

## **Schlussbericht zum Projekt FNR 22018306**

# **Charakterisierung der mikrobiellen Diversität in Biogasreaktoren bei semikontinuierlicher Beschickung mit pflanzlicher Biomasse und Gülle in unterschiedlichen Belastungsstufen**

### **Autoren**

Dr. Michael Klocke  
Dipl.-Ing. (FH) Mario Sontag  
Dipl.-Biol. Ingo Bergmann  
Dr. Pia Mähnert

### **Zuwendungsempfänger**

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

### **Projektleiter**

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

### **Förderkennzeichen**

22018306

### **Vorhabenbezeichnung**

Charakterisierung der mikrobiellen Diversität in Biogasreaktoren bei semikontinuierlicher Beschickung mit pflanzlicher Biomasse und Gülle in unterschiedlichen Belastungsstufen

### **Laufzeit des Vorhabens**

01.02.2007 bis 31.07.2009

### **Berichtszeitraum**

01.02.2007 bis 31.07.2009

## Inhaltsverzeichnis

### I. Ziele

|                                        |   |
|----------------------------------------|---|
| I.1 Aufgabenstellung                   | 1 |
| I.2 Stand der Technik                  | 5 |
| I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen | 7 |

### II. Ergebnisse

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.1 Erzielte Ergebnisse                                                                                       | 8  |
| Versuchsteil A - Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose bei Monofermentation unterschiedlicher Substrate | 8  |
| <i>Mesophiler Ansatz</i>                                                                                       | 8  |
| <i>Thermophiler Ansatz</i>                                                                                     | 10 |
| <i>Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft</i>                                                                  | 12 |
| Versuchsteil B - Mikrobielle Diversität bei gesteigerter Raumbelastung                                         | 20 |
| <i>Mesophiler Ansatz</i>                                                                                       | 20 |
| <i>Thermophiler Ansatz</i>                                                                                     | 23 |
| <i>Struktur der bakteriellen Gemeinschaft</i>                                                                  | 26 |
| <i>Struktur der Gemeinschaft methanogener Archaea</i>                                                          | 30 |
| Zitierte Literatur                                                                                             | 41 |
| II.2 Verwertung                                                                                                | 42 |
| II.3 Erkenntnisse von Dritten                                                                                  | 42 |
| II.4 Veröffentlichungen                                                                                        | 43 |

### Anhang

|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anhang 1: Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil A ermittelten taxonomischen Einheiten  | A2  |
| Anhang 2: Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil B ermittelten taxonomischen Einheiten  | A45 |
| Anhang 3: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A1 ermittelten OTUs    | A77 |
| Anhang 4: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A2 ermittelten OTUs    | A80 |
| Anhang 5: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Bacteria | A83 |
| Anhang 6: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Archaea  | A88 |

## I. Ziele

### I.1 Aufgabenstellung

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlichen Primärprodukten wie Energiepflanzen ist ein wichtiger Baustein im Rahmen einer nachhaltigen und CO<sub>2</sub>-neutralen Energieerzeugung. Gegenwärtig stehen im Fokus der Forschung die Entwicklung von optimierten Biogasreaktoren, die Etablierung von optimierten Reaktorfahrweisen sowie die Optimierung der Substratbereitstellung. Das mikrobiologische System Biogasfermentation stellt jedoch nach wie vor eine *black box* dar, deren wesentliche Komponenten nach wie vor nur ansatzweise bekannt sind. Insbesondere fehlen detaillierte Analysen der beteiligten Mikroorganismen bzw. der mikrobiellen Artenzusammensetzung sowie deren Abhängigkeit von verfahrenstechnischen Faktoren.

Im Rahmen dieses Projektes soll die mikrobielle Diversität in vollständig durchmischten Biogasreaktoren (CSTR) bei Beschickung mit pflanzlichen Substraten untersucht werden. Insbesondere sollen Änderungen in der Populationsstruktur bei einer kontinuierlichen Steigerung der Belastung des Reaktors mit organischer Substanz bis hin zu einer Übersäuerung verfolgt werden. Die Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften soll mittels eines molekulargenetischen Ansatzes basierend auf der Analyse der Nukleotidsequenz für das mikrobielle 16S rRNA Gen (16S rDNA) erfolgen.

Die Ziele der Arbeiten sind im Einzelnen:

- (1) Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose bei unterschiedlichen Zugabesubstraten,
- (2) Ermittlung des Einflusses der Betriebstemperatur auf die mikrobielle Diversität,
- (3) Charakterisierung der lytischen Bakterien, welche den primären Aufschluss der pflanzlichen Biomasse durchführen,
- (4) Charakterisierung der Bakterien, welche bei steigender Belastungsrate zu einer Übersäuerung des Reaktors führen,
- (5) Analyse der zeitlichen Variation bzw. der Konstanz innerhalb der methanbildenden Archaeobakterien.

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

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

Die AG Molekularbiologie (Leitung: Dr. M. Klocke) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik bearbeitet molekularbiologische Fragestellungen aus dem Bereich der angewandten Mikrobiologie. Zu den Arbeitsschwerpunkten gehören die Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in technischen An-

wendungen mittels molekulargenetischer Methoden, die Entwicklung von marker-gestützten Nachweisverfahren für bioverfahrenstechnisch genutzte Mikroorganismen sowie die prozessbegleitende mikrobiologische Analytik zur Identifikation von Kontaminanten und Isolaten.

Diese Studie beruht auf der Analyse eines Langzeitversuchs zur Biomethanisierung von nachwachsenden Rohstoffen bei veränderter Raumbelastung (Betrieb des CSTR-Biogasreaktors), welche im Rahmen des Drittmittelprojektes *Kinetik der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen bei kontinuierlicher Prozessführung als Grundlage für die Bemessung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen* (Förderung: FNR - 22011402) durchgeführt wurde (vgl. Abb. 1 und 2). Die Probennahme der Gärrückstände zur mikrobiellen Analyse erfolgte alle 2 Wochen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die DNA-Präparation aus den gelagerten Proben wurde nach dem Protokoll von KLOCKE *et al.* [2006] durchgeführt.

