet. Dabei wurde *Clostridium stercorarium* DSM 8532 Zellüberstand, welcher für sein gutes hemicellulolytisches Potential bekannt ist, zum Vergleich heran gezogen (ZHANG *et al.* 2014). Besonders auf den Xylanen ist die spezifische Enzymaktivität von *Herbinix hemicellulosilytica* (T3/55) höher als in den Vergleichsproben von *Clostridium stercorarium* (**Abbildung 20**). Eine zweite Messung auf unlöslichem und viskosem Arabinoxylan zeigte, dass T3/55 auch auf diesen Substraten eine höhere Aktivität aufweist.



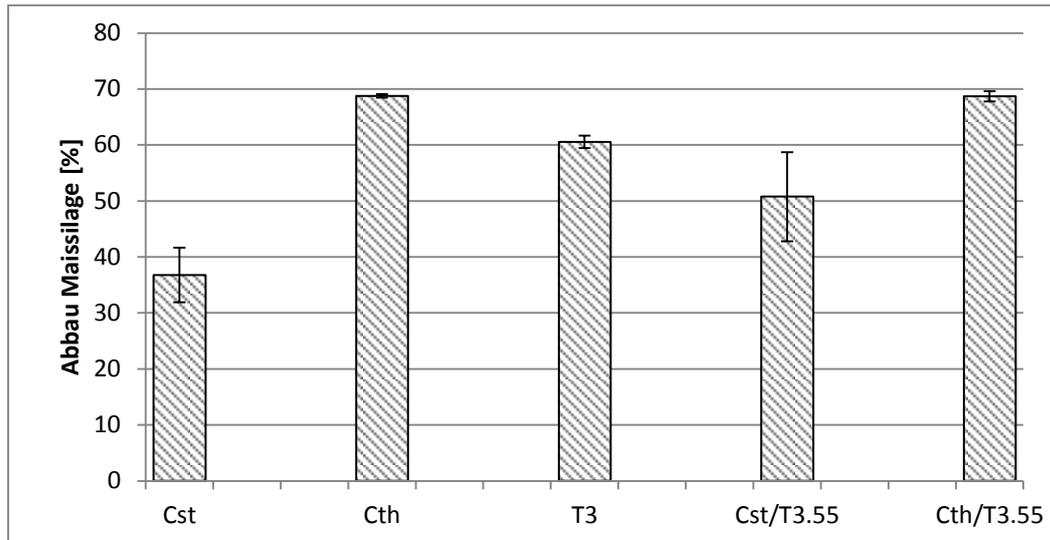
**Abbildung 20:** Spezifische Aktivität in Units pro Milligramm Protein im Kulturüberstand von *C. stercorarium* (DSM 8532) und *Herbinix hemicellulosilytica* (T3/55) Zellüberstand auf diversen hemicellulosehaltigen Substraten

Von den Substraten, auf denen mit DNSA-Tests Enzymaktivität des T3/55 Zellüberstands messbar war, wurden zusätzlich Dünnschichtchromatographien zur Analyse des Produktspektrums angefertigt. Auch hier war der höchste Abbaugrad bei den Xylanen zu sehen (**Abbildung 21**). Alle Xylane konnten von den Enzymen des Zellüberstandes bis zu Xylose abgebaut werden (X1). Bei Xyloglucan, Stroh und Bagasse waren im Gegensatz zu den DNSA Tests keine Abbauprodukte erkennbar.

Zusätzlich wurde der Abbau von natürlichem Substrat (Maissilage) getestet. Hierbei wurde der prozentuale Abbau von *C. stercorarium* DSM 8532 (Cst), *C. thermocellum* ATCC 27405 (Cth), den jeweiligen Mischkulturen T3/55-Cst, T3/55-Cth und *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55 einzeln getestet. Den höchsten Abbaugrad erreichte mit fast 70% *C. thermocellum*, gefolgt von T3/55 mit 60% und *C. stercorarium* mit nur 35%. Es konnte kein synergistischer Abbau der beiden Mischkulturen festgestellt werden (**Abbildung 22**).



**Abbildung 21:** Dünnschichtchromatographie von T3/55 Zellüberstand auf ausgewählten Hemicellulosen. T3 = T3/55, 0 = negativ Kontrolle; S = Standard



**Abbildung 22:** Messung des Abbaugrads von gewaschener Maisilage (~0,5 g in GS2 Medium); Cst = *Clostridium stercorarium*; Cth = *Clostridium thermocellum*; T3.55 = *Herbinix hemicellulosilytica*

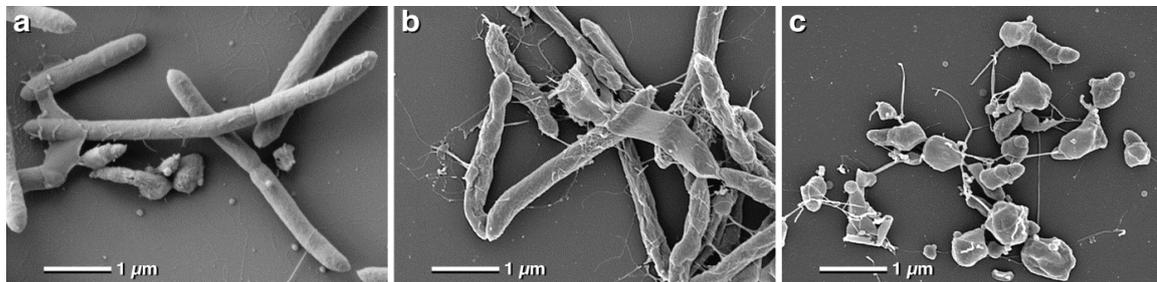
Des Weiteren wurde als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen eng verwandten Spezies das zelluläre Fettsäuremuster bestimmt. Die häufigsten Fettsäuren in T3/55 Zellen waren 16:0 DMA (Dimethylacetal), 16:0 FAME (Fettsäuremethylester) und 16:0 ALDE (Aldehyd) (**Tabelle 16**).

**Tabelle 16:** Zelluläres Fettsäuremuster (> 1%) von *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55.. \*Gruppe 1 enthielt 13:1 CIS 12 FAME und 14:0 ALDE; Gruppe 4 enthielt eine unbekannte Fettsäure und 15:2 FAME; Gruppe 6 enthielt 15:0 anteiso 3OH FAME und 16:1 CIS 7 DMA; Gruppe 8 enthielt 17:1 CIS 9 FAME und 17:2 FAME; Gruppe 10 enthielt 18:1c11/t9/t6 FAME eine unbekannte Fettsäure.

Fettsäure	[%]
14:0 FAME	1.79
14:0 DMA	2.82
16:0 ALDE	11.48
16:0 FAME	37.51
16.1 CIS 9 DMA	1.27
16:0 DMA	21.56
18:0 FAME	1.73
18.1 CIS 9 DMA	1.27
18.1 CIS 11 DMA	5.77
Gruppe 1*	1.67
Gruppe 4*	1.67
Gruppe 6*	1.76
Gruppe 8*	2.91
Gruppe 10*	2.50

Mit dem Enterotube II lieferten folgende Tests ein negatives Ergebniss für T3/55: Sulfat Reduktion, Indolbildung, Lactosefermentation, Dulcitolfermentation, Desaminierung von Phenylalanin und Citratabbau. Harnstoff konnte von T3/55 verstoffwechselt werden.

Außerdem wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen des neuen Isolats angefertigt. T3/55 bildet regelmäßige Stäbchen mit abgerundeten Enden, die von feinen geißelartigen Strukturen umgeben sind (**Abbildung 23a**). Bemerkenswert ist, dass die Zellstruktur sich nach drei Kultivierungstagen anfängt aufzulösen und die Zellen nach fünf Tagen vollständig kollabiert sind (**Abbildung 23 b, c**). Dieser Umstand und die Tatsache, dass die Kultur keine Sporen bildet, erschwert die Kultivierung von T3/55. Bei Isolat SD1D konnte unter dem Lichtmikroskop ähnliches beobachtet werden.



**Abbildung 23:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von T3/55 Zellen nach einem (a), drei (b) und fünf (c) Tagen Kultivierung in GS2 Medium bei 55°C (KOECK *et al.* 2015b)

#### 1.3.5.1 Genomsequenzierung ausgewählter thermophiler Isolate -> Kooperation CeBiTec

Vor allem um Erkenntnisse zur Ausstattung mit Glykosylhydrolasen für den Abbau von Biomasse und über die Beschaffenheit und Art des cellulolytischen Systems (falls vorhanden) zu erhalten, wurden von allen thermophilen Isolaten, die zur Charakterisierung ausgewählt wurden, die Genome sequenziert. Die Sequenzierung und Auswertung der Genomdaten erfolgte größtenteils beim Projektpartner CeBiTec. Die Genominformationen liefern in Kombination mit Metagenomdaten zudem wichtige Einblicke in die Rolle und Abundanz eines Isolats innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft in der Biogasanlage. In **Tabelle 17** sind zunächst die grundlegenden Eigenschaften der sequenzierten Genome zusammengefasst.

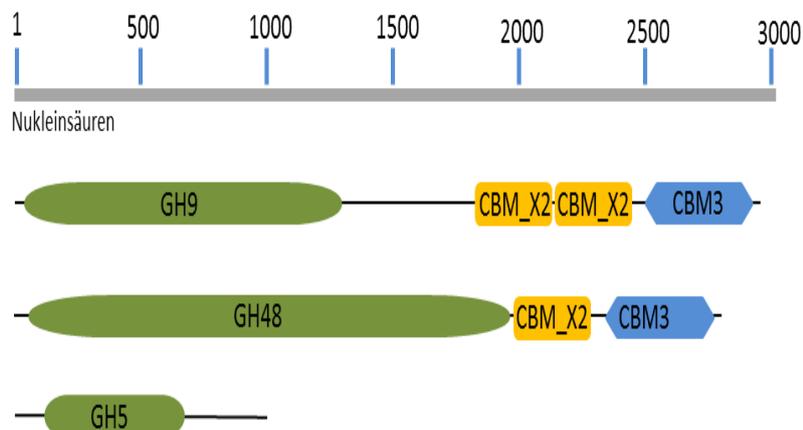
**Tabelle17:** Eigenschaften der von den Isolaten 1A1, T3/55, SD1D und DG5 sequenzierten Genome

Eigenschaft	1A1 (KOECK et al. 2014c)	T3/55 (KOECK et al. in prep.)	SD1D	DG5 (KOECK et al. 2014b)
Größe [bp]	3.708.331	3.037.031	2.567.185	2.229.578
GC Gehalt [%]	37,28	36,69	35,13	44,15
Gesamtzahl Gene	3536	2681	2340	2088
rRNA Operons	10	4	4	4
tRNAs	59	35	49	59
Protein kodierende Sequenzen (cds)	3472	-	-	2017
Genes mit einer bekannten Funktion	2112	1187	-	1069

### 1.3.5.2 Charakterisierung des cellulolytischen Systems von Isolat T3/55

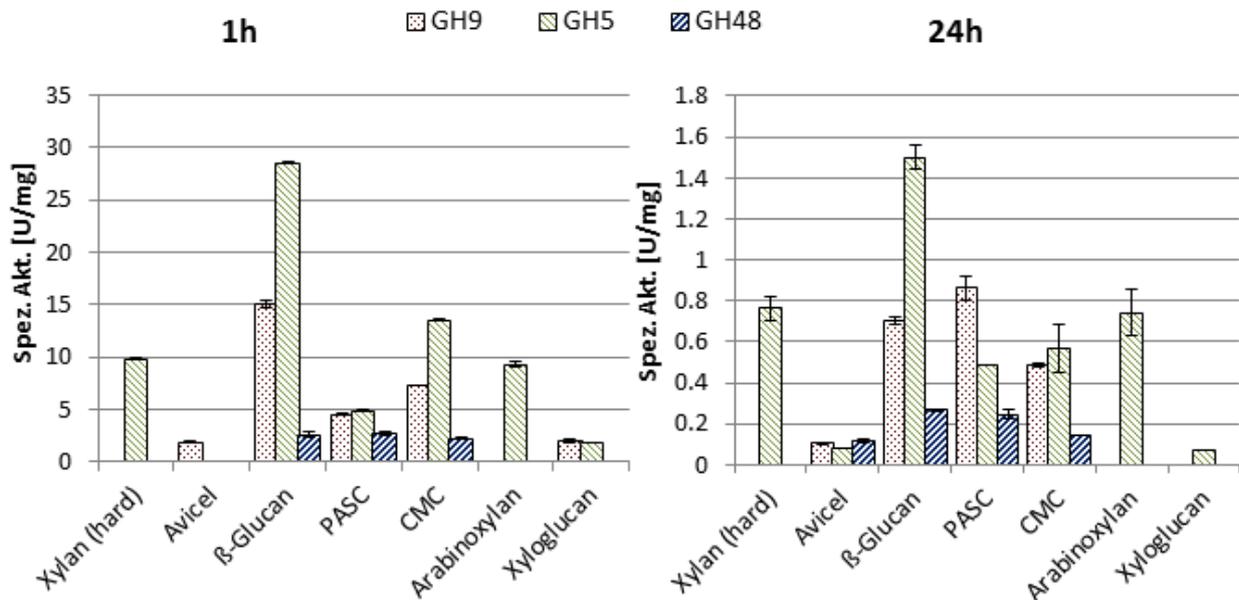
Da die Isolate T3/55 und SD1D eine neue Gattung bisher nicht bekannter cellulolytischer Bakterien darstellen, wurde exemplarisch für diese Gruppe das cellulolytische System von *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55 genauer charakterisiert. Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, konnten drei potentielle Cellulasen identifiziert werden, die der GH Familie 5, 9 und 48 zuzuordnen sind.

GH Familie	Max. Sequenzidentität (NCBI)	Lokalisation
GH9	Endo-1,4-beta-glucanase (EC 3.2.1.4)	TUM355_rep1_2138
GH48	1,4-beta-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)	TUM355_rep1_2139
GH5	Endo-1,4-beta-glucanase (EC 3.2.1.4)	TUM355_rep1_438



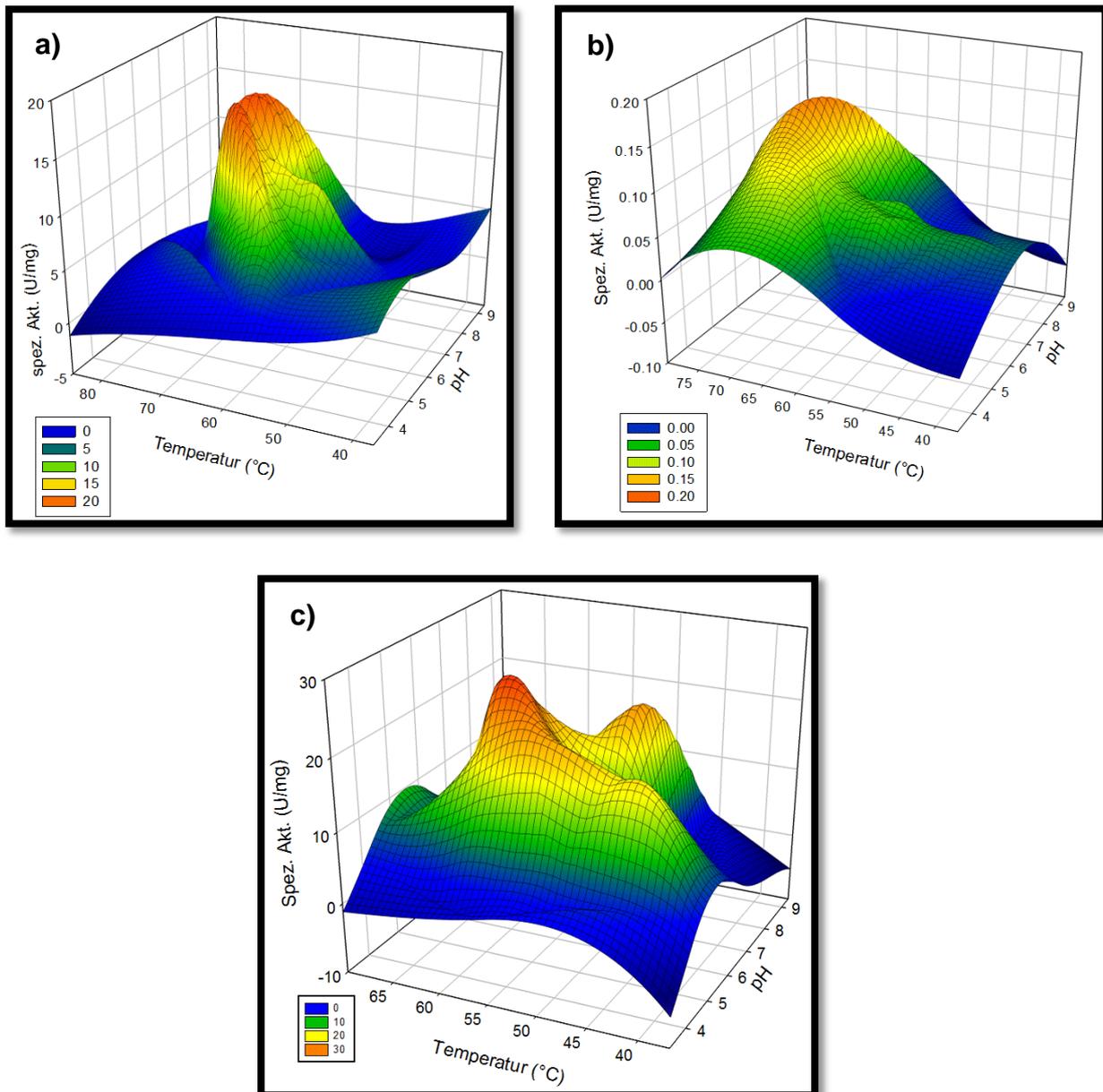
**Abbildung 24:** Potentielle Cellulasen im T3/55 Genom. Oben: Protein-BLAST der Aminosäuresequenz und Lokalisation des Gens im Genom von T3/55. Unten: Vorhergesagte Domänenstruktur der potentiellen Cellulasen.

In **Abbildung 24** ist die Domänenstruktur dargestellt. Die GH9- und GH48-Module besitzen neben dem katalytischen Glycosylhydrolase-Modul noch Cellulosebindemodule der Gruppe X2 und 3, welche dafür verantwortlich sind, das Substrat zu binden und in der Nähe des Enzyms zu halten. Die GH5 wurden ebenso wie die GH9 als Endo-Glucanase klassifiziert, besitzt jedoch kein zusätzliches Bindemodul. Die potentiellen Cellulasen wurden in einen Expressionsvektor (pET24) kloniert und in den Expressionsstamm BL21Star transformiert. Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung der Proteine wurde die Aktivität mit Aktivitätsassays auf diversen Substraten getestet und mittels kolorimetrischer Reaktion von DNSA mit entstandenen reduzierenden Enden ausgewertet. Nach einer Stunde Inkubation auf den Substraten zeigten die GH5 und die GH9 die höchste Aktivität auf  $\beta$ -Glucan, GH48 dagegen auf PASC. Die glycosidische Bindung zwischen den  $\beta$ -D-Glucopyranose-Einheiten von  $\beta$ -Glucan, PASC und CMC konnte von allen drei Enzymen hydrolysiert werden. Nur das Enzym mit dem GH9 Modul war in der Lage, die kristalline Struktur von Avicel (kristalline Cellulose) messbar aufzubrechen und geringe Mengen reduzierender Zucker freizusetzen. Jedoch konnte Avicel nach einer längeren Inkubationszeit (24 Stunden) von allen Enzymen angegriffen werden. Auf Xylan und Arabinoxylan war auch nach 24 Stunden nur die GH5 in der Lage, die  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung zwischen den  $\beta$ -D-Xylopyranose-Einheiten zu hydrolysieren (**Abbildung 25**).



**Abbildung 25:** Spezifische Aktivität in Units pro Milligramm Enzym der T3/55 Cellulasen. Links nach einer Stunde Inkubation bei 55°C (1h). Rechts nach 24 Stunden Inkubation bei 55°C (24h).

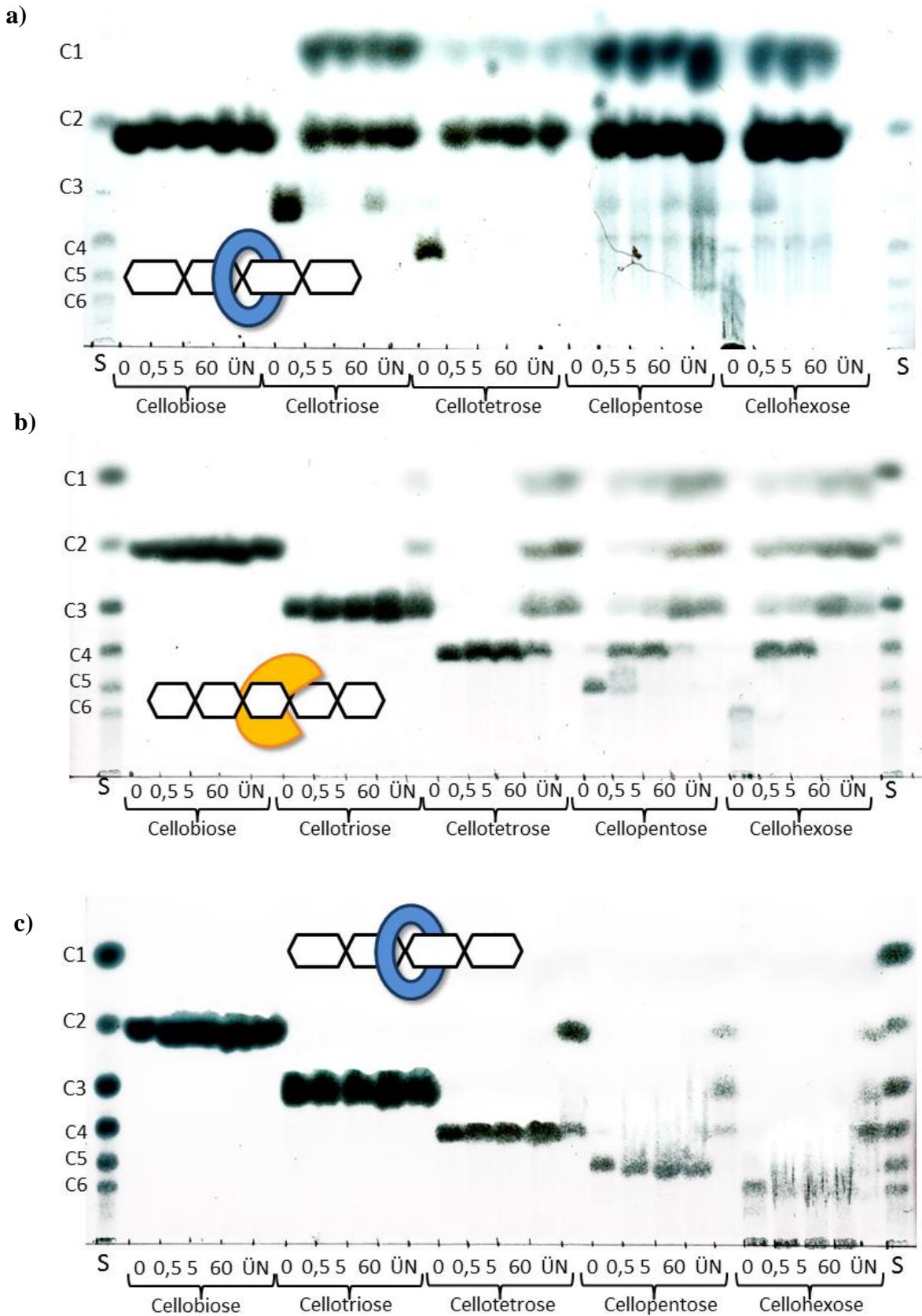
Als nächstes wurden pH- und Temperaturoptimum der Cellulasen anhand der Aktivität nach 2h Inkubation auf PASC (GH48) und  $\beta$ -Glucan (GH9, GH5) bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen bestimmt.



**Abbildung 26:** pH und Temperaturoptimum des GH9 (a), GH48 (b) und GH5 (c) Enzyms von Isolat T3/55 dargestellt als 3D Plot. Die Farbskala zeigt die spezifische Aktivität in U/mg an

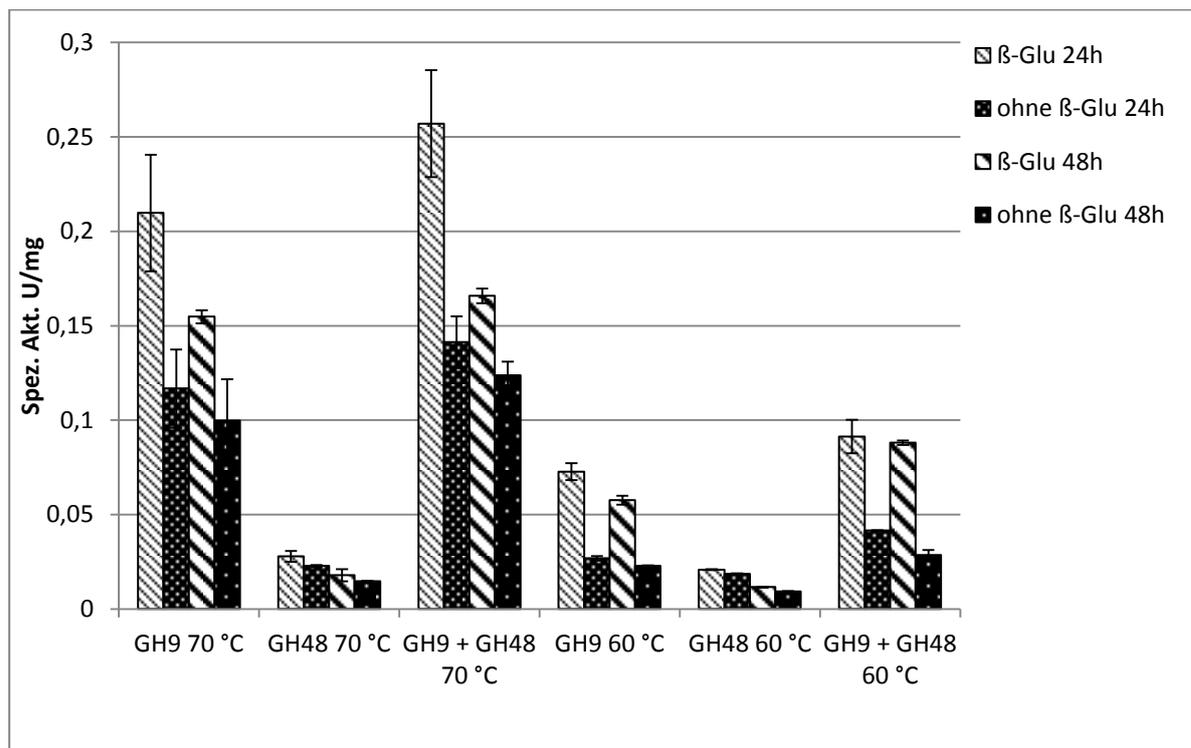
Das GH9 Enzym zeigte ein Optimum der Aktivität bei pH 6,2 und 70°C; das GH48 Enzym bei pH 6,2 und 70°C und schließlich das GH5 Enzym bei pH 5,5 und 60°C. Das pH Optimum der Enzymaktivität liegt damit deutlich unter dem pH-Wert des Wachstumsoptimums des Wirtsbakteriums (**Tabelle 14, Abbildung 26**). Dies gewährleistet eine stabile Hydrolyse auch in leicht saurem Milieu. Bemerkenswert ist, dass sowohl das pH- als auch das Temperaturoptimum der GH5 deutlich unter denen der beiden anderen Enzyme lag. Zur genaueren Untersuchung des katalytischen Typs wurden von den Enzymen Kinetiken auf Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose, Cellopentaose und Cellohexaose angefertigt.

Entgegen dem Ergebnis des Aminosäuresequenzvergleichs mit der Datenbank, welcher auf eine Endo-Glucanase hinwies, verhielt sich die GH5 in den Abbautests wie eine Exo-Glucanase (Cellobiohydrolase), welche die  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung nach jedem zweiten Glucose-Molekül spaltet (**Abbildung 27a**). Cellobiose wurde nicht weiter abgebaut. Die GH9 hat eine sogenannte prozessive Endo-Glucanase-Aktivität, welche innerhalb des Moleküls hydrolysiert und dann prozessiv Cellobiose abspaltet (**Abbildung 27b**). Die minimale Substratgröße ist Cellotriose. Die GH48 ist wiederum eine Cellobiohydrolase mit sehr schwacher Aktivität, welche die  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung immer nach zwei Glucose-Molekülen spaltet. Die minimale Substratgröße ist die Cellotetrose. Cellobiose und Cellotriose wurden nicht abgebaut (**Abbildung 27c**).



**Abbildung 27:** Dünnschichtchromatographien zur Darstellung der Enzymaktivität auf  $\beta$ -1-4-glycosidisch verknüpften Oligosacchariden nach 0, 0,5, 5 und 60 Minuten sowie über Nacht (ÜN). a) Enzymkinetik T3/55 GH5; b) Enzymkinetik T3/55 GH9; c) Enzymkinetik T3/55 GH48

Um einen vermuteten Synergismus der Endo- und Exo-Glucanase (GH9 und GH48) von Isolat T3/55 beim Abbau von Cellulose aufzudecken, wurde die GH9 äquimolar mit der GH48 gemischt und die Aktivitäten auf PASC mit den Aktivitäten der gleichen Konzentrationen der Einzelenzyme verglichen (**Abbildung 28**). Dabei wurde in einem Ansatz zusätzlich die  $\beta$ -Glucosidase BglT aus *Thermus thermophilus* zugegeben, um die verbleibende Cellobiose vollständig zu Glucose abzubauen (DION *et al.* 1999), da für Cellobiose in vielen Fällen eine Endprodukthemmung für Enzyme dieses Typs gezeigt worden ist.



**Abbildung 28:** Spezifische Aktivitäten in Units pro Milligramm Enzym von GH9 und GH48 Enzymmischungen und Einzelenzymen aus Isolat T3/55 auf PASC mit und ohne  $\beta$ -Glucosidase BglT ( $\beta$ -Glu). Messung nach 24 bzw. 48 Stunden (h)

Die geringste hydrolytische Aktivität zeigte die GH48 bei 60°C. Generell waren die Aktivitäten bei 60°C geringer, da das Aktivitätsoptimum der Enzyme bei 70°C liegt (**Abbildung 28**). Die höchste Aktivität wurde mit einer Kombination von GH9 und GH48 und Inkubation bei 70°C erreicht. Die  $\beta$ -Glucosidase hydrolysiert Cellobiose, das Endprodukt der Hydrolyse durch die Cellulasen, zu zwei Glucose-Einheiten, wodurch ein weiteres reduzierendes Ende entsteht. Dadurch konnte die spezifische Aktivität durch Zugabe von  $\beta$ -Glucosidase noch einmal deutlich gesteigert werden.

Da der Zellüberstand von Isolat *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55 besonders aktiv auf Xylanen war (**Abbildung 20**) wurde das Genom zusätzlich nach GH Modulen durchsucht, die potentielle Xylanase-Aktivität besitzen. Dabei wurden 12 mögliche Xylanasen

identifiziert (**Tabelle 18**). Analog zu den Cellulasen wurden die entsprechenden Leserahmen in *E. coli* kloniert und die Proteine rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Von den gereinigten Proteinen wurde die Aktivität mit DNSA Tests auf diversen Substraten getestet.

Die Enzyme X1 und X4 besitzen beide ein GH51 Modul und zeigen nur auf Arabinan Aktivität. Beide Enzyme wurden somit als alpha-L-Arabinofuranosidase annotiert. Diese hydrolysieren von den nicht reduzierenden Enden in Arabinan (1,3 und/oder 1,5 glycosidisch verknüpfte Arabinose) alpha-L-Arabinofuranosereste (Arabinose). Die beiden Arabinofuranosidasen sind allerdings nicht auf den Arabinanresten in Arabinogalactan oder den 2,3-verknüpften Arabinosen in Arabinoxylan aktiv. Die restlichen Enzyme besitzen ein katalytisches Modul der GH-Familie 10 oder 11 und wurden als 1,4-beta-Xylanase annotiert. Diese Enzymklasse katalysiert die Hydrolyse von 1,4-β-D-Xylanen durch die Spaltung der glycosidischen Bindung innerhalb des Moleküls. Wie aus **Tabelle 19** ersichtlich ist, sind die Enzyme der beiden Enzymklassen aus Isolat T3/55 sowohl auf Arabinoxylanen als auch auf Glucuronoxylanen aktiv. Die putativen Enzyme X2, X3 und X7 waren auf keinem der getesteten Substrate aktiv. Das katalytische Modul dieser Enzyme wurde entweder der GH43- oder der GH39-Familie zugeordnet. Einige Enzyme der Familie GH43 können sukzessiv D-Xylose Reste vom reduzierenden Ende der Xylane freisetzen oder spalten Oligosaccharide in Xylose. Von den drei Enzymen mit einem GH43 Modul zeigte allerdings nur X12 auf Birkenxylan geringe Aktivität.

**Tabelle 18:** Potentielle Xylanasen im T3/55 Genom. GH Familie, Proteinblast (NCBI blastp) der Aminosäuresequenz und Lokalisation des Gens im Genom von *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55.