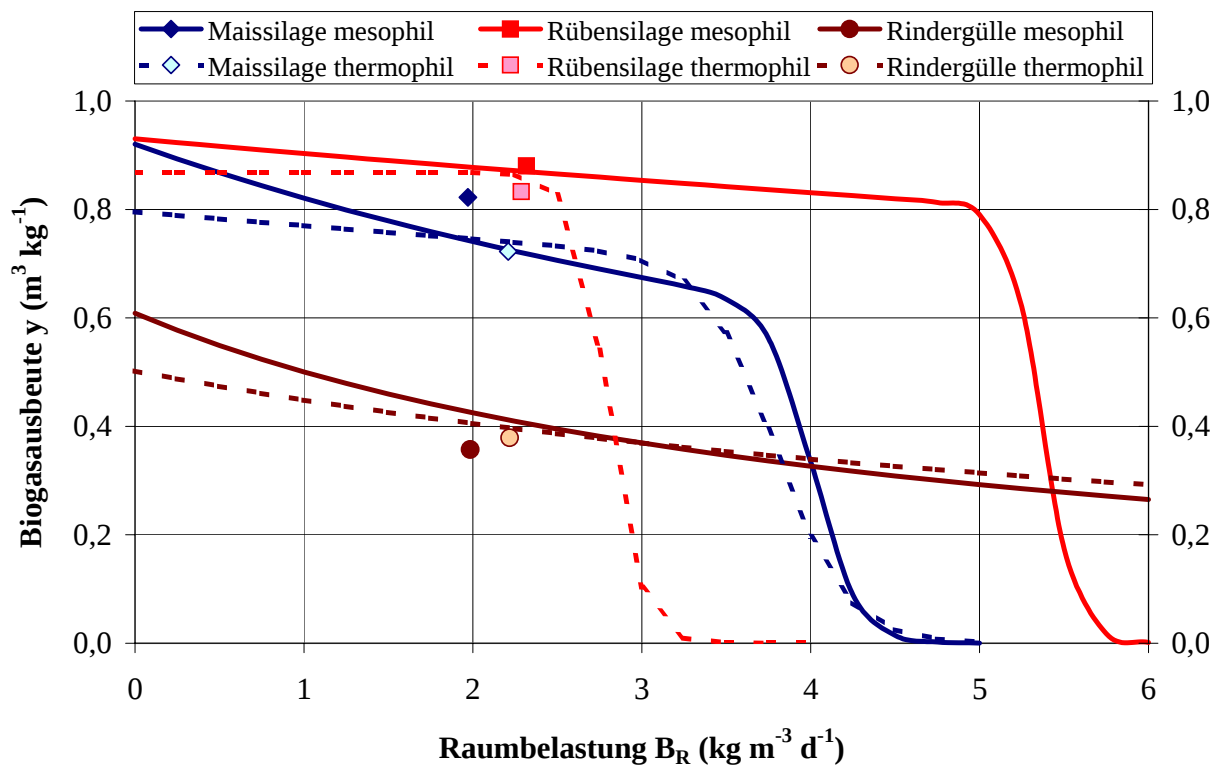


Abb. 1: Biogasausbeuten von Maissilage, Rübensilage und Rindergülle unter meso- und thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung  $B_R$  (=OLR). Die Symbole stellen die Zeitpunkte der Probennahme dar.

Die Auswahl der zu bearbeitenden Proben orientierte sich an der Raumbelastung ( $B_R$ ) bzw. der *organic loading rate* (OLR) sowie an den jeweiligen Biogasausbeuten (vgl. Abb. 1 und 2 sowie Tab. 2). Mit zunehmender Raumbelastung nimmt die Biogasausbeute  $y$  in  $\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$  oTS (organische Trockensubstanz) gemäß einer hyperbolischen Funktion in Abhängigkeit von der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ab [LINKE & MÄHNERT 2005]. Die Biogasrate  $r$  als Produkt aus OLR und  $y$  nimmt jedoch zu, bis ein kritischer Grenzwert erreicht ist. Ab dieser substrat- und prozessabhängigen kritischen Raumbelastung kommt es zu einer Übersäuerung des Prozesses und  $y$  und  $r$  fallen in starkem Maße ab, bis es zum Erliegen der Biogasproduktion kommt. Bei den vorliegenden Versuchen ist dieser Grenzwert bei der thermophilen Vergärung von Rübensilage bereits bei OLR in Höhe von  $2,5 \text{ kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$  erreicht (Abb. 1). Um alle Varianten im optimalen Bereich mit-

einander vergleichen zu können, wurden alle sechs Proben im gleichen OLR-Bereich genommen. Dieser wurde auf  $2 - 2,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  festgelegt, um Prozesse einerseits mit hoher Biogasrate, andererseits ohne Übersäuerung charakterisieren zu können.