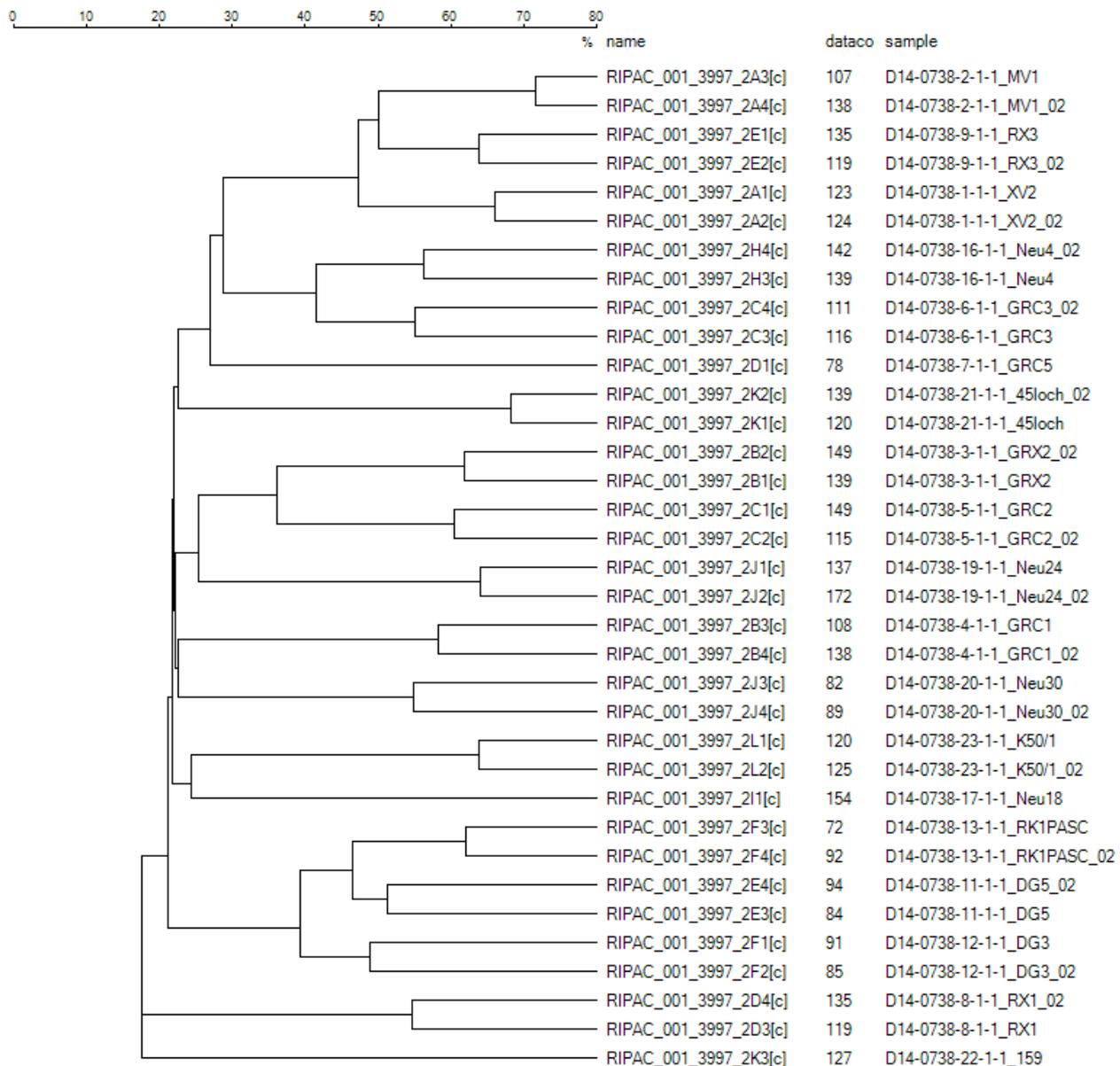
Name	GH Familie	Max. Sequenzidentität (NCBI)	Lokalisation
X1	GH51	Alpha-L-Arabinofuranosidase ( EC 3.2.1.55)	TUM355_rep1_1502
X2	GH39	Alpha-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	TUM355_rep1_1501
X3	GH43	1,4-beta-Xylosidase (EC 3.2.1.37 )	TUM355_rep1_1505
X4	GH51	Alpha-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	TUM355_rep1_810
X5	GH11	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_1528
X6	GH10	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_1554
X7	GH43	Alpha-N-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	TUM355_rep1_2049
X8	GH10	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_2050
X9	GH11	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_269
X10	GH10	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_698
X11	GH10	Endo-1,4-beta-Xylanase (EC 3.2.1.8)	TUM355_rep1_905
X12	GH43	1,4-beta-Xylosidase (EC 3.2.1.37)	TUM355_rep1_929

**Tabelle 19:** DNSA Assay zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der putativen Xylanasen von Isolat *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55 auf diversen Substraten. Ausgedrückt als  $\mu\text{mol}$  Glucose Äquivalent pro mg Zellprotein und Minute (U/mg). Von jeder Proteinprobe wurden zwei Replikate gemessen. Auf den Substraten Arabinogalactan, Glucomannan, Galactomannan, Inulin, Laminarin, Lichenan, Pachyman, Pectin, Pullulan, Polygalacturonsäure, Xyloglucan war keines der Enzyme aktiv.

Substrat	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
Arabinan (Zuckerrübe)	0.11	0	0	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0
Arabinoxylan (medium viskos)	0	0	0	0	2.77	2.66	0	0.74	3.01	3.39	3.59	0
Arabinoxylan (unlöslich)	0	0	0	0	1.27	1.27	0	0.10	1.07	1.47	0.94	0
Mannan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0
Xylan (Birke, Hartholz)	0	0	0	0	3.31	3.05	0	0.10	2.32	3.41	3.12	0.26
Xylan (Haferspelzen)	0	0	0	0	3.51	5.18	0	0.20	1.68	3.26	3.19	0
Xylan (Lärche, Weichholz)	0	0	0	0	0	0.07	0	0	0	0	0.11	0

### 1.3.6 Hochdurchsatz Identifizierung von Isolaten mittels MALDI-TOS MS (RIPAC)

Ausgewählte thermophile Isolate wurden zusätzlich einer MALDI-TOF MS Analytik unterzogen, welche von der Firma RIPAC (Potsdam) durchgeführt wurde. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abbildung 29** und **Tabelle 20** dargestellt.



**Abbildung 29:** SARAMIS MALDI-TOF MS Clusteranalysen der Spektren unterschiedlicher Isolate aus ausgewählten Biogasanlagen

Tabelle 20: Ergebnisse der MALDI-TOF MS Zellproteinprofilanalyse wichtiger Isolate

NCBI Datenbankvergleich	Isolat	Max. Ident. [%]	Anzahl identischer Isolate (es wurde jeweils nur eines zur Analyse)	Cellulose Abbau	Probennummer	MALDI-TOF MS Ergebnis	Datenbank
<i>Tepidimicrobium</i> sp.	XV2	96	1	-	1	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium tertium</i>	MV1	97	12	-	2	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	GRX2	97	2	-	3	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	GRC1	97	2	-	4	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	GRC2	98	1	-	5	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	GRC3	99	1	-	6	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	GRC5	99	1	-	7	schlechtes Spektrum	
<i>Clostridium stercorarium</i>	RX1	94	1	-	8	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium isatidis</i>	RX3	99	1	-	9	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Defluviitalea</i> sp.	RX4	99	1	-	10	Tube war offen, keine Probe, keine Messung	
<i>Clostridium cellulosi</i>	DG5	99	4	-	11	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Tisierella creatini</i>	DG3	99	1	-	12	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium jejuense</i>	RK1PASC	94	4	Zerfall	13	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium jejuense</i>	A	94	4	Zerfall	14	schlechtes Spektrum	Wiederholung 31.5. weiterhin schlechtes Spektrum
<i>Uncultured bacterium clone 1-1B-06 16S ribosomal</i>	T3/55	99	4	Zerfall	15	unbekannter Keim	Ähnlichkeit zu D13-0687-12-1-1_HAWZ/55; Gattung vermutlich identisch
<i>Clostridium thermopalmarium</i>	Neu4	99	1	-	16	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Neu18	98	1	-	17	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium putrefaciens</i>	Neu23	95	2	Zerfall	18	schlechtes Spektrum	
<i>Clostridium caenicola</i>	Neu24	98	2	-	19	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium putrefaciens</i>	Neu30	95	2	Zerfall	20	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
Mischkultur	159		1	Löcher	22	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt
<i>Clostridium clariflavum</i>	K501	99	12	Abbau	23	unbekanntes Spektrum in der Datenbank	als Referenzspektrum in der Datenbank abgelegt

Bei allen Spektren gab es keine Übereinstimmungen mit der gesamten Datenbank von RIPAC. Die neuen Isolate wurden als Referenzspektren in der Datenbank abgelegt.

### 1.3.7 Isolate aus der mesophilen Biogasanlage Pellmeyer (T3)

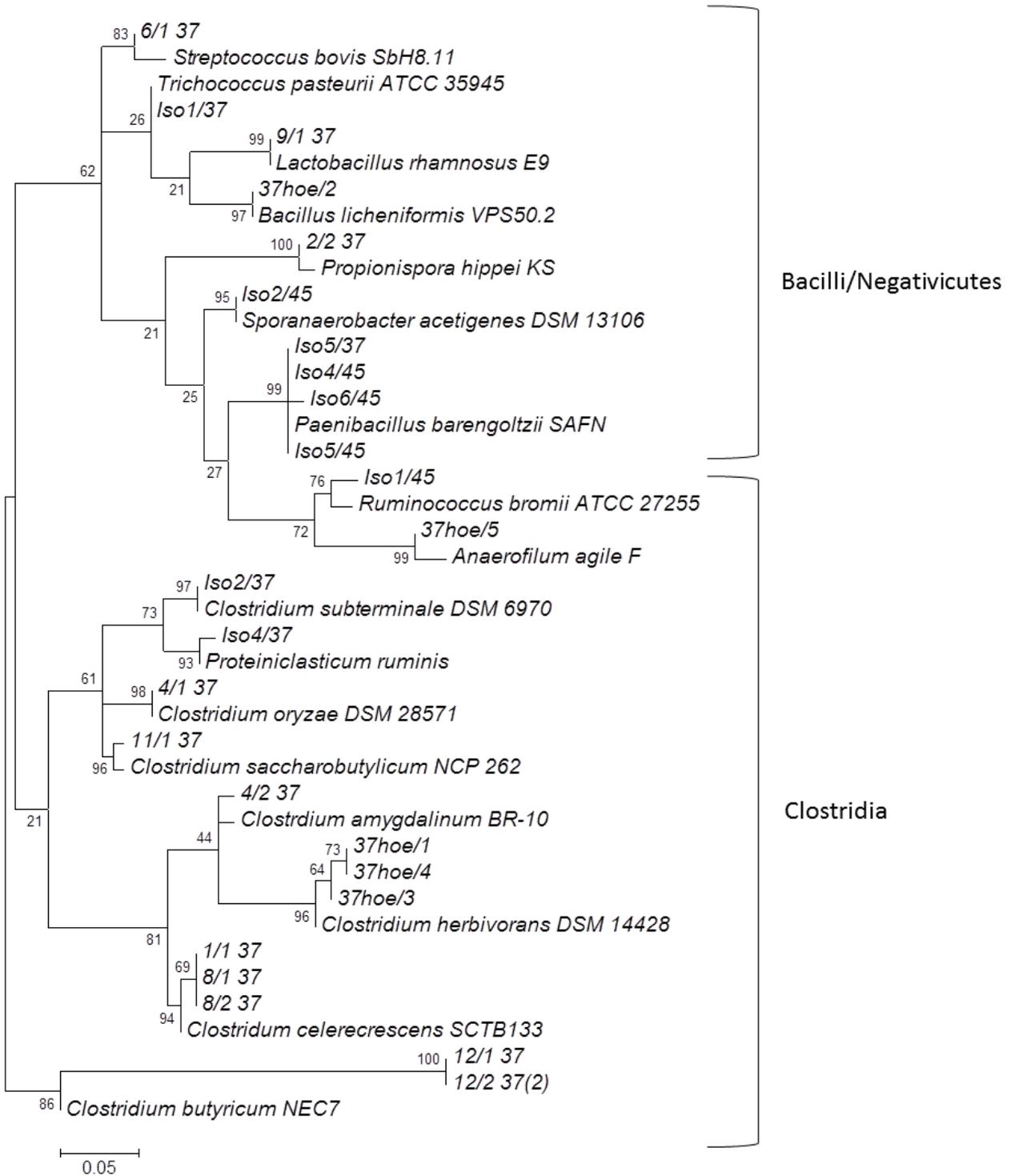
Als Modellbiogasanlage zur Isolierung möglichst vieler Arten/Stämme im mesophilen Bereich wurde der Pellmeyer-Fermenter in Eggertshofen bei Freising (Deutschland) ausgewählt. In **Tabelle 21** sind alle mit den verschiedenen Methoden isolierten mesophilen Bakterien aufgelistet. Insgesamt wurden 28 mesophile Reinisolate aus der Biogasanlage Pellmeyer mit den verschiedensten Isolierungsmethoden generiert. Die meisten Isolate konnten bereits bekannten Spezies zugeordnet werden (79%). Die 3 (11%) Isolate, welche in der Lage sind kristalline Cellulose abzubauen, gehören laut ihrer 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit mit über 99% zur gleichen Art. Mit 96,98% 16S Sequenzähnlichkeit zu *Clostridium herbivorans* DSM 14428 sind sie der Gattung *Clostridium* zuzuordnen, gehören jedoch voraussichtlich zu keiner bisher bekannten Art (TINDALL *et al.* 2010). Ein Vertreter wurde für eine weitere Charakterisierung und Genomsequenzierung ausgewählt (in fetter Schrift markiert). Auf diesen wird im Kapitel 0 näher eingegangen.

Alle Isolate stammen aus dem Phylum Firmicutes und lassen sich wiederum drei Klassen (Clostridia, Bacilli, Negativicutes) zuordnen. Die 10 isolierten Hauptgattungen teilen sich überwiegend auf die Klassen der Clostridia und Bacilli. Insgesamt ließen sich davon 18 Isolate in die häufigste Ordnung Clostridiales, 3 Isolate in die Ordnung Lactobacillales und 5 Isolate in die Ordnung Bacillales einordnen. Nur das Isolat Iso2/2 37 aus der Familie Veillonellaceae gehört zur Klasse der Negativicutes und zur Ordnung Selemonadales und wurde ebenfalls zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

Da der Hauptfokus in dieser Arbeit auf thermophilen cellulolytischen Isolaten lag, wurden wesentlich weniger mesophile (28) als thermophile Isolate (172) generiert. Dennoch ist verglichen mit den thermophilen Isolaten (**Abbildung 17**) die Diversität der mesophilen Isolate (**Abbildung 30**) höher. Der Shannon-Index (Hs) als Maß für die Diversität liegt bei 2,63 für die mesophilen Isolate und bei 2,48 für die thermophilen Isolate.

**Tabelle 21:** Liste aller mesophilen Isolate mit der Zuordnung zu bekannten Spezies anhand der höchsten Sequenzähnlichkeit (laut NCBI Datenbankvergleich). <sup>1</sup>Inc. sed. = incertae sedis

Klasse	Ordnung	Familie	Art	Isolate	Max. Ident. (%)	Ident. Isolate (min. 98%)	Cellulose-abbau
Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium subterminale</i>	Iso2/37	99	1	-
			<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	Iso11/1 37°C	99	1	-
			<i>Clostridium butyricum</i>	Iso12/1; Iso12/2 37°C	98	1	-
			<i>Clostridium oryzae</i>	Iso4/1 37°C	99	1	-
			<i>Proteinielasticum ruminis</i>	Iso4/37	98	1	-
	<sup>1</sup> Inc. sed.		<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	Iso2/45	98	1	-
		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus bromii</i>	Iso1/45	99	1	-
			<i>Anaerofilum agile</i>	37hoe/5	97	1	-
		Lachnospiraceae	<i>Clostridium celerecrescens</i>	Iso2/3; Iso1/1; Iso1/2; Iso8/1; Iso8/2 37°C	99	5	-
			<i>Clostridium amygdalinum</i>	Iso4/2 37°C	98	1	-
			<i>Clostridium XlVa sp.</i>	<b>37hoe/1; 37hoe/3; 37hoe/4</b>	97	3	JA
	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus sp.</i>	Iso6/1 37°C	96	1	-
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9/1 37°C	99	1	-
Bacilli		Carnobacteriaceae	<i>Trichococcus pasteurii</i>	Iso1/37	99	1	-
	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Iso5/37; Iso5/45; Iso6/45; Iso4/45	99	4	-
		Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>	37hoe/2	99	1	-
Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Propionispora hippiei</i>	<b>Iso2/2 37</b>	93	1	-
Summe						28	



**Abbildung 30:** Ungewurzelter phylogenetischer Baum der 16S rRNA Gen-Sequenzen aller mesophilen Isolate und ausgewählter Referenzstämmen unter Verwendung eines maximum likelihood-basierten Algorithmus. Auf den einzelnen Ästen sind die einzelnen Bootstrap Werte angegeben.

### 1.3.8 Charakterisierung ausgewählter mesophiler Isolate

Insgesamt wurden zwei interessant erscheinende mesophile Isolate zur Genomsequenzierung und weiteren Charakterisierung ausgewählt, die in **Tabelle 23** aufgeführt sind. Die taxonomische Einordnung kann aus **Abbildung 30** entnommen werden. Auswahlkriterien waren vor allem besondere Eigenschaften (z.B. sehr gute Cellulose-Hydrolyse) und Häufigkeit des Isolates. Beide Isolate stammen aus der mesophilen Biogasanlage T3 (Pellmeyer). Isolat Iso2/2 37 wurde mit Strategie 1 aus einer Anreicherung in Mineralmedium mit 0,5% (v/v) Arabinogalactan aus Lärche isoliert. Das Isolat 37hoe/3 wurden stellvertretend für alle 37hoe Isolate ausgewählt, welche mit Strategie 2 aus einer Verdünnungsreihe in flüssigem GS2 Medium mit 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (v/v) steril filtriertem Rumensaft und Filterpapier gewonnen und mit Agarplatten des selben Mediums mit MN301 Topagar gereinigt wurden.

**Tabelle 22:** Liste der zur genaueren Charakterisierung ausgewählten mesophilen Isolate. BGA = Biogasanlage

Name Isolat	Max. Sequenzident. (NCBI)	Ursprung	EMBL/NCBI Zugangsnummern
<b>37hoe/3</b>	<i>Clostridium herbivorans</i> (96,98%)	BGA T3 (Pellmeyer)	16S rRNA: LN868251
<b>Iso2/2 37</b>	<i>Propionispora hippei</i> (93%)	BGA T3 (Pellmeyer)	16S rRNA: LN868253

Zur physiologischen Charakterisierung der mesophilen Isolate wurde zunächst Substratspektrum, Produktspektrum, pH- und Temperaturoptimum, sowie weitere wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 23** zusammengefasst.

**Tabelle 23:** Wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften von den Isolaten 37hoe/3, Iso2/2 37. Filterpapier (Whatman No. 1); n.b. = nicht bestimmt

Charakteristika	37hoe/3	Iso2/2 37
Temperatur (°C)	25 - 40	25 - 40
pH	6,5 – 7,5	5,5 – 8,2
Gram Reaktion	+	-
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen
Endosporen	+	+
Abbau von:		
Galactose	-	-
Arabinose	-	+
Xylan	+	+
Xylose	-	+
Cellulose*	+	-
Mannose	+	+
Fructose	+	+
Sucrose	+	-
Glucose	-	+
Cellobiose	+	+
Sorbitol	-	n.b.
Stärke	-	+
Haupt-Fermentationsprodukte	H <sub>2</sub> , Butanol, Ethanol, Acetat, Butyrat	H <sub>2</sub> , Propionat, Ethanol, Acetat, Butyrat

Das Isolat 37hoe/3 zeigte mit 96,98% die höchste 16S rRNA Sequenzübereinstimmung mit dem *Clostridium herbivorans* Typstamm DSM 14428 und gehört somit voraussichtlich zu einer bisher nicht beschriebenen Art innerhalb der Gattung *Clostridium* und der Familie *Lachnospiraceae*. Da die Gattung *Clostridium* eine sehr große phänotypische und genotypische Diversität aufweist, wurde das neue Isolat nach der Einordnung von COLLINS *et al.* (1994) basierend auf den 16S rRNA Sequenzen dem *Clostridium* Cluster XIVA zugeordnet. YUTIN & GALPERIN (2013) schlugen eine Umbenennung aller *Clostridium* spp. aus dem Cluster XIVA in das neue Genus *Lachnoclostridium* vor (YUTIN & GALPERIN 2013). Diese Bezeichnung wurde allerdings in die LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) noch nicht aufgenommen und deshalb in dieser Arbeit noch nicht verwendet. Der nächste Verwandte *Clostridium herbivorans* hat sein Wachstumsoptimum ebenfalls im mesophilen Bereich und ist in der Lage kristalline Cellulose abzubauen. Auch das Substratspektrum der beiden Arten ist ähnlich, *C. herbivorans* konnte jedoch im Gegensatz zu 37hoe/3 nicht auf Fructose und Xylan wachsen. Beide bilden Butyrat und Ethanol als Endprodukte der Fermentation, *C. herbivorans* bildet aber im Gegensatz zu 37hoe/3 weder Acetat noch Butanol. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist die Notwendigkeit von Rumensaft als Wachstumsfaktor im

Medium. *C. herbivorans* wurde erstmals aus dem Gastrointestinal-Trakt von Schweinen isoliert (VAREL *et al.* 1995), 37hoe/3 stammt dagegen aus einer mesophilen Biogasanlage. Zudem wurde *C. herbivorans* bisher in Metagenomanalysen in keiner industriellen Biogasanlage nachgewiesen (KRAUSE *et al.* 2008, SCHLUTER *et al.* 2008, WIRTH *et al.* 2012).

Um das cellulolytische Potential des neuen Isolates mit dem des *C. herbivorans* Typstammes zu vergleichen, wurde die enzymatische Aktivität des Zellüberstandes aus verschiedenen Substraten bestimmt (**Tabelle 24**).

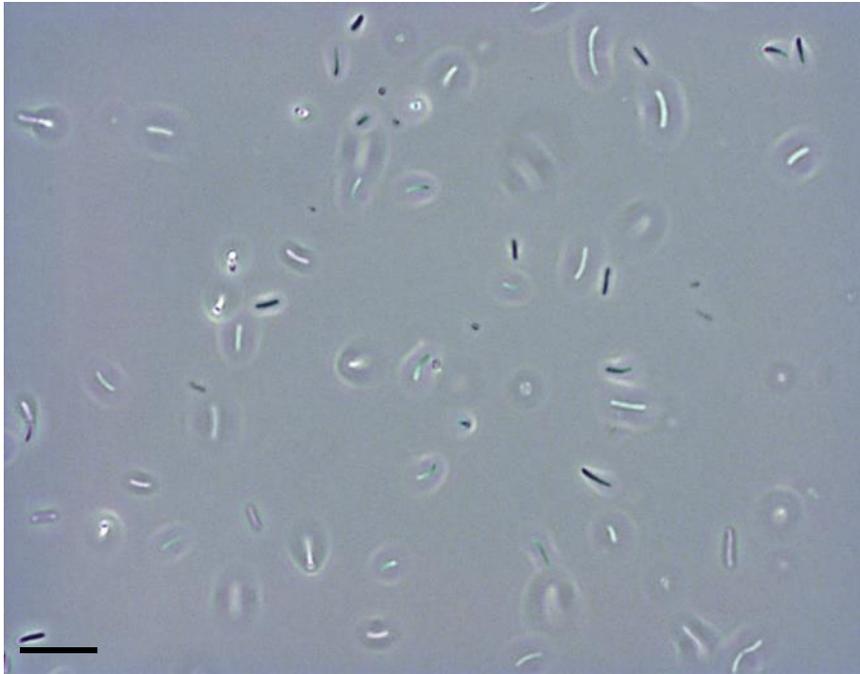
**Tabelle 24:** Spezifische Aktivität (U/mg) der Proteine im Kulturüberstand von Isolat 37hoe/3 und *C. herbivorans* DSM 14428 auf verschiedenen Substraten mit Standardabweichung von drei Messwerten

Isolat	CMC	PASC
<i>C. herbivorans</i>	0,08 +/- 0,003	0,02 +/- 0,0007
37hoe/3	0,18 +/- 0,005	0,07 +/- 0,002

Die Enzymaktivität des Zellüberstands des Isolats 37Hö/3 ist sowohl auf PASC als auch auf CMC messbar, aber signifikant geringer als die des verwandten *Clostridium herbivorans* Typstammes. Auf Avicel konnte bei beiden Stämmen keine Enzymaktivität gemessen werden, was auf das Fehlen eines kompletten cellulolytischen Enzymsystems hindeutet und dem Bakterium eine unterstützende Rolle beim Abbau  $\beta$ -1,4-glukosidischer Substanzen zuweist.

Das Isolat Iso2/2 37 bildet, basierend auf den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA Gensequenzen, eine neue Gattung innerhalb der Familie *Veillonellaceae* mit 92,92% Sequenzübereinstimmung mit dem 16S rRNA Gen der am nächsten verwandten Spezies *Propionispora hippei* DSM 15287. Die Familie Veillonellaceae gehört zur Klasse der Negativicutes und zur Ordnung der Selenomonadales. Die Ordnung Selenomonadales wurde erst kürzlich auf Basis von phylogenetischen Analysen beschrieben und befindet sich derzeit noch im Umbruch. Gemeinsames Merkmal aller Spezies ist die Gram-negativ färbende Zellwand innerhalb eines Phylums (Firmicutes) von Gram-positiven Bakterien (MARCHANDIN *et al.* 2010). Die phylogenetische Position der Gattung *Propionispora* etc. innerhalb der *Veillonellaceae* ist umstritten. MARCHANDIN *et al.* (2010) schlagen eine Neueinordnung der Gattungen in die Familie *Selenomonadales incertae sedis* vor. Eine genaue taxonomische Eingruppierung von Isolat Iso2/2 37 ist daher schwierig. Die nächste verwandte beschriebene Spezies *Propionispora hippei* bildet ebenso wie das neue Isolat Propionsäure und Essigsäure als Hauptfermentationsprodukte. Beide bilden gekrümmte Stäbchen mit terminalen Endosporen, pH und Temperaturoptimum sind ebenfalls vergleichbar (**Abbildung 31**, **Tabelle 23**).

*Propionispora hippei* DSM 15287 wurde aus einer Anreicherung auf aliphatischen Polyester isoliert (ABOU-ZEID *et al.* 2004). Iso2/2 37 wurde dagegen als erster Vertreter der Ordnung Selenomonadales aus einer Biogasanlage isoliert.



**Abbildung 31:** Zellen von Isolat Iso2/2 37 unter dem Phasenkontrastmikroskop (1000x Vergrößerung). Balken = 10  $\mu\text{m}$

**Tabelle 25** Spezifische Aktivität ( $\text{U mg}^{-1}$ ) der Proteine im Kulturüberstand von Isolat Iso2/2 37 auf verschiedenen Substraten mit Standardabweichung von drei Messwerten

Isolat	Xylan	$\beta$ -Glucan	CMC	PASC	Arabinogalactan
Iso2/2 37	0,014 +/- 0,0005	0,01 +/- 0,003	0,01 +/- 0,0005	0,01 +/- 0,0004	0,013 +/- 0,002

Zur Bestimmung des enzymatischen Potentials wurde die spezifische Aktivität der Enzyme im Zellüberstand von Isolat Iso2/2 37 auf verschiedenen Substraten getestet (**Tabelle 25**).

Wie erwartet waren die Enzyme des Zellüberstandes auf Arabinogalactan und Xylan aktiv, da auch das Isolat aus einer Anreicherung auf Arabinogalactan stammt. Zudem konnte geringe hydrolytische Aktivität auf CMC, PASC und  $\beta$ -Glucan gemessen werden. Auf Avicel konnten die Enzyme keine quantifizierbaren Zucker frei setzen.

Neben dem Abbau von Hemicellulosen kann Isolat Iso2/2 37 auch eine Reihe von Mono- und Disacchariden verstoffwechseln und ist vermutlich als primärer Gärer in erster Linie an der Acidogenese im Biogasfermenter beteiligt.

Vor allem um Erkenntnisse zur Ausstattung mit Glycosylhydrolasen für den Abbau von Biomasse und über die Beschaffenheit und Art des cellulolytischen Systems (falls vorhanden) zu erhalten, wurde von beiden mesophilen Isolaten die zur Charakterisierung ausgewählt wurden, die genomische DNA zur Sequenzierung geschickt. Die Genomsequenz von Isolat 37hoe/3 war bei Fertigstellung dieses Berichts noch nicht verfügbar, daher sind in **Tabelle 26** nur die grundlegenden Eigenschaften des sequenzierten Genoms von Isolat Iso2/2 37 zusammengefasst.

Die Genomsequenz wurde auf dem Illumina MiSeq System angefertigt und auf gleiche Weise wie bei den thermophilen Isolaten assembliert und annotiert, allerdings waren bei Zusammenstellung des Berichts die Auswertungen noch nicht beendet.

**Tabelle 26:** Eigenschaften des von Isolat Iso2/2 37 sequenzierten Genoms

Eigenschaft	Iso2/2 37
Größe [bp]	4.123.000
GC Gehalt [%]	45,59
Gesamtzahl Gene	3960
rRNA Operons	4
tRNAs	76

### 1.3.9 „In sacco“ Versuche

Für die Gewinnung von cellulolytischen Isolaten aus den „in sacco“ Anreicherungen in thermophilen Modellfermentern beim Projektpartner LfL wurden Säckchen nach 1 Tag (d) (1), 2 d (2), 4 d (3) und 7 d (4) anaerob entnommen und mit steriler, isotoner Salzlösung gründlich gespült. Ein Teil des darin enthaltenen Filterpapiers wurde in alle Medien zur Gewinnung neuer Isolate inokuliert (**Tabelle 27**) und bei 55°C inkubiert. Nach zwei Flüssig-Anreicherungen wurden Verdünnungsausstriche auf den entsprechenden Festmedien angefertigt und mit PASC- und MN301-Topagar überschichtet (Isolierungsstrategie 1). In Basalsalz oder DNB Rumen (10% v/v) fand kein Filterpapierabbau in Flüssigmedium statt.

**Tabelle 27:** Zusammenfassung und Ergebnis aller Medien, die für die Gewinnung neuer Isolate aus den „*in sacco*“ Anreicherungen verwendet wurden. % Angaben in v/v. + Resultat positiv; - Resultat negativ

Medium	Filterabbau	Lysehöfe in Topagar	Isolate
Leitungswasser-R (40% Rumen)	+	+	+
DNB Rumen (10%)	-	-	-
DNB Gärrest (10%)	+	-	-
Komplex Rumen steril (1%)	+	+	-
Komplex GR steril (1%)	+	+	-
GS2 0,1% Hefeextrakt	+	+	+
GS2	+	+	+
Basal Salz-Medium	-	-	-

Letztlich konnten nur von Leitungswasser-R und den beiden GS2 Medien cellulolytische Isolate mit hoher 16S rRNA Gen-Sequenzähnlichkeit (> 99%) zu bereits bekannten Arten (*Clostridium cellulosi*, *Clostridium clariflavum*, *Acetivibrio cellulolyticus*) gewonnen werden (**Tabelle 27**).

Für die weiteren Anreicherungen wurde GS2 Medium mit 10% Gärrest aus dem Fermenter BM2T genutzt (GGR-Medium), um die Nährstoffbedingungen im Fermenter möglichst genau nachzustellen. Als Inokulum diente Filterpapier aus einer „*in sacco*“ Anreicherung, das an Tag 7 aus BM2T entnommen wurde. Die höchste Verdünnungsstufe mit Filterpapierabbau wurde in jedem Anreicherungsschritt erneut in demselben Medium verdünnt (Isolierungsstrategie 2). Schließlich wurden von der fünften Anreicherung die Verdünnungen  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  auf Platten desselben Mediums, sowie auf Platten mit Leitungswasser und 30% Rumen mit MN301 Topagar ausgestrichen. Nach zwei Wochen Inkubation waren auf allen Platten um einige Kolonien Höfe im Topagar zu erkennen. Daraus konnten 11 Isolate mit weitgehend identischer 16S rRNA Gensequenz gewonnen werden (**Tabelle 28**).

**Tabelle 28:** Liste aller „*in sacco*“ Isolate mit der Zuordnung zu bekannten Spezies anhand der höchsten Sequenzähnlichkeit (laut NCBI Datenbankvergleich).

NCBI Datenbank Treffer	Isolate	Max. Ident. (%)	Ident. Isolate	Celluloseabbau
<i>Clostridium thermocellum</i>	GGR1-9; RGR1, RGR2	94	11	<b>JA</b>
<i>Clostridium clariflavum</i>	diverse	99	10	<b>JA</b>
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	GS2neu/4/2	99	2	<b>JA</b>
<i>Clostridium cellulosi</i>	K-GR Sacco	99	4	<b>JA</b>
<b>Summe</b>			<b>27</b>	

Insgesamt wurden 27 Isolate aus den „*in sacco*“ Anreicherungen generiert. Davon konnten alle, mit Strategie 1 gewonnenen Isolate bekannten Spezies zugeordnet wer-

den. Generell gehörten alle Isolate zur Familie *Ruminococcaceae* und waren in der Lage, kristalline Cellulose abzubauen. Die 11 Isolate, die mit Hilfe von Gärrest aus dem BM2T Fermenter und Strategie 2 gewonnen wurden, zeigten mit 94,36% die höchste 16S rRNA Sequenzübereinstimmung mit dem *C. thermocellum* Typstamm ATCC 27405 und gehörten, basierend auf den 16S rRNA Sequenzanalysen, zu einer bisher nicht beschriebenen Gattung innerhalb der Familie *Ruminococcaceae* (TINDALL *et al.* 2010).

### 1.3.10 Charakterisierung ausgewählter „in sacco“ Isolate

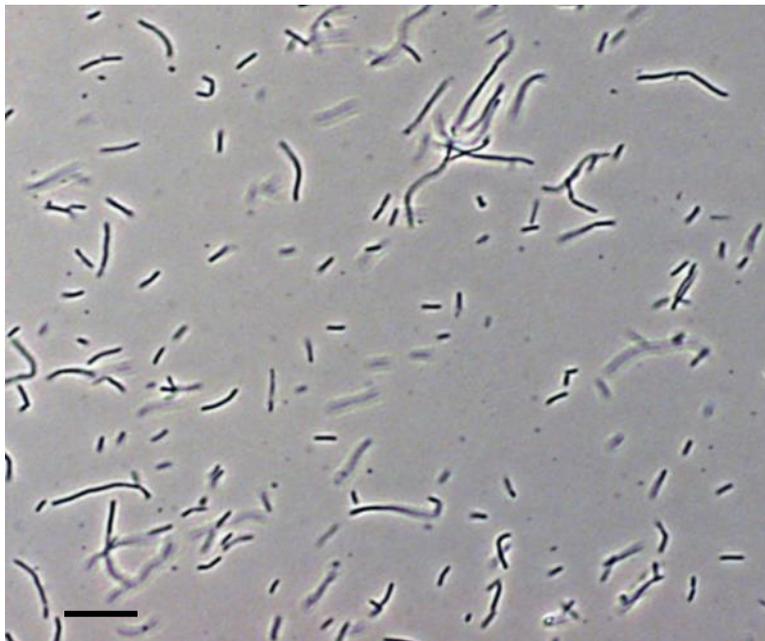
Exemplarisch für die Gruppe dieser 11 Isolate, die eine neue Gattung innerhalb der Familie *Ruminococcaceae* darstellen, wurde Isolat GGR1 zur weiteren Charakterisierung und Genomsequenzierung ausgewählt. Die komplette 16S rRNA Gensequenz wurde in der NCBI Datenbank unter der Zugangsnummer LN868252 hinterlegt.

Die wichtigsten Ergebnisse der morphologischen und physiologischen Charakterisierung von Isolat GGR1 sind in **Tabelle 14** zusammengefasst.