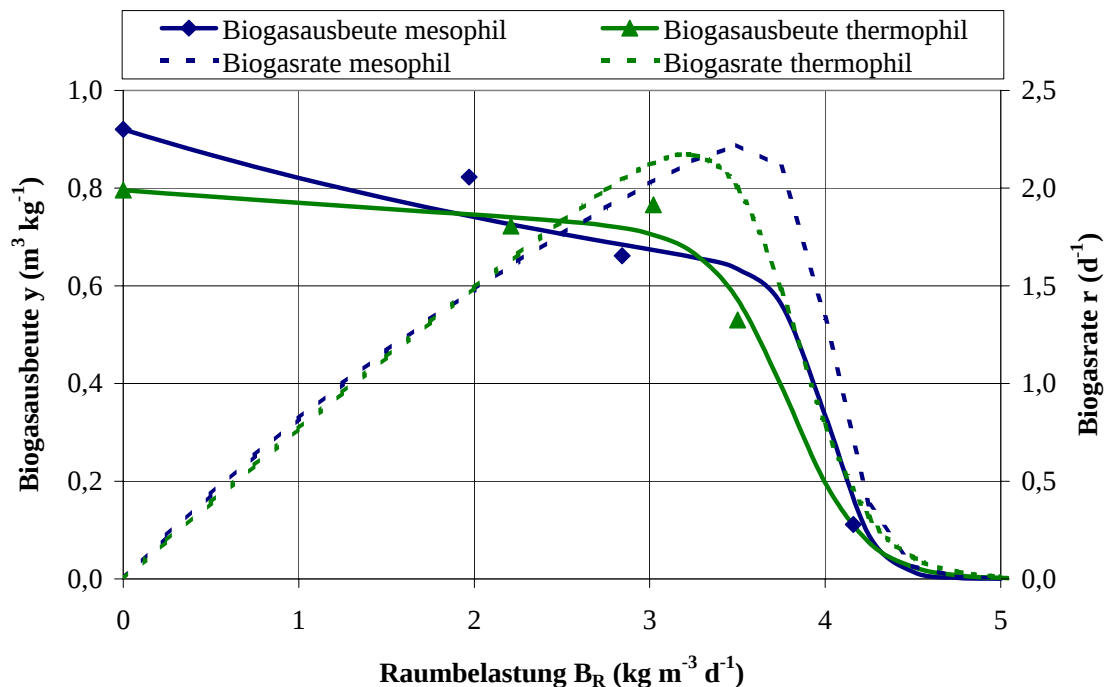


Abb. 2: Biogasausbeuten von Maissilage unter meso- und thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung  $B_R$  bzw. OLR. Die Symbole stellen die Zeitpunkte der Probenahme dar.

Um die Populationsdynamiken bei mesophilen und thermophilen Prozessen beurteilen zu können, wurden Proben bei unterschiedlichen  $B_R$  im Falle der Monovergärung von Maissilage betrachtet (Abb.2). Dabei wurde jeweils eine Probe zu Beginn und am Ende der Langzeitversuche genommen. Zusätzlich zu den Proben aus dem  $B_R$ -Bereich von  $2 - 2,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  wurden zur Charakterisierung des optimalen Biogasprozesses mit hohen Biogasraten Proben bei einer OLR in Höhe von etwa  $3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  untersucht.

Analysiert werden sollte die Diversität innerhalb der methanbildenden Archaea und der fermentativen Bakterien. Hierzu wurden im Rahmen anderer Projekte verschiedene PCR-Assays anhand von Literaturangaben etabliert und teilweise auch modifiziert (Tab. 1).

Die Primer-Kombination 69F/ARC934R erzeugt überwiegend Amplifikate der archaeellen 16S rRNA Gensequenz; die Primerkombination GM3F/1492r amplifiziert dagegen ausschließlich das bakterielle 16S rRNA Gen. Beide Primer-Kombinationen wurden bereits erfolgreich zur Analyse verschiedener Biogasfermenter eingesetzt.

Zur Analyse beider Gruppen, Archaea und Bacteria, ist die Primerkombination U341F/1490r geeignet [KLOCKE *et al.* 2007]. Mittels dieser Primer-Kombination ist es möglich anhand von nur einer einzigen 16S rDNA Klonbibliothek einen Überblick sowohl über die archaeelle wie auch die bakterielle Diversität zu erhalten. Allerdings kann eine Diskriminierung einzelner phylogenetischer Gruppen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die weitere Analyse der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte erfolgte wie bei KLOCKE *et al.* [2007] beschrieben in folgenden Schritten: (1) Klonierung mittels TA-Klonierung in einen handelsüblichen Vektor (z.B. pGEM-T, Fa. Promega) und Anlage einer 16S rRNA Genbibliothek, (2) Analyse einer Auswahl der klonierten Regionen mittels Fingerprint-Analyse (*amplified rDNA restriction*

analysis, Abk.: ARDRA, auch als PCR-RFLP bezeichnet), (3) Festlegung von taxonomischen Gruppen (*operational taxonomic units*, OTUs) auf Basis der ARDRA-Fingerprint-Muster, (4) Vergleich der OTUs mit bekannten Referenzorganismen, (5) Sequenzierung des 16S rRNA Gens für unbekannte OTUs, (6) bioinformatische Auswertung der 16S rRNA Nukleotidsequenzen via Abgleich mit NCBI-Einträgen (BLAST-Recherche) und phylogenetischer Einordnung der OTUs.

Tab. 1: Verwendete PCR-Primer zur Amplifikation des 16S rRNA Gens

| Zielorganismus           | Urspr. Name     | Interner Name                   | Primersequenz                                               | Referenz                                                              | Amplikon    |
|--------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Archaea</i>           | 69F<br>ARC934R  | Arche16S-Forw2<br>Univ16S -Rev5 | YGA YTA AGC CAT GCR AGT<br>TGC TCC CCC GCC AAT TCC T        | veränd. n. Fernandez et al. 1999<br>veränd. n. Giovannoni et al. 1990 | ca. 830 bp  |
| <i>Bacteria</i>          | 27f<br>1490r    | 16S-forw<br>16S-rev             | AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG<br>TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T | Lane 1991<br>veränd. n. Lane 1991                                     | ca. 1500 bp |
| <i>Archaea, Bacteria</i> | U341-F<br>1490r | U341-F<br>16S-rev               | CCT ACG GGR SGC AGC AG<br>TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T     | Hansen et al. 1998<br>veränd. n. Lane 1991                            | ca. 1150 bp |

Das Vorhaben gliederte sich in zwei Teile: In Teil A sollte eine Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften unter mesophilen (A-1) und thermophilen (A-2) Bedingungen erfolgen. In Teil B sollen anhand eines Belastungsversuches die Populationsdynamiken sowohl von Archaea wie auch der fermentativen Bacteria unter mesophilen (B-1) und thermophilen (B-2) Bedingungen untersucht werden. Eine Übersicht der zu bearbeitenden Proben findet sich in Tab. 2.

Tab. 2: Tabellarische Übersicht über die Vorarbeiten sowie über die durchgeführten Arbeiten. Mais und Futterrübe wurde in Form von Ganzpflanzensilage zugeführt. Für die Fermentation von Gülle wurde ausschließlich Rindergülle verwendet.

| Substrat        | Temperatur-regime             | Raumbelastung<br>[kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ] | Datum der Probennahme  | 16S rRNA Genbibliotheken bzw. PCR-Primer |                         |                                     |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
|                 |                               |                                                        |                        | 69F/ARC934R<br>(Archaea)                 | 27f/1492r<br>(Bacteria) | U341-F/1492r<br>(Archaea +Bacteria) |
| <b>A-1</b> Mais | mesophil (35°C)               | 2,1                                                    | 26. Woche (04.08.2004) | s. B-1                                   | s. B-1                  | 109 Klone                           |
|                 | Futterrübe mesophil (35°C)    | 2,0                                                    | 38. Woche (27.10.2004) | -                                        | -                       | 162 Klone*                          |
|                 | Rindergülle mesophil (35°C)   | 2,4                                                    | 28. Woche (07.07.2004) | -                                        | -                       | 116 Klone                           |
| <b>A-2</b> Mais | thermophil (55°C)             | 2,1                                                    | 38. Woche (02.11.2005) | s. B-2                                   | s. B-2                  | 158 Klone                           |
|                 | Futterrübe thermophil (55°C)  | 2,1                                                    | 38. Woche (02.11.2005) | -                                        | -                       | 148 Klone                           |
|                 | Rindergülle thermophil (55°C) | 1,9                                                    | 36. Woche (24.10.2005) | -                                        | -                       | 142 Klone                           |
| <b>B-1</b> Mais | mesophil (35°C)               | Start                                                  | 01. Woche (04.02.2004) | 144 Klone                                | 375 Klone               | -                                   |
|                 | mesophil (35°C)               | 2,0                                                    | 26. Woche (04.08.2004) | 119 Klone                                | 368 Klone               | s. A-1                              |
|                 | mesophil (35°C)               | 2,7                                                    | 34. Woche (29.09.2004) | 144 Klone                                | 393 Klone               | -                                   |
|                 | mesophil (35°C)               | 4,2 (übersäuert)                                       | 46. Woche (22.12.2004) | 142 Klone                                | 387 Klone               | -                                   |
| <b>B-2</b> Mais | thermophil (55°C)             | Start                                                  | 04. Woche (09.03.2005) | 149 Klone                                | 386 Klone               | -                                   |
|                 | thermophil (55°C)             | 2,2                                                    | 38. Woche (02.11.2005) | 104 Klone                                | 396 Klone               | s. A-2                              |
|                 | thermophil (55°C)             | 3,0                                                    | 44. Woche (14.12.2005) | 138 Klone                                | 391 Klone               | -                                   |
|                 | thermophil (55°C)             | 3,3 (übersäuert)                                       | 49. Woche (18.01.2006) | 142 Klone                                | 390 Klone               | -                                   |

\* Klocke et al. 2007

Im Rahmen von Teil A sollen 16S rRNA Genbibliotheken mithilfe der Primer-Kombination U341-F/1490r angelegt werden. Insgesamt sollen sechs Banken mit jeweils 100 - 150 Klonen angelegt und mittels ARDRA-Fingerprint-Analytik charakterisiert werden. Im Rahmen von eigenen Vorarbeiten wurden bereits drei Banken angelegt und mittels ARDRA-Fingerprint-Analytik analysiert. 60 individuelle ARDRA-Fingerprint-Muster wurden bereits sequenziert und veröffentlicht [KLOCKE et al. 2007].

Für Teil B soll mittels einer differenzierten Analysetechnik die Dynamik innerhalb der Populationen der methanbildenden Archaea und der lytischen bzw. fermentativen Bakterien während einer Übersäuerung bei Einsatz von Maissilage unter meso- und thermophilen Bedingungen erfasst werden. Hierzu sollen die zwei Gruppen jeweils separat mit getrennten 16S rRNA Genbibliotheken erfasst werden, um die Wahrscheinlichkeit der Diskriminierung einzelner Gruppen zu minimieren. Insgesamt sollen acht 16S rRNA Genbibliotheken für Archaea (Primerkombination 69F/ARC934) mit jeweils 100 - 150 Klonen angelegt werden. Hiervon wurde bereits eine Bank im Rahmen eigener Vorarbeiten angelegt und mittels ARDRA-Fingerprint-Analytik charakterisiert.

In weiteren acht 16S rDNA Klonbanken soll die Diversität der Bacteria (Primerkombination GM3F/1490r) erfasst werden. Aufgrund der zu erwartenden höheren Diversität innerhalb der Bacteria sollten diese Banken umfangreicher angelegt werden und jeweils 300 - 400 Klone umfassen. In Tab. 2 wird eine Übersicht über den Umfang der untersuchten Stichproben gegeben.

Der geplante Versuchsablauf wurde weitestgehend wie geplant umgesetzt. Aufgrund der sehr hohen Diversität innerhalb der Bacteria wurden in Versuchsteil B ausschließlich nur die wiederholt detektierten OTUs sequenziert.

Ergänzend zu der ursprünglich geplanten Versuchsmethodik wurde eine Abschätzung der relativen DNA-Gehalte für ausgewählte Gruppen von Mikroorganismen mittels quantitativer (realtime) PCR (Q-PCR) durchgeführt. Mit Hilfe der Q-PCR ist es möglich eine Detektion und Quantifizierung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften durchzuführen, ohne diese aus Umweltproben isolieren und kultivieren zu müssen. Basierend auf den Sequenzen für das 16S rRNA Gen wurden von Yu *et al.* [2005 a,b] verschiedene Assays zum gruppenspezifischen Nachweis verschiedener Archaea sowie für Bacteria insgesamt entwickelt. Diese Assays wurden im Rahmen eines von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V. geförderten Projektes (FNR 220011804) weiter optimiert und zur Analyse der methanogenen Archaea in verschiedenen Laborfermentern und in Biogasanlagen eingesetzt [NETTMANN *et al.* 2008].

Die Anwendung dieser Applikation bietet viele Vorteile wie z. B. eine exakte Spezifität der zu detektierenden, mikrobiellen, taxonomischen Einheiten; einen hohen Probendurchsatz in kurzer Zeit und eine Erfassung und Quantifizierung von nicht- bzw. schlecht kultivierbaren Mikroorganismen in der Reaktorprobe. Ergänzend zur ARDRA-Analyse einhergehend mit dem Anlegen von 16S rRNA Genbibliotheken bietet die Q-PCR die Möglichkeit, genaue Aussagen zur quantitativen Verteilung von taxonomischen Mikroorganismengruppierungen innerhalb der Reaktorprobe zu treffen.