**Tabelle 29:** Wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften von Isolat GGR1. \*Filterpapier (Whatman No. 1)

Characteristika	
Temperaturbereich (°C)	45 – 65
pH-Bereich	6,5 – 9,0
Gram Reaktion	+
Zellmorphologie	Stäbchen
Endosporen (terminal)	+
Abbau von:	
Galactose	+
Arabinose	-
Xylan	+
Xylose	+
Cellulose*	+
Mannose	-
Fructose	-
Sucrose	-
Glucose	+
Cellobiose	+
Sorbitol	+
Stärke	-
Haupt-Fermentationsprodukte	H <sub>2</sub> , Ethanol, Acetat

Wie bereits erwähnt, gehört das Isolat GGR1 zur Familie *Ruminococcaceae*. Einige Vertreter der Familie *Ruminococcaceae*, die bereits gut charakterisiert wurden, sind ebenfalls in der Lage kristalline Cellulose abzubauen (KOECK *et al.* 2014a). *Ruminococcaceae* gehören neben den *Lachnospiraceae* zu den zwei abundantesten Firmicutes Familien im Gastrointestinal-Trakt von Menschen und Tieren. Diese sehr diverse Gruppe hat als gemeinsames Merkmal den effektiven Abbau von pflanzlicher Biomasse in diversen mikrobiellen Gemeinschaften (TAP *et al.* 2009). Die cellulolytischen Vertreter fallen vor allem in das *Clostridium* Cluster III. YUTIN & GALPERIN (2013) schlugen eine Umbenennung aller *Clostridium* spp. aus dem Cluster III in den neuen Genus *Ruminiclostridium* vor (YUTIN & GALPERIN 2013). Diese Bezeichnung wurde allerdings in die LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) noch nicht aufgenommen und wird daher in dieser Arbeit noch nicht verwendet. Auch der nächste bekannte Verwandte des neuen Isolats, *C. thermocellum*, gehört zu dieser Gruppe.



**Abbildung 32:** Zellen von Isolat GGR1 unter dem Phasenkontrastmikroskop (1000x Vergrößerung). Balken = 10  $\mu\text{m}$

Die optimalen Wachstumsparameter, die Substrat- und Produktspektren und Zellmorphologien sind bei Isolat GGR1 und *C. thermocellum* ATCC 27405 sehr ähnlich (**Abbildung 32**). *C. thermocellum* kann allerdings Xylan und Xylose nicht verstoffwechseln. Zur Bestimmung des enzymatischen Potentials wurde die spezifische Aktivität der Enzyme im Kulturüberstand (kultiviert in GS2 Medium mit Cellobiose und Avicel) von Isolat GGR1 auf verschiedenen Substraten getestet.

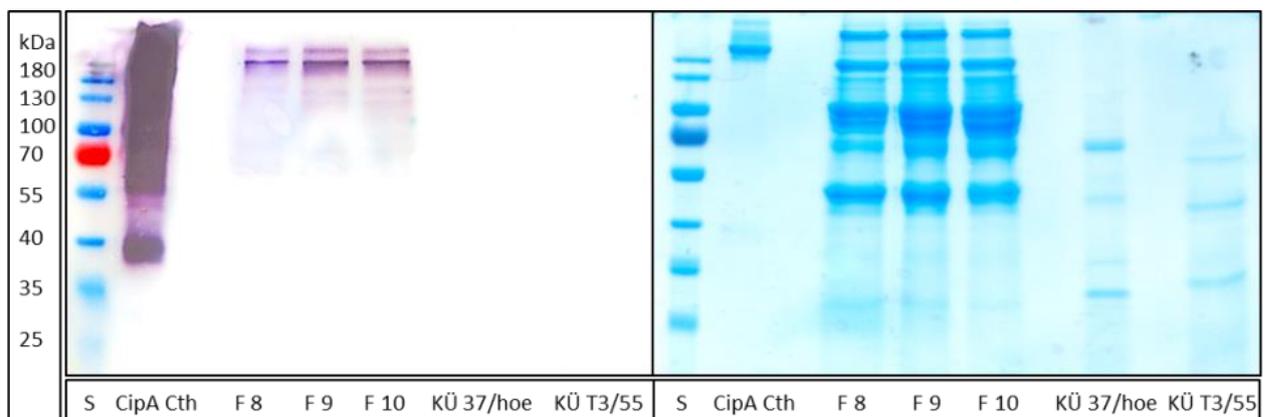
**Tabelle 30:** Spezifische Aktivität (U/mg) der Proteine im Kulturüberstand von Isolat GGR1 auf verschiedenen Substraten mit Standardabweichung von drei Messwerten

Isolat	Avicel	Xylan	$\beta$ -Glucan	CMC	PASC	Arabinoxylan	Xyloglucan
GGR1	0,05 +/- 0,003	4,57 +/- 0,12	5,88 +/- 0,16	0,17 +/- 0,009	0,18 +/- 0,034	5,83 +/- 0,16	4,33 +/- 0,16

Die spezifische Aktivität der Enzyme auf kristalliner Cellulose bewegt sich mit 0,05 U/mg in der gleichen Größenordnung, wie bei *C. thermocellum* Kulturüberstand (0,09 U/mg). Die  $\beta$ -D-glycosidische Bindung der Substrate PASC und CMC konnte von den Enzymen im Überstand in gleichem Maße hydrolysiert werden. Der Abbauwert von kristalliner Cellulose ist relativ hoch. Sehr gute Enzymaktivitäten konnten auch auf den Hemicellulosen Xylan, Arabinoxylan und Xyloglucan bestimmt werden (**Tabelle 30**). Anhand des Substratspektrums und der gemessenen Enzymaktivitäten kann geschlossen werden, dass das Isolat vermutlich eine zentrale Rolle in der hydrolytischen Stufe der Biogasanlage also beim Abbau von cellulose- und hemicellulosehaltiger Biomasse spielt.

### 1.3.10.1 Genomsequenzierung GGR1

Die Genomsequenz von Isolat GGR1 war bei Fertigstellung dieses Berichts noch nicht verfügbar, daher wurden zur Charakterisierung des cellulolytischen Systems die aufkonzentrierten Proteine des Kulturüberstandes mittels Gelfiltration aufgetrennt. Von den drei Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurde ein Western Blot mit Anti-Cohesin-Antikörpern angefertigt. Falls Cohesine in der Fraktion vorhanden sind, könnte so auf die Anwesenheit von cellulosomallem Scaffoldinprotein, und damit auf die Anwesenheit von Cellulosen geschloßen werden.



**Abbildung 33:** links: Western Blot mit Antikörpern gegen Cohesine des CipA Protein von *C. thermocellum*. Rechts: SDS PAGE analog zu dem Western Blot links. Cth = *C. thermocellum*. F = Fraktion der Gelfiltration von GGR1 Kulturüberstand. KÜ = Kulturüberstände anderer Isolate (37/ho, T3/55) als Negativkontrolle. Es wurden jeweils 2  $\mu$ g Protein aufgetragen.

In **Abbildung 33** links ist deutlich zu erkennen, dass mit den Anti-Cohesin-Antikörpern ein makromolekulares Protein, in allen getesteten Fraktionen der Gelfiltration des GGR1 Kulturüberstands, nachgewiesen werden konnte. Da im Gegensatz zur Positivkontrolle kein gereinigtes CipA Protein, sondern vermutlich ein Gemisch aus cellulosomal Komponenten aufgetragen wurde, ist das Signal wesentlich schwächer. Das nachgewiesene Protein scheint, mit ca. 200 kDa größer zu sein als das CipA Gen von *C. thermocellum*. Ein so großes Protein im Kulturüberstand ist ungewöhnlich und könnte, im Zusammenhang mit der Reaktion mit den CipA-Antikörpern und der negativen Reaktion mit den Kontrollüberständen von 37/hoe und T3/55, auf die Anwesenheit eines neuen Scaffoldins, und damit von Cellulosomen, hinweisen. Ob das Isolat GGR1 tatsächlich ein makromolekulares Cellulosom besitzt wird erst die Analyse der Genomsequenz klären.

#### 1.3.11 Amplikonsequenzierung der „in sacco“ Anreicherung

Um zu überprüfen, ob mit der „in sacco“ Methode tatsächlich cellulolytische Bakterien „in situ“ (im Fermenter) angereichert werden konnten, und um zu vergleichen, ob tatsächlich die in der Anreicherung dominierenden Spezies isoliert wurden, wurde eine Amplikonsequenzierung der DNA Proben durchgeführt. Dazu wurde das Filterpapier von jedem Entnahmezeitpunkt (1d (1), 2d (2), 4d (3) und 7d (4)) aus BM1T und BM2T homogenisiert und die DNA daraus isoliert. Die Proben von Tag 2 und 4 wurden für die Anlage BM2T vereinigt. Anschließend wurde das 16S rRNA Gen, mit spezifischen Primern gegen bakterielle 16S rRNA Gene amplifiziert und in *E. coli* kloniert. Von jedem Probezeitpunkt wurden 15-20 Klone sequenziert. Um zu prüfen, ob sich durch einen Anreicherungsschritt im Labormedium die Zusammensetzung der Community ändert und in welchem Umfang dies geschieht, wurden zusätzlich Amplikonsequenzierungen des 2. und 5. Anreicherungsschritt durchgeführt.

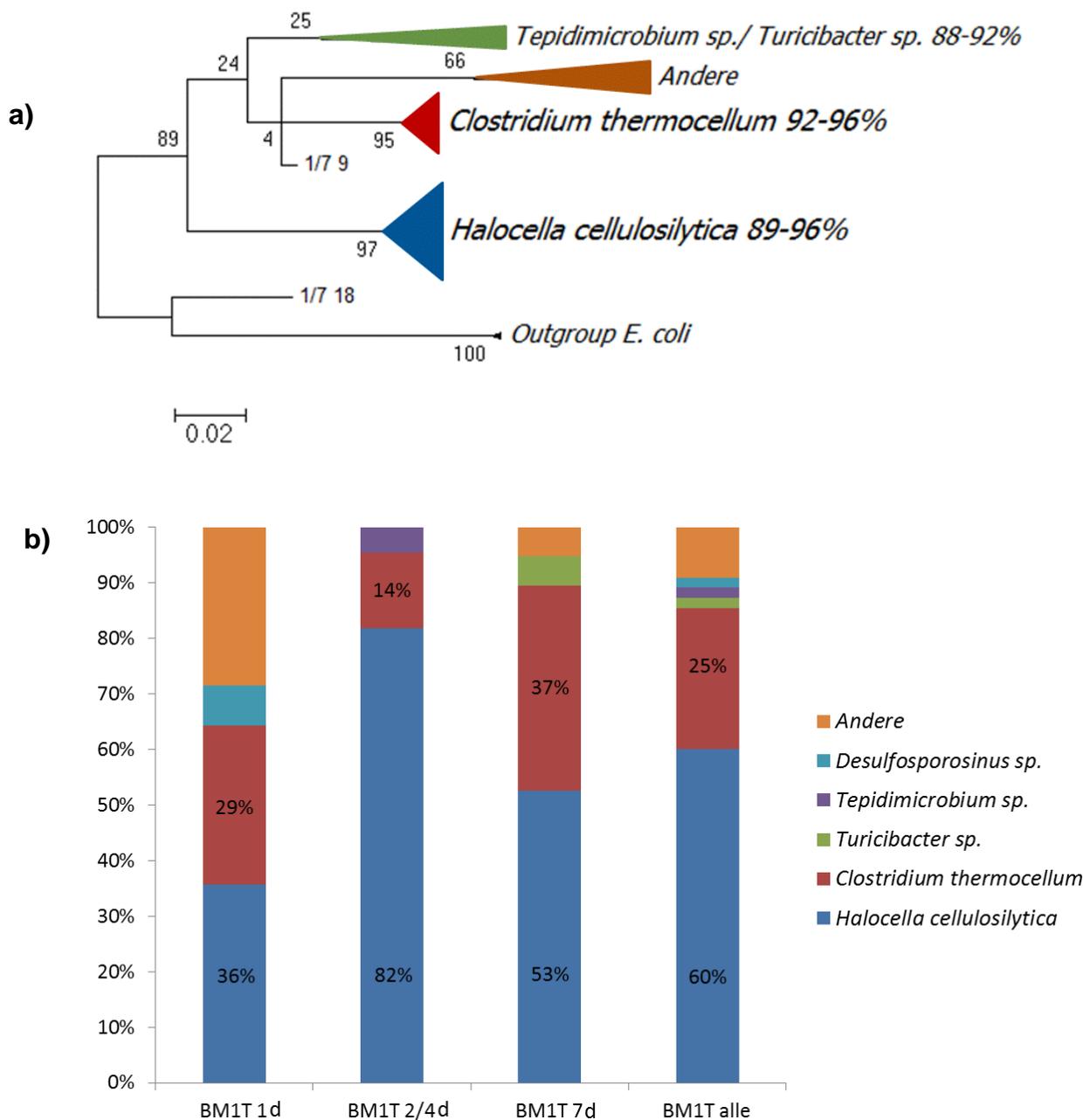
##### 1.3.11.1 Amplikonsequenzierung BM1T

Repräsentativ sind hier nur die detaillierten Ergebnisse der Sequenzierung von Tag 7 des Reaktors BM1T dargestellt (**Tabelle 31**).

**Tabelle 31:** Bester NCBI Datenbanktreffer für kultivierte Bakterien der klonierten 16S rRNA Gene einer DNA Probe des „in sacco“ Ansatzes: BM1T Entnahmetag 7. Sequenzen, die über 98% Übereinstimmung ausweisen, sind in gleicher Farbe hinterlegt.

Klon	Sequenzident. %	Nächste verwandte kultivierte Spezies
7.1	93	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.2	91	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.4	91	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.5	90	<i>Turcibacter sanguinis</i> strain 111732/2010
7.6	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.7	96	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.9	92	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.10	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.11	93	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.13	92	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.14	92	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.18	91	<i>Hydrogenispora ethanolica</i>
7.19	96	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.20	96	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.21	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.23	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.24	94	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405
7.25	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.27	96	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405

Die restlichen Ergebnisse der anderen Probenahmezeitpunkte sind in **Abbildung 34** zusammengefasst.



**Abbildung 34:** a) Phylogenetischer Baum der 16S rRNA Gensequenzen der Amplikonsequenzierung einer „in sacco“ Anreicherungen aus dem BM1T Reaktor unter Verwendung eines maximum likelihood-basierten Algorithmus. Subbäume von taxonomisch eng verwandten Gruppen mit mehr als 5 Isolaten sind in taxonomische Einheiten zusammengefasst. Die Höhe des Dreiecks ist abhängig von der Anzahl der Sequenzen, die Länge ist abhängig vom Maß der Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten einer taxonomischen Einheit. Der Größenbalken indiziert 2% Basenunterschiede. b) Prozentualer Anteil der wichtigsten taxonomischen Einheiten in der Amplikonsequenzierung der verschiedenen „in sacco“ Probenahmezeitpunkte von BM1T. Angegeben ist immer die nächste bekannte verwandte Spezies oder Gattung.  $N_{\text{gesamt}} = 70$ .

Bei der Erstellung der Klonbibliotheken aus den „in sacco“ Anreicherungen stammten zu über 80% der sequenzierten Klone aus zwei definierten taxonomischen Einheiten, innerhalb derer die Sequenzen >98% Ähnlichkeit aufwiesen. Diese haben die höchste

16S rRNA Gensequenzübereinstimmung bezüglich bereits isolierter Spezies mit cellulolytischen Bakterien. Die häufigste taxonomische Gruppe hatte als nächsten Verwandten *Halocella cellulosilytica* mit einer 16S rRNA Sequenzübereinstimmung von 89-96%. Die zweithäufigste taxonomische Gruppe wies mit 92-96% Sequenzübereinstimmung den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *C. thermocellum* auf (**Abbildung 34a**). Sowohl *C. thermocellum* als auch *H. cellulosilytica* Stämme sind in der Lage, kristalline Cellulose abzubauen (KOECK *et al.* 2014a). Somit war die Anreicherung cellulolytischer Bakteriengemeinschaften in situ erfolgreich.

Bemerkenswert ist, dass generell die Sequenzähnlichkeit mit kultivierten Bakterien 97% nicht übersteigt. Somit kann keiner der Klone direkt einer der genannten Arten zugeordnet werden. Zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten fand eine sukzessive Anreicherung der beiden Hauptpopulationen statt. Nach Tag 1 hatten Klone aus anderen Gruppen noch einen Anteil von 35%, diese wurden bis Tag 7 auf 22% reduziert. Die „*H. cellulosilytica*“ Gruppe erreichte nach sieben Tagen einen Anteil von 53% und die „*C. thermocellum*“ Gruppe von 37% (**Abbildung 34b**). Auch der Grad des Filterpapierabbaus nahm mit steigender Inkubationszeit immer weiter zu.

### 1.3.11.2 Amplikonsequenzierung BM2T

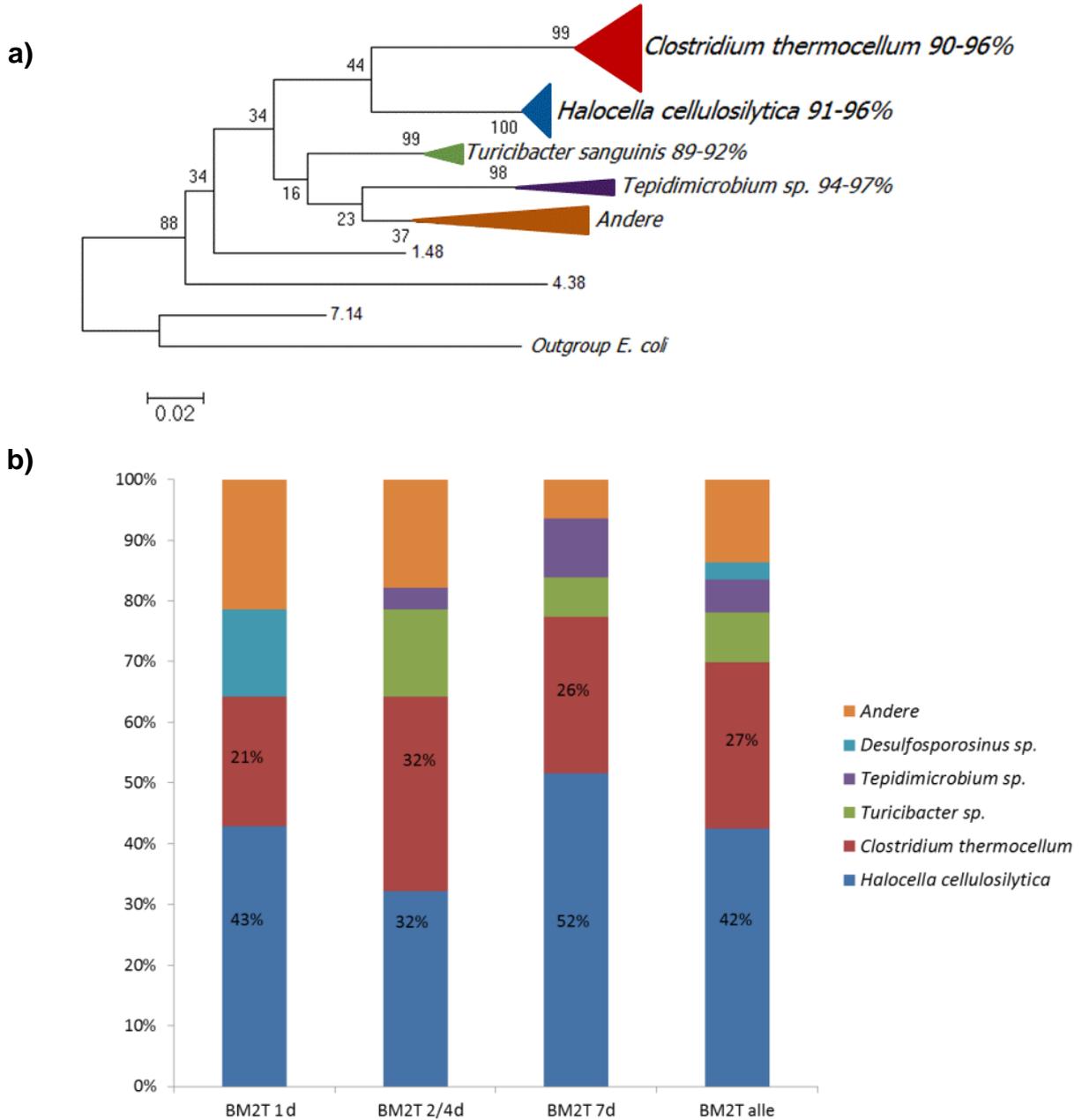
Wie auch schon bei Reaktor BM1T wurden repräsentativ für alle Probenahmezeitpunkte nur die detaillierten Ergebnisse der Sequenzierung von Tag 7 des Reaktors BM2T dargestellt (**Tabelle 32**).

**Tabelle 32:** Bester NCBI Datenbanktreffer für kultivierte Bakterien der klonierten 16S rRNA Gene einer DNA Probe des „in sacco“ Ansatzes: BM1T Entnahmetag 7. Sequenzen, die über 98% Übereinstimmung ausweisen, sind in gleicher Farbe hinterlegt.

Klon	Sequenzident. %	Nächste verwandte kultivierte Spezies
7.1	93	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.2	92	<i>Turicibacter sanguinis</i> strain 111732/2010
7.3	90	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.4	90	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.6	95	<i>Clostridium thermocellum</i> JGU1/2
7.7	95	<i>Clostridium thermocellum</i> JGU1/2
7.8	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.9	94	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i> strain SB91
7.11	95	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.12	95	<i>Clostridium thermocellum</i> ATB2/1
7.13	95	<i>Clostridium thermocellum</i> ATB2/1
7.14	89	<i>Syntrophaceticus schinkii</i> strain Sp3
7.15	95	<i>Clostridium thermocellum</i> ATB2/1
7.16	91	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.19	91	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.20	97	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> strain PML14
7.21	95	<i>Clostridium thermocellum</i> JGU1/2
7.22	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.23	92	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.27	96	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.28	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.29	96	<i>Clostridium thermocellum</i> JGU1/2
7.30	95	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.31	93	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.32	94	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.33	93	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.34	92	<i>Halocella cellulosilytica</i> strain Z-10151
7.36	92	<i>Turicibacter sanguinis</i> strain 111732/2010
7.38	94	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> strain PML14
7.39	91	<i>Clostridium thermocellum</i> JGU1/2
7.40	90	<i>Bacillus mucilaginosus</i>

Die restlichen Ergebnisse der anderen Probenahmezeitpunkte sind in (**Abbildung 35**) zusammengefasst.

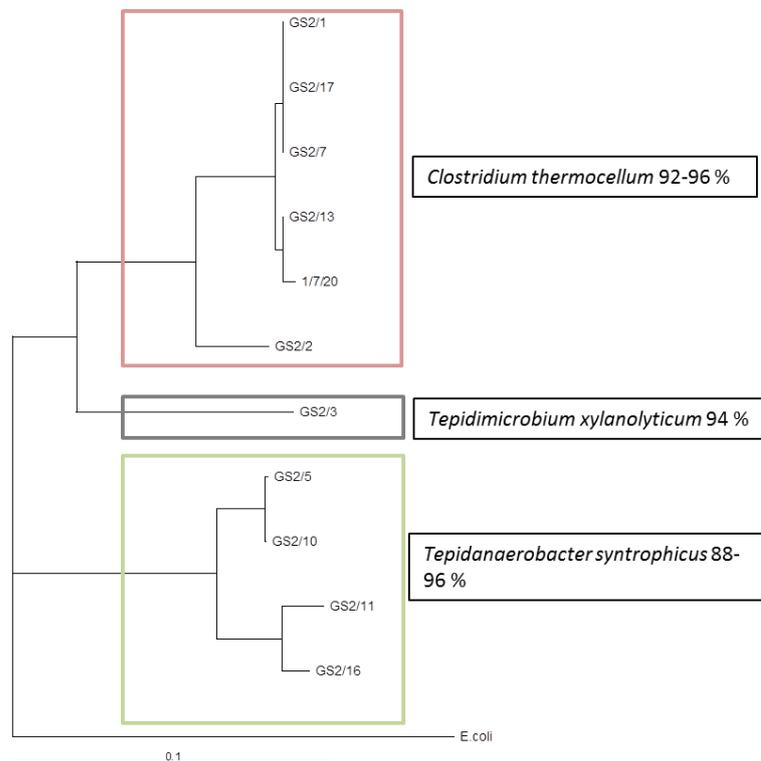
Die meisten 16S rRNA Sequenzen der Klonbibliothek lieferten wiederum die höchste Übereinstimmung mit cellulolytischen Bakterien. Diese bilden zwei definierte taxonomische Einheiten innerhalb derer die Sequenzen >98% Ähnlichkeit aufweisen. Die häufigste taxonomische Gruppe hatte als nächsten Verwandten wieder *Halocella cellulolytica* mit einer 16S rRNA Sequenzübereinstimmung von 91-96%. Die zweit häufigste taxonomische Gruppe wies mit 90-96% Sequenzübereinstimmung wieder den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *C. thermocellum* auf (**Abbildung 35a**). Somit war auch die Anreicherung im Reaktor BM2T erfolgreich und zeigte damit in einem biologischen und technischen Parallelansatz vergleichbare Ergebnisse (allerdings war wohl das Inokulum der beiden verwendeten LfL-Modellfermenter identisch). Auch beim Vergleich der beiden Fermenter weisen die beiden häufigsten taxonomischen Einheiten über 98% Sequenzähnlichkeit auf. Im Vergleich zu den ersten beiden Entnahmen nahm auch in den Säckchen aus BM2T der Anteil an den beiden Hauptpopulationen zu und erreichte nach sieben Tagen Inkubation einen Anteil von 76% (**Abbildung 35b**). Dieser liegt etwas unter den Werten von Reaktor BM1T. Das Verhältnis zwischen den beiden Hauptgruppen blieb bei Reaktor BM2T während des gesamten Versuchs weitgehend konstant. Während der Anteil aller Klone an den beiden Taxa bei Reaktor BM2T stärker schwankt.



**Abbildung 35:** a) Phylogenetischer Baum der 16S rRNA Gen Sequenzen der Amplikonsequenzierung einer „in sacco“ Anreicherungen aus dem BM1T Reaktor unter Verwendung eines maximum likelihood-basierten Algorithmus. Subbäume von taxonomisch eng verwandten Gruppen mit mehr als 5 Isolaten sind in taxonomische Einheiten zusammengefasst. Die Höhe des Dreiecks ist abhängig von der Anzahl der Sequenzen, die Länge ist abhängig vom Maß der Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten einer taxonomischen Einheit. Der Größenbalken indiziert 2% Basenunterschiede. b) Prozentualler Anteil der wichtigsten taxonomischen Einheiten in der Amplikonsequenzierung der verschiedenen „in sacco“ Probenahmezeitpunkte von BM1T. Angegeben ist immer die nächste bekannte verwandte Spezies oder Gattung. N gesamt = 75.

### 1.3.11.3 Amplikonsequenzierung der Anreicherungen

Um zu einer Isolierung und Beschreibung der *in sacco* isolierten Taxa zu kommen, wurde wie zuvor beschrieben versucht, die an der Cellulose anhaftenden Bakterien unter Laborbedingungen zu kultivieren. Für die Anreicherungen wurde GS2 Medium mit 10% Gärrest aus dem Fermenter BM2T genutzt. Als Inokulum diente Filterpapier, das an Tag 7 aus BM2T entnommen wurde. Die höchste Verdünnungsstufe mit Filterpapierabbau wurde in jedem Anreicherungsschritt erneut in identisches Medium verdünnt (Isolierungsstrategie 2). Von Anreicherung zwei und fünf wurden jeweils 10 - 20 Klone sequenziert.

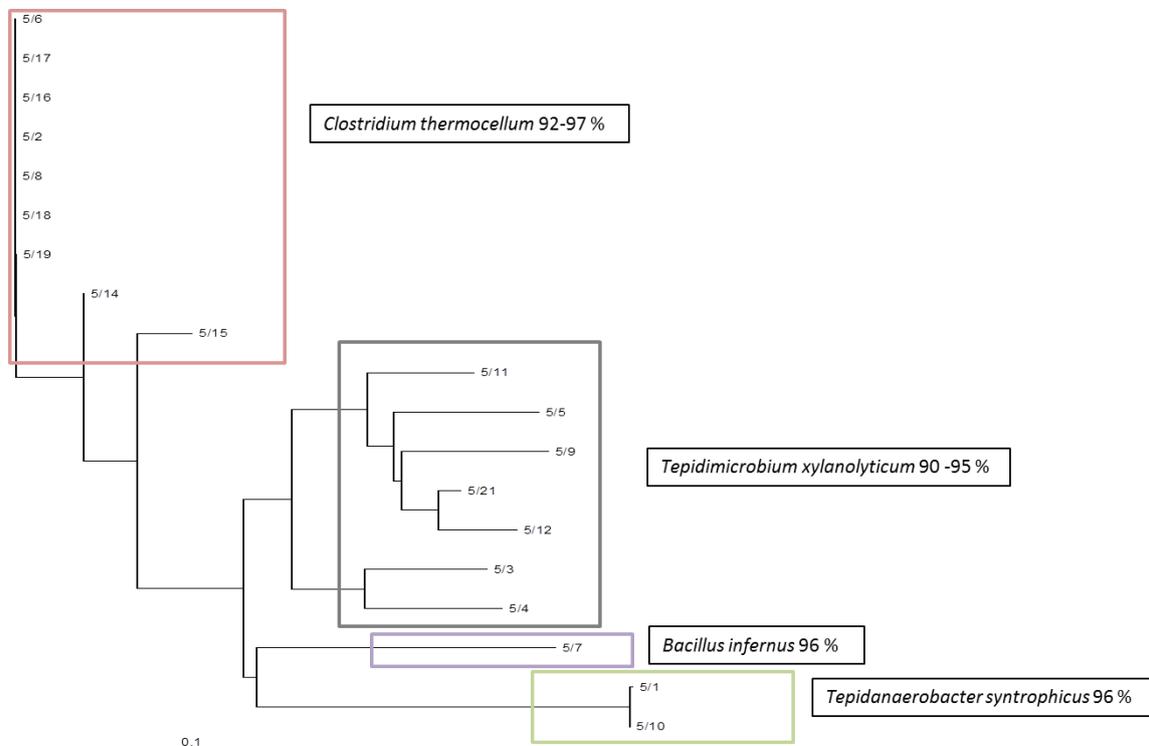


**Abbildung 36:** Phylogenetische Analyse der Amplikonsequenzierung des zweiten Anreicherungsschrittes

Bereits nach der ersten Anreicherung unter Laborbedingungen wurde die taxonomische Einheit „*Halocella* sp.“ nicht mehr nachgewiesen. Dafür taucht eine neue Subpopulation auf, die den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *Tepidanaerobacter syntrophicus* (88 – 96%) aufweist (**Abbildung 36**). Die taxonomische Einheit mit der höchsten 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* Stämmen bleibt ebenso wie das „*Tepidimicrobium* Cluster“ erhalten. Die „*Halocella* sp. Gruppe“ ging also durch die Anreicherungsprozedur verloren.

In der Mischkultur nach fünf Verdünnungsreihen nimmt die Häufigkeit der *Tepidanaerobacter syntrophicus* Gruppe ab (**Abbildung 37**). Dafür steigt die Anzahl der sequenzierten Klone des *Tepidimicrobium* Clusters stark an. Die *C. thermocellum* Gruppe bleibt

unverändert abundant. Ein multiples Alignment von Sequenzen mit Klonen aus der „*in sacco*“ Bibliothek von Tag 7 zeigte, dass es sich immer noch um dieselbe taxonomische Gruppe handelte.



**Abbildung 37:** Amplikonsequenzierung des fünften Anreicherungs-schrittes

### 1.3.12 Schlussfolgerungen

Vergleicht man die Isolate aus den „*in sacco*“ Versuchen mit den Klonbibliotheken, so fällt auf, dass mit den zunächst eingesetzten Medien und Zusätzen zwar cellulolytische Bakterien angereichert und isoliert werden konnten, diese allerdings in den Amplikonsequenzierungen nach Anreicherung unter Laborbedingungen nicht wiederzufinden sind. Umgekehrt konnte keiner der 16S-Klone in Reinkultur isoliert werden. Die erfolgreichen Isolate dagegen scheinen im Laborfermenter nicht abundant zu sein und für den Abbau von Biomasse eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Erst unter Laborbedingungen wurden diese Populationen gezielt angereichert. Dass es sich durchwegs um bereits mehrfach isolierte und gut charakterisierte Arten handelte, lässt den Schluss zu, dass diese besonders gut kultivierbar sind und andere schwerer kultivierbare Spezies bei den gewählten Bedingungen verdrängen.

Erst eine Änderung der Isolierungsstrategie und Zugabe von 10% Gärrest aus dem betreffenden Reaktor lieferte erste Isolate aus einer der taxonomischen Hauptgruppen der Klonbibliothek, welche die höchste Sequenzübereinstimmung mit *C. thermocellum* aus-

weist. Die Gruppe „*Halocella sp.*“ entzog sich leider weiterhin allen Isolierungsversuchen. Eine weitere Amplikonsequenzierung zeigte, dass diese Gruppe bereits nach der ersten Anreicherung unter Laborbedingungen nicht mehr wiedergefunden werden konnte. Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine wichtige Gruppe von Schlüsselbakterien für den Celluloseabbau in dieser Anlage mit den bisherigen Kultivierungsversuchen nicht erfasst werden konnte. Allerdings ist eine dieser wichtigen Gruppen nun identifiziert und kann daher in Zukunft mit gezielten Strategien in weitergehende Untersuchungen mit einbezogen werden. Auch steht nun eine wirksame Methode zur Verfügung, die es erlauben sollte, auch aus anderen Fermentern mit anderen Substraten und Fermentationsbedingungen Bakterien zu identifizieren, die am Biomasseabbau entscheidenden Anteil haben.

#### 1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von Arbeitspaket 2

Alle aus den untersuchten Biogasanlagen gewonnenen Isolate stammen aus dem Phylum Firmicutes und lassen sich wiederum in zwei Klassen (Clostridia, Bacilli) einordnen. Von den 8 isolierten Hauptgattungen gehört jedoch nur *Bacillus* in die Klasse der Bacilli. Aus den anderen Phyla, die in der Metagenomanalyse präsent sind, wurde keine Spezies isoliert. Dies kann zum einen daran liegen, dass auch bei molekularbiologischen Methoden eine Verschiebung der Populationszusammensetzung auftreten kann. Alle Schritte der Probenaufarbeitung, von den Probenahmen bis zur PCR der extrahierten DNA, können als potentielle Ursache für eine solche Verschiebung in Frage kommen. Bei der Extraktion der DNA kann es zu einer selektiven Anreicherung der DNA leichter zu lysierender Zellen im DNA-Extrakt kommen. Der Zellaufschluss bei Gram-positiven Bakterien ist aufgrund der dicken Zellwand deutlich schwieriger als der Aufschluss von Gram-negativen Bakterien. Ein unzureichender Zellaufschluss wird also vorrangig die DNA leicht zu lysierender Zellen enthalten, während bei zu harschen Extraktionsbedingungen die DNA geschert werden kann, was u.U. zu Artefakten führt. Allerdings wurde mit verschiedensten DNA-Extraktionsmethoden aus der Biogasanlage H1 ein ähnliches taxonomisches Profil erhalten.