## I.2 Stand der Technik

Die Arbeiten beruhen auf der Analyse von CSTR-Anlagen im Labormaßstab.

Zur Analyse dieser Anlagen werden ausschließlich Verfahren genutzt bzw. weiterentwickelt, welche für die öffentlich-finanzierte Forschung freigegeben sind. Schutzrechte Dritter werden durch die im Rahmen dieses Projektes umgesetzten Arbeiten nicht berührt.

Eine Übersicht über relevante Fachliteratur findet sich in folgenden Artikeln:

- 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. Env. Microbiol.* 76:2540-2548. (74 Literaturstellen)

- BERGMANN, I.; NETTMANN, E.; MUNDT, K.; KLOCKE, M. (2010): Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Can. J. Microbiol.* 56:440-444. (21 Literaturstellen)
- BLUME, F.; BERGMANN, I.; NETTMANN, E.; SCHELLE, H.; REHDE, G.; MUNDT, K.; KLOCKE, M. (2010): Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04682.x. (51 Literaturstellen)
- BERGMANN, I.; MUNDT, K.; SONTAG, M.; BAUMSTARK, I.; NETTMANN, E.; KLOCKE, M. (2010): Influence of DNA isolation on Q-PCR based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:78-84. (28 Literaturstellen)
- NETTMANN, E.; BERGMANN, I.; MUNDT, K.; LINKE, B.; KLOCKE, M. (2008): Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.* 105:1835-1850. (74 Literaturstellen)
- KLOCKE, M.; NETTMANN, E.; BERGMANN, I.; MUNDT, K.; SOUIDI, K.; MUMME, J.; LINKE, B. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Sys. Appl. Microbiol.* 31:190-205. (62 Literaturstellen)

Bezüglich der einzelnen Fachgebiete relevante Fachliteratur wird im Folgenden aufgeführt. Weitere Literaturhinweise finden sich im Sachzusammenhang im Zuge der Ergebnisdarstellung.

#### *16S rRNA Genbibliotheken & ARDRA*

- DASSARMA, S.; FLEISCHMANN, E. F. (1995): Halophiles. *In: DASSARMA, S.; FLEISCHMANN, E. F. (Hrsg.): Archaea: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1995, pp. 269-272.
- DELONG, E. F. (1992): Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5685-5689.
- FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LIU, H. (2002): Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:112-118.
- FERNANDEZ, A.; HUANG, S. Y.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. (1999): How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3697-3704.
- GIOVANNONI, S. J.; BRITSCHGI, T. B.; MOYER, C. L.; FIELD, K. G. (1990): Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.

#### *Quantitative PCR (Q-PCR) auf Basis des 16S rRNA Gens*

- YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. (2005): Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Technol.* 52:85-91.
- 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.
- NETTMANN, E.; BERGMANN, I.; MUNDT, K.; LINKE, B.; KLOCKE, M. (2008): Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 105:1835-1850.

- BERGMANN, I.; MUNDT, K.; SONTAG, M.; BAUMSTARK, I.; NETTMANN, E.; KLOCKE, M. (2010): Influence of DNA isolation on Q-PCR based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. Syst. Appl. Microbiol., im Druck.

#### *Statistische Auswertung*

- GOOD, I. J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika 40:237-264.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. (1957). An ordination of the upland forest of southern Wisconsin. Ecol. Monogr. 27:325-349.
- CHAO, A. (1987). Estimation the population size for capture-recapture data with unequal catchability. Biometrics 43:783-791.
- HOLLAND, S. M. (2003) Analytic rarefaction 1.3 software (<http://www.uga.edu/~strata/software/>).
- CHAO, A.; CHAZDON, R. L.; COLWELL, R. K.; SHEN, T. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. Ecol. Lett. 8:148-159.

Folgende Informations- und Dokumentationsdienste wurden genutzt:

#### *Literaturdatenbanken*

- ISI Web of Knowledge (URL: <http://isiwebofknowledge.com/>)
- PubMed der U.S. National Library of Medicine (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>)
- Digitaler Katalog der Universitätsbibliothek Potsdam (URL: <http://info.ub.uni-potsdam.de>)
- Elektronische Zeitschriftenbibliothek der Universitätsbibliothek Regensburg (URL: <http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/hilfe.phtml?bibid=UBPO&colors=7&lang=de>)

#### *Informations- und Dokumentationsdienste*

- GenBank und ergänzende Dienste des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Ribosomal database project (<http://rdp.cme.msu.edu/>)

### **I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Im Rahmen dieses Projektes erfolgte in einzelnen Teilaspekten ein informeller Austausch mit folgenden Stellen:

- Biogas-Crops-Network (gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung)  
Koordination: Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin

## II.1 Erzielte Ergebnisse

### Versuchsteil A - Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose bei Monofermentation unterschiedlicher Substrate