Zum anderen sind im anaeroben Milieu, wie es in Biogasanlagen vorherrscht, überwiegend Vertreter der Gram-positiven Firmicutes für den Abbau lignocellulosehaltiger Biomasse verantwortlich (KOECK *et al.* 2014a). Da gezielt auf Cellulose und Hemicellulose angereichert wurde, ist es daher nicht verwunderlich, dass ausschließlich Vertreter der Firmicutes isoliert wurden. Der Anteil der Gattung *Clostridium* ist bei den Isolaten (70%) mehr als doppelt so hoch wie in der Metagenomanalyse der Anlage Viersen (29%) (**Abbildung 38**)



Obwohl es auch innerhalb der Bacilli cellulolytische Spezies gibt, waren diese unter den isolierten Spezies nicht vertreten. Möglicherweise sind die in der Metagenomanalyse gefundenen *Bacillus* Sequenzen von Spezies, die primär an der Acido- und Acetogenese beteiligt sind und weniger an der Hydrolyse von cellulosehaltigen Substraten. Falls sich innerhalb der Bacilli-Metagenomsequenzen ein cellulolytischer Vertreter befindet, wurde dieser mit den angewandten Isolierungsstrategien nicht erfasst. Vor allem die Ergebnisse von Metatranskriptomanalysen und Metaproteomanalysen anderer Biogasanlagen sprechen aber eher dafür, dass vor allen die Clostridien Glycosylhydrolasen bereitstellen und daher auch auf Cellulose vorwiegend angereichert und isoliert werden (LU *et al.* 2014, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012). Die Isolierungsergebnisse werden damit durch diese Experimente gestützt. Sowohl in der Metagenomanalyse als auch unter den späteren Isolaten ist *Clostridium thermocellum* die abundanteste Spezies. Es ist deshalb nicht erstaunlich (und unterstützt ebenfalls die Isolierungsergebnisse), dass auch unter den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Genomen das Genom von *C. thermocellum* mit 0,8% die beste Abdeckung mit dem Metagenomdatensatz der Biogasanlage H1 aufweist.

Sicherlich spielt dieses Bakterium, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle bei Biomasseabbau. Die häufige Isolierung aus Biogasanlagen liegt aber nach mikrobiologischer Erfahrung in erster Linie nicht an einer hohen Abundanz in der Ausgangsprobe, sondern auch an der einfachen und guten Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen.

Die gute Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen ist sicher auch der Grund, warum generell am häufigsten bereits bekannte Spezies isoliert wurden und selten neue Gattungen bzw. Arten. 91% der thermophilen Isolate aus Biogasanlage H1 konnten bereits bekannten Spezies zugeordnet werden. Bei der mesophilen Biogasanlage T3 waren es 79%. Mit Hilfe der einfachen Anreicherung und Reinigung (Strategie 1) wurden auch auf diversen Medien nur bereits bekannte Spezies angereichert. Diese scheinen unter Laborbedingungen selbst in geringen Ausgangsdichten andere schwieriger zu kultivierende Spezies schnell zu überwachsen. Erst das Arbeiten mit Verdünnungsreihen (Strategie 2 und 3) brachte den gewünschten Erfolg und lieferte bisher unbekannte Isolate. Die schlechte Kultivierbarkeit liegt also nicht nur an einer Spezies selbst, sondern an dem schnelleren Wachstum der konkurrierenden Arten, die sich noch im Ausgangsmaterial befinden. Schlechter anwachsende Bakterien mit längeren Generationszeiten auf den labortypischen und für viele Arten nicht optimalen Isolierungsmedien werden überwachsen und verdrängt. Für die erfolgreiche Isolierung neuer Spezies ist also weniger die Wahl des Medium (die man *a priori* nicht gut optimieren kann) sondern die Wahl der Isolierungsstrategie entscheidend. Als Kennzahl für die Biodiversität der Isolate wurde der Shannon-Wiener-Index herangezogen. Der höchste Wert (größte Diversität) zeigte sich bei den thermophilen Isolaten mit Strategie 2 und 3. Die mit Strategie 1 angereicherten Kulturen haben den niedrigsten Wert und somit die geringste Diversität – sie repräsentieren damit am wenigsten die vorhandene Population.

Ca. 10% der Metagenomsequenzen der Anlage in Viersen können keinem bisher bekannten Phylum zugeordnet werden. Zur vollständigen Interpretation der Daten ist es daher weiterhin unverzichtbar, die Isolierungsstrategien weiter zu entwickeln und neue Isolate zu gewinnen, die bisher unbekanntes Phyla angehören.

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, war der Einfluss des Substrats auf die Bakterienzusammensetzung und die Isolate. Dabei zeigte sich, dass vor allem Mischsubstrate (z.B. Maissilage) durch die Vielfalt an unterschiedlichen organischen Polymeren eine höhere Diversität der Isolate fördern. Wie erwartet ist auch die taxonomische Diversität der mesophilen Isolate wesentlich höher als die Diversität der thermophilen Isolate. Im mesophilen Bereich wurden 12 Gattungen isoliert, im thermophilen Bereich dagegen nur 8 Gattungen. Dies ist jedoch nicht erstaunlich, da insgesamt die biologische Diversität in thermophilen Habitaten eingeschränkt ist.

## 2 Verwertung

- *der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans*
- *Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende bzw. Aussichten für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse*
- *wirtschaftliche Erfolgsaussichten*

Laut statistischer Analysen zeigten besonders die beiden Isolate aus Biogasanlage J1 auch eine signifikant höhere Cellulaseaktivität als der Typstamm *C. thermocellum* ATCC 27405. Für den Stamm BC1 wurde ebenfalls eine signifikant höhere Aktivität des Cellulosoms auf Cellulose bei niedrigen pH-Werten nachgewiesen. Allerdings lassen sich aus der komparativen Analyse der Genome von BC1 und ATCC 27405 keine Rückschlüsse auf die Unterschiede in der Abbaueffizienz von Cellulose bei niedrigen pH-Werten ziehen. Ein vorangegangener Vergleich der Cellulosomen mittels MALDI-TOF MS Analyse zeigte, dass bei den beiden Stämmen mit besserem Biomasseabbau (BC1 und NB2) relativ zum Typstamm ein höherer Anteil an Xylanasen in deren Cellulosompräparationen detektiert werden konnten. Dies ist ein Indiz für die zentrale Bedeutung dieser Enzymklasse beim Abbau pflanzlicher Biomasse. In einer anderen Arbeit wurde zum einen die Anzahl der Cohesine zwischen den verschiedenen *cipA* Genen von BC1, NB2 und ATCC 27405 und zum Anderen die Aminosäuresequenz verschiedener CelR Exoglucanasen verglichen. Allerdings konnte bereits aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die Aminosäure- oder DNA-Sequenz cellulosomalere Komponenten nicht geeignet ist, die cellulolytische Effizienz verschiedener *C. thermocellum* Isolate zu vergleichen oder gar vorherzusagen (KOECK *et al.* 2015a).

Solche Stämme mit hohem cellulolytischen Potential scheinen sehr gut an die Bedingungen in Biogasanlagen angepasst zu sein und könnten als gezieltes Inokulum in Biogas-Fermentern zum Einsatz kommen, um den Lignocelluloseabbau zu verbessern.

Vorangegangene Untersuchungen belegen, dass durch gezielte Inokulation mit einem besonders effizient hydrolysierenden Bakterienstamm die Abbaurate und der Biogasertrag verbessert werden können (KÖLLMEIER 2013). Um das Inokulum optimal zu etablieren und so die Biogasausbeute zu erhöhen, ist allerdings eine kontinuierliche Bakterienzugabe der einmaligen Inokulation vorzuziehen (SCHMACK & REUTER 2010). Da in dieser Arbeit vor allem *C. thermocellum* aus fast jeder Biogasanlage angereichert und isoliert werden konnte, scheint diese Spezies eine wichtige Rolle bei Celluloseabbau während der hydrolytischen Stufe in Biogasanlagen zu spielen. Diese Aussage wird durch die Metagenomanalyse unterstützt (siehe nächsten Abschnitt).

Durch die phylogenetische Einordnung der Isolate konnten erste Informationen über eine mögliche Funktion der verschiedenen Arten im Reaktor gewonnen werden. Diese Informationen wurden mit den Ergebnissen physiologischer Experimente an den Reinkulturen ergänzt. Die Genome neuer Isolate können direkt mit den Sequenzen der Metagenome und Metatranskriptome verglichen werden, um so direkt Aussagen über Abundanz und Abbauleistung des Bakteriums zu treffen. Im Rahmen dieses Verbundprojekts wurden erstmals von einer thermophilen Biogasanlage eine Metagenomanalyse durchgeführt und aus derselben Anlage Isolate generiert.

Die Identifizierung der wichtigsten Akteure für den Celluloseabbau im Biogasfermenter wird durch das begrenzte Wissen über echt cellulolytische („truly cellulolytic“) Bakterien beschränkt. Einige wichtige Cellulose abbauenden Bakterien in der Natur scheinen immer noch unentdeckt, insbesondere in Biogasfermentern. Ein Beispiel dafür könnte die neu entdeckte „*Halocella* sp.“ Gruppe der Bakterien sein. Die Isolierung und umfassende Charakterisierung neuer cellulolytischer Bakterien von anaerob aufgeschlossenem Pflanzenmaterial im Rahmen dieser Arbeit wird wesentlich dazu beitragen, Verfahren zur Überwachung und Steuerung der Hydrolyse in den Fermentern zu entwickeln. Das Wissen um die Schlüsselorganismen wird auch dazu beitragen, die optimalen Bedingungen für die Substrathydrolyse zu definieren und die optimale Bakterienkultur zur Inokulation von Biogasfermentern zu ermitteln, mit dem Ziel einer besseren Substratverwertung und einer höheren Raumzeitausbeute.

Die sequenzierten Genome bieten zusätzlich einen Zugang zu bisher nicht bekannten Enzymen mit neuen Eigenschaften für den Biomasseabbau. Dieses Wissen wird helfen, die kommerziell hergestellten Cellulase- und Hemicellulase-Mischungen zu verbessern und damit die Biotechnologie der zweiten und dritten Generation, welche sich auf die Verwertung von lignocellulosehaltigem Material konzentriert, einen entscheidenden Schritt nach vorne zu bringen.

Wichtige Ergebnisse dieses Teilprojektes werden in themenverwandten anderen Projekten (wie Biogas-MARKER oder ValorPlus) dieses Lehrstuhls oder anderer Projektpartner weiter verarbeitet und finden dort Anwendung. Der wissenschaftliche Austausch mit den Projektpartnern wird weiter bestehen und in naher Zukunft werden auch noch weitere gemeinsame Publikationen verfertigt werden. So ist eine gemeinsame Publika-

tion über die zusammengefassten Ergebnisse der Analyse des Viersen-Fermenters in Vorbereitung.

### 3 Erkenntnisse von Dritten

- während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Krauss J., Zverlov V.V., Schwarz W.H. (2012): In vitro reconstitution of the complete *Clostridium thermocellum* cellulosome and synergistic activity on crystalline cellulose. Appl. Environm. Microbiol. 78: 4301-4307.

Ji S., Wang S., Tan Y., Chen X., Schwarz W., Li F. (2012): An untapped bacterial cellulolytic community enriched from coastal marine sediment under anaerobic and thermophilic conditions. FEMS Microbiol Lett. 335: 39-46. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02636.x.

Poehlein A., Zverlov V.V., Daniel R., Schwarz W.H., Liebl W. (2013): Complete Genome Sequence of *Clostridium stercorarium* subsp. *stercorarium* DSM 8532, a Thermophilic Degrader of Plant Cell Wall Fibers. Genome Announcements. Doi: 10.1128/genomeA.00073-13, vol. 1(2)

Yu Xia, Yubo Wang, Herbert H.P. Fang, Tao Jin, Huanzi Zhong & Tong Zhang(2014). Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. Scientific Reports 4 4:6708.

Zhang K, Chen X, Schwarz WH, Li F (2014). Synergism of glycoside hydrolase secretomes from two thermophilic bacteria cocultivated on lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 2592-2601.

### 4 Veröffentlichungen

Aus diesem Projekt sind folgende Publikationen hervorgegangen:

**Koeck D.E.**, Ludwig W., Wanner G., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. (2015): *Herbinix hemicellulosilytica*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. DOI: 10.1099/ijs.0.000264

Zverlov V.V., **Koeck D.E.**, Schwarz W.H. (2015): The Role of Cellulose-Hydrolyzing Bacteria in the Production of Biogas from Plant Biomass. In B. Kamm (ed.), Microorganisms in Biorefineries, Microbiology Monographs 26: 335-361.

**Koeck D.E.**, Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. (2014): Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. Syst Appl Microbiol. 37:311-319.

**Koeck D.E.**, Pechtl A., Zverlov V.V., Schwarz W.H. (2014): Genomics of cellulolytic bacteria. Curr Opin Biotechnol. 29:171-183.

**Koeck D.E.**, Wibberg D., Maus I., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. (2014): Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. J Biotechnol. 188: 136-137.

**Koeck D.E.**, Wibberg D., Maus I., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. (2014): First draft genome sequence of the amylolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. J Biotechnol. 192: 154-155

**Koeck D.E.**, Wibberg D., Köllmeier T., Blom J., Jaenicke S., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V.V., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. (2013): Draft genome sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* wild-type strain BC1 playing a role in cellulosic biomass degradation. J.Biotechnol. 168: 62-63.

#### **Publikationen in Vorbereitung (in press, eingereicht und in Vorbereitung):**

---

**Koeck D.E.**, Koellmeier T., Schiffner S., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. (2015): Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. Systematic and Applied Microbiology. (in press)

**Koeck D.E.**, Hahnke S., Mechelke M., Liebl W., Zverlov V.V., Schwarz W.H. *Herbivorax sacculosum* sp. nov., a cellulolytic, anaerobic bacterium isolated via *in sacco* enrichments from a lab scale biogas reactor. (in Vorbereitung)

**Koeck D.E.**, Hahnke S., Zverlov V.V. *Herbinix treslupi* sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. (in Vorbereitung)

**Koeck D.E.**, Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler, Schwarz W.H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55T, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. (in Vorbereitung)

Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix* sp. SD1D, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. (in Vorbereitung)

#### **Konferenzbeiträge**

---

**Koeck D.E.**, Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. (2015): Isolierung of novel cellulolytic bacteria from biogas plants and characterization of their cellulolytic and hemicellulolytic potential. Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. San Diego. USA

**Koeck D.E.**, Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. (2014): Isolierung of cellulolytic bacteria from biogas plants and comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. Conference on Biogas Microbiology. Uppsala. Sweden

Schwarz W.H., Zverlov V.V., **Koeck D.E.** (2014): Cellulolytic bacteria in industrial biogas-plants. Mie Bioforum in Nemuno Sato, Japan (20.11.2014) – eingeladener Vortrag

**Koeck D.E.**, Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. Isolation of novel cellulolytic bacteria from biogas plants and characterization of their cellulolytic and hemicellulolytic potential. Gordon Research Conference "Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes", 2.-7.8.2015 (Poster)

---

**Referenzen**

---

- ABOU-ZEID D.M., BIEBL H., SPROER C., MULLER R.J. (2004):** *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-negative, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 951-954.
- ALAIN K., QUERELLOU J. (2009):** Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**: 583-594.
- ANTONI D., ZVERLOV V.V., SCHWARZ W.H. (2007):** Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 23-35.
- BAUER C., KORTHALS M., GRONAUER A., LEBUHN M. (2008):** Methanogens in biogas production from renewable resources--a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology* **58**: 1433-1439.
- BRAZIER J.S. (2001):** Typing of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection* **7**: 428-431.
- CIRNE D.G., LEHTOMAKI A., BJORNSSON L., BLACKALL L.L. (2007):** Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 516-527.
- COMBET-BLANC Y., OLLIVIER B., STREICHER C., PATEL B.K., DWIVEDI P.P., POT B. et al (1995):** *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 9-16.
- COOREVITS A., LOGAN N.A., DINSDALE A.E., HALKET G., SCHELDAMAN P., HEYNDRIX M. et al (2011):** *Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 1954-1961.
- DION M., FOURAGE L., HALLET J.N., COLAS B. (1999):** Cloning and expression of a beta-glycosidase gene from *Thermus thermophilus*: Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconjugate Journal* **16**: 27-37.
- EDER B., SCHULZ H. (2007):** *Biogas Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit*. Stauf: Freiburg.
- Euzeby J. (2010):** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 1009-1010.
- FNR (2013):** Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.: Gülzow-Prüzen.
- FREIER D., MOTHERSHED C.P., WIEGEL J. (1988):** Characterisation of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 204-211.
- GÖRISCH U., HELM M. (2006):** *Biogasanlagen*: Stuttgart.
- GOSALBES M.J., DURBAN A., PIGNATELLI M., ABELLAN J.J., JIMENEZ-HERNANDEZ N., PEREZ-COBAS A.E. et al (2011):** Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS one* **6**: e17447.
- HE Y.L., DING Y.F., LONG Y.Q. (1991):** Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 306-309.
- KAEBERLEIN T., LEWIS K., EPSTEIN S.S. (2002):** Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- KAZAMIA E., SMITH A.G. (2014):** Assessing the environmental sustainability of biofuels. *Trends in Plant Science* **19**: 615-618.