#### Mesophiler Ansatz

Der Langzeitversuch zur Biomethanisierung von nachwachsenden Rohstoffen bei veränderter Raumbelastung erfolgte im Rahmen des Projektes "Kinetik der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen bei kontinuierlicher Prozessführung als Grundlage für die Bemessung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen" gefördert durch die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR 22011402). Eine detaillierte Darstellung der Versuche sowie der Ergebnisse erfolgte bereits im Rahmen des Abschlussberichtes zu diesem Vorhaben [vgl. MÄHNERT 2008]. Aus der Flüssigphase dieser Fermentationen wurden alle zwei Wochen Proben entnommen. Das Probenmaterial wurde unmittelbar nach der Entnahme schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Auswahl der zu bearbeitenden Proben orientierte sich an der Raumbelastung sowie an den jeweiligen Biogasausbeuten. Mit zunehmender Raumbelastung nimmt die Biogasausbeute gemäß einer hyperbolischen Funktion in Abhängigkeit von der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ab [LINKE & MÄHNERT 2005]. Die Biogasrate als Produkt aus Raumbelastung und Biogasausbeute nimmt jedoch zu, bis ein kritischer Grenzwert erreicht ist. Ab dieser substrat- und prozessabhängigen kritischen Raumbelastung kommt es zu einer Übersäuerung des Prozesses. Sowohl die Biogasausbeute wie auch die Biogasrate nimmt in starkem Maße ab, bis es zum Erliegen der Biogasproduktion kommt. Bei den vorliegenden Versuchen ist dieser Grenzwert bei der thermophilen Vergärung von Rübensilage bereits bei einer Raumbelastung in Höhe von ca.  $2,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  erreicht. Um Fermentationen mit hoher Biogasrate aber ohne Übersäuerungseffekte vergleichend untersuchen zu können, wurden Proben aus der Fermentation bei einer Raumbelastung von ca. 2,0 bis max.  $2,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  bearbeitet. Die Darstellung wichtiger Kenngrößen für die mesophilen Fermentationen erfolgt in Tab. 3, der Verlauf der Fermentation wird in Abb. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Kenngrößen der mesophilen Fermentation. Die Werte sind gemittelt über die letzten sechs Wochen vor der Probennahme zu Versuchsteil A-1. Im Falle der Beprobung der Fermentation von Rindergülle liegen aus technischen Gründen keine Messwerte vor, stattdessen wurden die Werte für die auf die Probennahme folgende Woche aufgeführt. Zum Vergleich sind Messwerte für die Fermentation von Roggen-GPS beigegefügt. oTS= organische Trockensubstanz, GPS= Ganzpflanzensilage.

| Substrat            | Raum-<br>belastung<br>[ $\text{kg}_{\text{OTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ] | Biogas-<br>ausbeute<br>[ $\text{m}^3 \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ ] | Methan-<br>ausbeute<br>[ $\text{m}^3 \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ ] | Relativer<br>Methananteil<br>im Biogas | pH                    | Gehalt an<br>$\text{NH}_4$ -Stickstoff<br>[ $\text{g l}^{-1}$ ] | Gehalt an<br>org. Säuren<br>[ $\text{g l}^{-1}$ ] |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Mais (GPS)</b>   | $2,10 \pm 0,14$<br>7%                                                            | $0,77 \pm 0,04$<br>5%                                                | $0,42 \pm 0,03$<br>7%                                                | $55\% \pm 0\%$<br>0%                   | $8,01 \pm 0,07$<br>1% | $2,19 \pm 0,04$<br>2%                                           | $2,24 \pm 0,39$<br>17%                            |
| <b>Rübe (GPS)</b>   | $2,01 \pm 0,23$<br>11%                                                           | $0,89 \pm 0,04$<br>5%                                                | $0,48 \pm 0,02$<br>4%                                                | $55\% \pm 1\%$<br>2%                   | $7,73 \pm 0,16$<br>2% | $0,57 \pm 0,15$<br>26%                                          | $1,68 \pm 0,57$<br>34%                            |
| <b>Gülle (Rind)</b> | 2,37*                                                                            | 0,34*                                                                | 0,20*                                                                | 60%*                                   | 8,00*                 | 2,24*                                                           | 2,55*                                             |
| <b>Roggen (GPS)</b> | $2,05 \pm 0,06$<br>3%                                                            | $0,75 \pm 0,01$<br>1%                                                | $0,43 \pm 0,01$<br>2%                                                | $58\% \pm 1\%$<br>2%                   | $8,14 \pm 0,16$<br>2% | $3,12 \pm 0,15$<br>5%                                           | $3,29 \pm 0,47$<br>14%                            |

Gemittelt über die letzten 6 Wochen vor der Probennahme

\* Meßwert Woche 22 (Probennahme Woche 21)

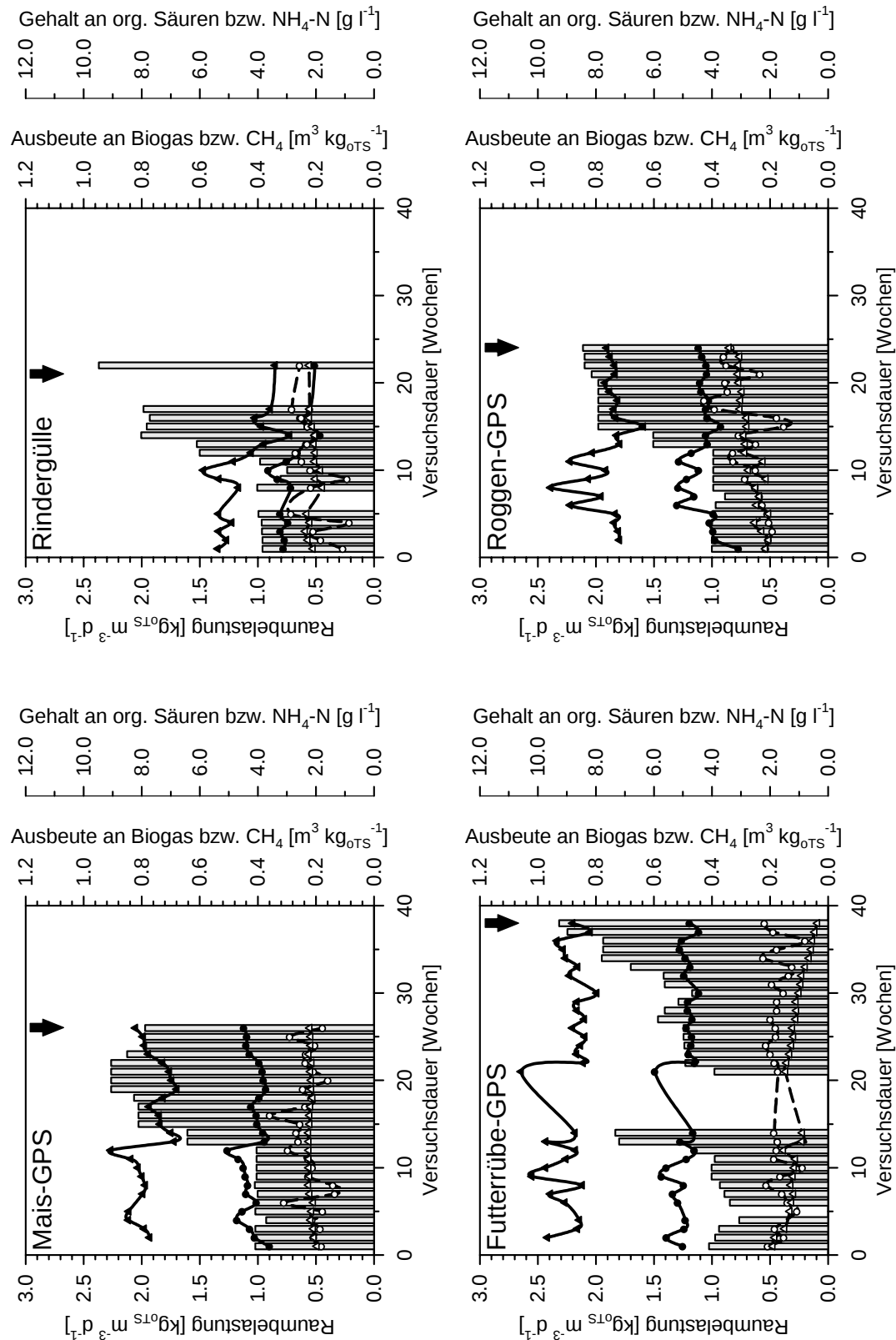


Abb. 3: Entwicklung der mesophilen Biogasfermentation bis zum Zeitpunkt der Probennahme (Pfeil) für Versuchsteil A-1. Dargestellt ist die Raumbelastung (Balken), die jeweilige Ausbeute an Biogas (—▲—) und Methan (—●—) sowie die Gehalte an organischen Säuren (- - O - -) und Ammoniumstickstoff (- -△- -). Zum Vergleich werden zusätzlich die Werte für eine mesophile Fermentation von Roggen-GPS aufgeführt. GPS= Ganzpflanzensilage, oTS= organische Trockensubstanz,  $\text{CH}_4$ = Methan.

Die Raumbelastung lag im Zeitraum der sechs Wochen vor der Probennahme für Versuchsteil A-1 zwischen 2,01 und 2,37 kg<sub>oTS</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Die Biogasausbeute betrug zwischen 0,34 und 0,89 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub>, wobei die höchsten Biogasausbeuten mit Futterrüben-GPS als Substrat erzielt wurden. Der Anteil an Methan im Biogas lag relativ konstant bei 55 - 60%. Im Falle der Fermentation von Rindergülle wurde erwartungsgemäß nur eine etwa halb so hohe Ausbeute an Biogas und Methan erzielt wie bei der Fermentation von Silagen.

Der pH war vor der Probennahme mit Werten zwischen 7,73 und 8,01 für alle Fermentationen relativ stabil. Bezogen auf den Gehalt an organischen Säuren (erhoben als Summenparameter) konnten jedoch verhältnismäßig große Schwankungen beobachtet werden (Standardabweichung zwischen 17% und 34% des Mittelwertes). Die Stickstoffgehalte (NH<sub>4</sub>-N) lagen im Verlauf der Fermentationen zwischen 0,57 und 2,24 g l<sup>-1</sup> und wiesen damit keine erhöhten Werte auf. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass aus technischen Gründen keine Prozessparameter für den Zeitraum der Beprobung der Fermentation von Rindergülle vorliegen (Zeitpunkt der Probennahme und drei Wochen zuvor). Die Messwerte aus der auf der Probennahme folgenden Woche zeigen allerdings einen normalen Verlauf der Fermentation an.

Insgesamt bewegten sich alle Kenngrößen in den erwarteten Größenordnungen, so dass der Verlauf aller Fermentationen vor der Probennahme für Versuchsteil A-1 als normal zu bezeichnen ist.

### *Thermophiler Ansatz*

Im Falle der thermophilen Biogasfermentationen wurden zur Probennahme ebenfalls Reaktorzustände bei einer Raumbelastung zwischen 2,0 und 2,5 kg<sub>oTS</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> ausgewählt (Tab. 4). Die Biogasausbeute lag mit Werten zwischen 0,40 und 0,84 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub> in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei den mesophilen Fermentationen. Das Biogas wies wie bei den mesophilen Fermentationen Methananteile zwischen 56% und 59% auf. Die Methanausbeuten fielen somit ähnlich hoch wie bei den mesophilen Fermentationen aus. Wie unter mesophilen Temperaturregime auch, wurden die höchsten Biogas- und Methanausbeuten bei Verwendung von Futterrüben als Substrat erzielt, während Güllefermentationen lediglich halb so hohe Ausbeuten erzielten.

Tab. 4: Kenngrößen der thermophilen Fermentation. Die Werte sind gemittelt über die letzten sechs Wochen vor der Probennahme zu Versuchsteil A-2. oTS= organische Trockensubstanz, GPS= Ganzpflanzensilage.

| Substrat            | Raum-<br>belastung<br>[kg <sub>oTS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ] | Biogas-<br>ausbeute<br>[m <sup>3</sup> kg <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> ] | Methan-<br>ausbeute<br>[m <sup>3</sup> kg <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> ] | Relativer<br>Methananteil<br>im Biogas | pH                | Gehalt an<br>NH <sub>4</sub> -Stickstoff<br>[g l <sup>-1</sup> ] | Gehalt an<br>org. Säuren<br>[g l <sup>-1</sup> ] |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Mais</b> (GPS)   | 2,13 ± 0,07<br>3%                                                          | 0,70 ± 0,04<br>6%                                                        | 0,39 ± 0,03<br>8%                                                        | 56% ± 1%<br>2%                         | 8,38 ± 0,05<br>1% | 2,55 ± 0,25<br>10%                                               | 5,88 ± 1,12<br>19%                               |
| <b>Rübe</b> (GPS)   | 2,13 ± 0,11<br>5%                                                          | 0,84 ± 0,06<br>7%                                                        | 0,47 ± 0,03<br>6%                                                        | 56% ± 1%<br>2%                         | 7,84 ± 0,31<br>4% | 1,82 ± 0,13<br>7%                                                | 10,93 ± 1,89<br>17%                              |
| <b>Gülle</b> (Rind) | 1,94 ± 0,16<br>8%                                                          | 0,40 ± 0,02<br>5%                                                        | 0,23 ± 0,04<br>17%                                                       | 59% ± 8%<br>14%                        | 8,32 ± 0,10<br>1% | 1,70 ± 0,20<br>1%                                                | 2,62 ± 0,38<br>15%                               |