- KITTELMANN S., SEEDORF H., WALTERS W.A., CLEMENTE J.C., KNIGHT R., GORDON J.I. et al (2013):** Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS one* **8**: e47879.
- KOECK D.E., PECHTL A., ZVERLOV V.V., SCHWARZ W.H. (2014A):** Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **29**: 171-183.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V. et al (2014b).** Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology* **188C**: 136-137.
- KOECK D.E., WIBBERG D., MAUS I., WINKLER A., ALBERSMEIER A., ZVERLOV V.V. et al (2014c).** First draft genome sequence of the amylolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology* **192 Pt A**: 154-155.
- KOECK D.E., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2014D):** Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: Genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Systematic and Applied Microbiology* **37**: 311-319.
- KOECK D.E., KOELLMEIER T., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2015a):** Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. *Systematic and Applied Microbiology* **38**: 424-432.
- KOECK D.E., LUDWIG W., WANNER G., ZVERLOV V.V., LIEBL W., SCHWARZ W.H. (2015b):** *Herbinix hemicellulosilytica*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 2365-2371.
- KÖLLMEIER T. (2013):** Analyse spezialisierter Bakteriengemeinschaften und deren cellulolytische Hauptvertreter für die Hydrolyse in thermophilen Biogasanlagen. PhD thesis, Technische Universität München, München.
- KRAUSE L., DIAZ N.N., EDWARDS R.A., GARTEMANN K.-H., KRÖMEKE H., NEUWGER H. et al (2008):** Taxonomic composition and gene content of a methane producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology* **136**: 91-101.
- LAKANIEMI A.M., HULATT C.J., THOMAS D.N., TUOVINEN O.H., PUHAKKA J.A. (2011):** Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnology for Biofuels* **4**: 34.
- LU F., BIZE A., GUILLOT A., MONNET V., MADIGOU C., CHAPLEUR O. et al. (2014):** Metaproteomics of cellulose methanisation under thermophilic conditions reveals a surprisingly high proteolytic activity. *The ISME journal* **8**: 88-102.
- LUDWIG W., SCHLEIFER K.-H., WHITMAN W.B. (2009):** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Revised road map to the phylum Firmicutes*, Vol. 3. Springer: New York, USA.
- MARCHANDIN H., TEYSSIER C., CAMPOS J., JEAN-PIERRE H., ROGER F., GAY B. et al (2010):** *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes classis* nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 1271-1279.
- MC BEE R. (1954):** The characteristics of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology* **67**: 505-506.

- MEEHAN C.J., BEIKO R.G. (2014):** A phylogenomic view of ecological specialization in the *Lachnospiraceae*, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biology and Evolution* **6**: 703-713.
- NISSILA M.E., TAHTI H.P., RINTALA J.A., PUHAKKA J.A. (2011):** Effects of heat treatment on hydrogen production potential and microbial community of thermophilic compost enrichment cultures. *Bioresource Technology* **102**: 4501-4506.
- PARTE A.C. (2014):** LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* **42**: D613-D616.
- PHAM V.H., KIM J. (2012):** Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology* **30**: 475-484.
- PODOSOKORSKAYA O.A., BONCH-OSMOLOVSKAYA E.A., BESKOROVAYNNY A.V., TOSHCHAKOV S.V., KOLGANOVA T.V., KUBLANOV I.V. (2014):** *Mobilitalea sibirica* gen. nov., sp nov., a halotolerant polysaccharide-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 2657-2661.
- RADEMACHER A., ZAKRZEWSKI M., SCHLUTER A., SCHONBERG M., SZCZEPANOWSKI R., GOESMANN A. et al (2012):** Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology* **79**: 785-799.
- Rainey F.A. (2009)** Family V. *Lachnospiraceae* fam. nov. In: De Vos P. et al. (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 3 (The Firmicutes), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. p. 921.
- SAUER S., FREIWALD A., MAIER T., KUBE M., REINHARDT R., KOSTRZEWA M. et al (2008):** Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS one* **3**: e2843.
- SAUER S., KLIEM M. (2010):** Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews* **8**: 74-82.
- SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N.N., DONDRUP M., EICHENLAUB R., GARTEMANN K.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. *Journal of Biotechnology* **136**: 77-90.
- SCHMACK D., REUTER M. (2010):** Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität der Biogasprozesses.
- SCHOENBORN L., YATES P.S., GRINTON B.E., HUGENHOLTZ P., JANSSEN P.H. (2004):** Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4363-4366.
- STAMS A.J.M., VANDIJK J.B., DIJKEMA C., PLUGGE C.M. (1993):** Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1114-1119.
- STIEGLMEIER M., WIRTH R., KMINEK G., MOISSL-EICHINGER C. (2009):** Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3484-3491.
- TINDALL B.J., ROSSELLO-MORA R., BUSSE H.J., LUDWIG W., KAMPFER P. (2010):** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 249-266.
- UENO Y., HARUTA S., ISHII M., IGARASHI Y. (2001):** Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 555-562.

- VAREL V.H., TANNER R.S., WOESE C.R. (1995):** *Clostridium herbivorans* sp. nov., a cellulolytic anaerobe from the pig intestine. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 490-494.
- VARTOUKIAN S.R., PALMER R.M., WADE W.G. (2010):** Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **309**: 1-7.
- WANG J.Y., STABNIKOVA O., IVANOV V., TAY S.T., TAY J.H. (2003):** Intensive aerobic bioconversion of sewage sludge and food waste into fertiliser. *Waste Management & Research* **21**: 405-415.
- WEILAND P. (2006):** Biomass digestion in agriculture: A successful pathway for the energy production and waste treatment in Germany. *Engineering in Life Science* **6**: 302-309.
- WENZEL W. (2002):** Mikrobiologische Charakterisierung eines Anaerobreaktors zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe. PhD Thesis, Technische Universität Berlin, Berlin.
- WIETSCHEL M., ARENS M., DÖTSCH C., HERKEL S., KREWITT W., MARKEWITZ P. et al (2010):** *Energiotechnologien 2050. Politikbericht*. Fraunhofer Verlag: Stuttgart.
- WIRTH R., KOVACS E., MAROTI G., BAGI Z., RAKHELY G., KOVACS K.L. (2012):** Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 41.
- YUTIN N., GALPERIN M.Y. (2013):** A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology* **15**: 2631-2641.
- ZAIß H.N., RUPNIK M., KUIJPER E.J., HARMANUS C., MICHIELSEN D., JANSSENS K. et al (2009):** Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC Microbiology* **9**: 6.
- ZAKRZEWSKI M., GOESMANN A., JAENICKE S., JUNEMANN S., EIKMEYER F., SZCZEPANOWSKI R. et al. (2012):** Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *Journal of Biotechnology* **158**: 248-258.
- ZAKRZEWSKI M., BEKEL T., ANDER C., PUHLER A., RUPP O., STOYE J. et al. (2013):** MetaSAMS-- a novel software platform for taxonomic classification, functional annotation and comparative analysis of metagenome datasets. *Journal of Biotechnology* **167**: 156-165.
- ZHANG H., SEKIGUCHI Y., HANADA S., HUGENHOLTZ P., KIM H., KAMAGATA Y. et al. (2003):** *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating microorganism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1155-1163.
- ZHANG K., CHEN X., SCHWARZ W.H., LI F. (2014):** Synergism of glycoside hydrolase secretomes from two thermophilic bacteria cocultivated on lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2592-2601.
- ZIGANSHIN A.M., LIEBETRAU J., PROTER J., KLEINSTEUBER S. (2013):** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 5161-5174.
- ZVERLOV V., KLUPP M., KRAUSS J., SCHWARZ W.H. (2008):** Mutations in the scaffoldin gene, *cipA*, of *Clostridium thermocellum* with impaired cellulosome formation and cellulose hydrolysis: Insertions of a new transposable element, IS1447, and implications for cellulase synergism on crystalline cellulose. *Journal of Bacteriology* **190**: 4321-4327.

**In der Reihe**
**Bornimer Agrartechnische Berichte**

sind bisher erschienen:

Heft 1	Technik und Verfahren der Landschaftspflege	1992
Heft 2	Beiträge zur Lagerung und Verarbeitung pflanzenbaulicher Produkte	1993
Heft 3	Technik und Verfahren in der Tierhaltung	1993
Heft 4	Technik und Verfahren der Landschaftspflege und für die Verwendung der anfallenden Materialien	1994
Heft 5	Verfahrenstechnik der Aufbereitung, Lagerung und Qualitätserhaltung pflanzlicher Produkte	1994
Heft 6	Biokonversion nachwachsender Rohstoffe und Verfahren für Reststoffbehandlung	1994
Heft 7	Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Landarbeit und Schlepperprüffeld in Bornim 1927 bis 1945	1995
Heft 8	Qualitätssicherung und Direktvermarktung	1996
Heft 9	Konservierende Bodenbearbeitung auf Sandböden	1996
Heft 10	Anwendung wärme- und strömungstechnischer Grundlagen in der Landwirtschaft	1996
Heft 11	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1996	1996
Heft 12	Aufbereitung und Verwertung organischer Reststoffe im ländlichen Raum	1996
Heft 13	Wege zur Verbesserung der Kartoffelqualität durch Verminderung der mechanischen Beanspruchung	1997
Heft 14	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1997	1997
Heft 15	Technische und ökonomische Aspekte der Nutztierhaltung in großen Beständen	1997
Heft 16	11. Arbeitswissenschaftliches Seminar	1997
Heft 17	Nachwachsende Rohstoffe im Land Brandenburg Stand Aktivitäten und Perspektiven einer zukunftsfähigen und umweltgerechten Entwicklung	1998
Heft 18	Qualität von Agrarprodukten	1998
Heft 19	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1998	1998

Heft 20	Beiträge zur teilflächenspezifischen Bewirtschaftung	1998
Heft 21	Landnutzung im Spiegel der Technikbewertung – Methoden Indikatoren, Fallbeispiele	1998
Heft 22	Kriterien der Nachhaltigkeit in der Verfahrensentwicklung für die Nutztierhaltung	1999
Heft 23	Situation und Trends in der Landtechnik / Erneuerbare Energien in der Landwirtschaft	1999
Heft 24	Institut für Landtechnik der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 1951 bis 1965	1999
Heft 25	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1999 / 2000	2000
Heft 26	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2001	2001
Heft 27	Approaching Agricultural technology and Economic Development of Central and Eastern Europe	2001
Heft 28	6 <sup>th</sup> International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering	2001
Heft 29	Measurement Systems for Animal Data and their Importance for Herd Management on Dairy Cow Farms	2002
Heft 30	Produktion, Verarbeitung und Anwendung von Naturfasern	2002
Heft 31	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2002	2002
Heft 32	Biogas und Energielandwirtschaft - Potenzial, Nutzung, Grünes Gas <sup>TM</sup> , Ökologie und Ökonomie	2003
Heft 33	Sozioökonomische Aspekte zu Perspektiven des Offenlandmanagements	2003
Heft 34	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2003	2003
Heft 35	Energieholzproduktion in der Landwirtschaft Potenzial, Anbau, Technologie, Ökologie und Ökonomie	2004
Heft 36	High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 2003	2004
Heft 37	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2004	2004
Heft 38	Die Landmaschinenprüfung in der DDR 1951-1991 und ihre Vorgeschichte	2004
Heft 39	Energieverlust und Schimmelpilzentwicklung bei der Lagerung von Feldholz-Hackgut	2005
Heft 40	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2005	2005

Heft 41	Demonstration der Langzeitwirkung bedarfsorientierter Fungizidbehandlung mit dem CROP-Meter	2005
Heft 42	Biochemicals and Energy from Sustainable Utilization of herbaceous Biomass (BESUB)	2005
Heft 43	Ozontes Waschwasser zur Qualitätssicherung leichtverderblicher Produkte - Entwicklung einer <i>Fuzzy-Logic</i> -Steuerung des Waschprozesses	2005
Heft 44	Messsystem zur Bewertung des Unkrautvorkommens	2005
Heft 45	Anwendung der Thermographie zur Optimierung der Belüftungssteuerung bei der Lagerhaltung landwirtschaftlicher Produkte	2005
Heft 46	Membranbioreaktor zur Aufbereitung von Schlachthofabwässern Prozesssteuerung von Biogasanlagen mit Kofermentation	2005
Heft 47	Verschleißeinfluss auf das Förderverhalten von Drehkolbenpumpen	2005
Heft 48	Qualitätserhaltung und Qualitätssicherung von Bioobst und Biogemüse in der Nachernte	2005
Heft 49	Miniaturisiertes Datenerfassungs-System zum Implantieren in Früchte und zur Messung ihrer mechanischen Belastung durch Ernte- und Nachernteverfahren	2005
Heft 50	Prozesskontrolle der Qualität von frischem Obst und Gemüse mit Hilfe eines Multigas-Sensors	2005
Heft 51	Entwicklung eines Echtzeitsensors für die Stärkebestimmung bei Kartoffeln als funktionaler Bestandteil eines optoelektronischen Verleseautomaten	2005
Heft 52	Optimierte Steuerung von Getreide-Schachttrocknern	2005
Heft 53	Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung von Rizinusöl	2005
Heft 54	Non-Destructive Methods for Detecting Health-Promoting Compounds COST Action 924 Working Group Meeting	2005
Heft 55	4 <sup>th</sup> IFAC / CIGR Workshop Control Applications in Post - Harvest and Processing Technology (CAPPT 2006) 26th - 29th March 2006, Potsdam, GERMANY	2006
Heft 56	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2006	2006
Heft 57	Kontrolle der Frische in der Nacherntekette von Ökogemüse	2006
Heft 58	Entwicklung eines innovativen Dekontaminationsverfahrens als Technologieantwort auf zukünftiges Qualitätsmanagement im Nacherntebereich	2006

Heft 59	Experimental Studies and Mathematical Modelling of Solar Drying System for Production of High Quality Dried Tomato	2007
Heft 60	13. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft & 4. Workshop Precision Farming	2007
Heft 61	Energiepflanzen im Aufwind Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Erfahrungen zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz	2007
Heft 62	14. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft	2008
Heft 63	Experten-Workshop Lagerung von Holzhackschnitzeln	2008
Heft 64	Postharvest unlimited 2008	2008
Heft 65	Vom Agrarrohstoff zu neuen Produkten – Verfahrenstechnische Forschung im Nacherntebereich	2009
Heft 66	16. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau	2009
Heft 67	Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems	2009
Heft 68	Wieviel Biogas steckt in Pflanzen? Abschluss- Symposium des "Biogas-Crops-Network" (BCN) 7. Mai 2009 Potsdam	2009
Heft 69	Image Analysis for Agricultural Products and Processes 27 to 28. Aug. 2009 Potsdam	2009
Heft 70	5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management 31. Aug. to 02. Sept. 2009 Potsdam	2009
Heft 71	Einsatz von Biogas in PEM-Brennstoffzellen	2009
Heft 72	Teilflächenspezifische Grunddüngung	2009
Heft 73	16. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 04. Mai 2010 Braunschweig	2010
Heft 74	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette Getreide-</i>	2010
Heft 75	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette pflanzliche Frischeprodukte-</i>	2010
Heft 76	International Workshop The future of the quarter individual milking 14. – 15. September 2010 Potsdam	2010

Heft 77	A flow cytometric approach to monitor the effects of gentle preservation techniques in the postharvest chain	2011
Heft 78	17. und 18. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 05. Mai 2011 Stuttgart und 09. Mai 2012 Osnabrück	2012
Heft 79	2. Öffentliches Symposium des „BCN“ BiogasPOTENZIALE Erkennen, Erforschen, Erwirtschaften	2012
Heft 80	Mechanisms of Bacillus spore germination and inactivation during high pressure processing	2013
Heft 81	19. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 2. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme in der Landwirtschaft 06. – 07. Mai 2013 Berlin	2013
Heft 82	3rd Global Workshop on Proximal Soil Sensing	2013
Heft 83	19. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau 11. – 12. März 2014 Dresden	2014
Heft 84	Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen Schlussbericht zum Forschungsverbund BIOGAS-BIOCOENOSIS	2014
Heft 85	Sensoren. Modelle. Erntetechnik Kolloquium zur Verabschiedung von Dr. Ehlert 27. Mai 2014, Potsdam-Bornim	2014
Heft 86	Phosphor für die Landwirtschaft – Strategien für eine endliche Ressource 11. Juni 2014, Potsdam-Bornim	2014
Heft 87	Biofilme in Biogasanlagen - Struktur, Einfluss auf die Biogasausbeute und Optimierung technischer Systeme zur Rückhaltung der mikrobiellen Biomasse BIOGAS-BIOFILM	2015
Heft 88	20. und 21. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 3. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme (UAS) in der Landwirtschaft 26. Mai 2014, Osnabrück und 06. und 07. Mai 2015, Braunschweig	2015
Heft 89	International Biochar Symposium: Biochar Contribution to Sustainable Agriculture 28 <sup>th</sup> – 29 <sup>th</sup> May 2015, Potsdam	2015
Heft 90	ISHS Symposium 2016 “Sensing Plant Water Status” Methods and Applications in Horticultural Science 05 <sup>th</sup> – 07 <sup>th</sup> October 2016 Potsdam	2016

---

Heft 91	10 <sup>Th</sup> International FRUTIC Symposium Quality and Safety of Fresh Horticultural Commodities February 07, 2017	2017
Heft 92	Etablierung eines <i>core</i> -Mikrobioms für Biogasanlagen Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen BIOGAS-CORE	2017

Interessenten wenden sich an:

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.  
Max-Eyth-Allee 100  
14469 Potsdam

Tel.: (0331) 5699-820  
Fax.: (0331) 5699-849  
E-Mail: [atb@atb-potsdam.de](mailto:atb@atb-potsdam.de)

Schutzgebühr Print: 20,00 Euro

CD-Rom: 10,00 Euro