Gemittelt über die letzten 6 Wochen vor der Probennahme

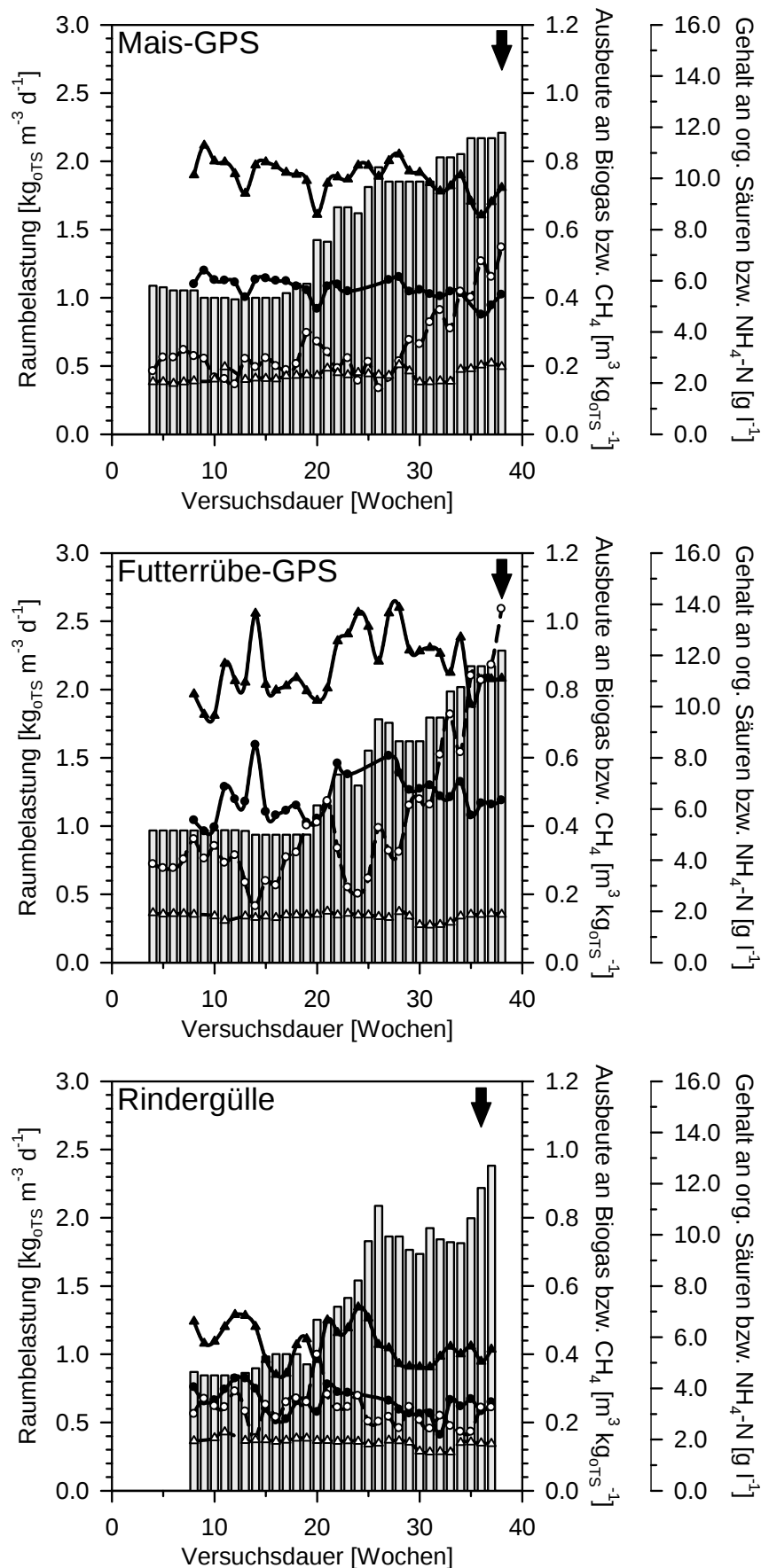


Abb. 4: Entwicklung der thermophilen Biogasfermentation bis zum Zeitpunkt der Probennahme (Pfeil) für Versuchsteil A-2. Dargestellt ist die Raumbelastung (Balken), die jeweilige Ausbeute an Biogas ( $\text{—}\blacktriangle\text{—}$ ) und Methan ( $\text{—}\bullet\text{—}$ ) sowie die Gehalte an organischen Säuren ( $\text{--}\circ\text{--}$ ) und Ammoniumstickstoff ( $\text{--}\triangle\text{--}$ ).

Die Gehalte an  $\text{NH}_4$ -Stickstoff waren mit Werten zwischen 1,70 und 2,55 g l<sup>-1</sup> in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei den mesophilen Fermentationen. Der pH lag mit Werten zwischen 7,84 und 8,38 eher im alkalischen Bereich verglichen mit den mesophilen Fermentationen. Allerdings waren die Messwerte für den pH im Zeitraum von sechs Wochen vor der Probennahme relativ konstant (Standartabweichung  $\pm$  max. 4%). Die höchste Variation im pH wies die Fermentation von Futterrüben auf bedingt durch die Zunahme an organischen Säuren, in erster Linie von Essigsäure, während der letzten zehn Wochen vor der Probennahme (Abb. 4). Zum Zeitpunkt der Probennahme wurde ein Gehalt an organischen Säuren von 13,81 g l<sup>-1</sup> gemessen, was etwa dem Achtfachen der Konzentration unter mesophilen Bedingungen entspricht. Ähnlich verhielt es sich im Falle der thermophilen Fermentation von Maissilage, wo der Gehalt an organischen Säuren zum Zeitpunkt der Probennahme bei 7,30 g l<sup>-1</sup> und damit deutlich über den Werten der entsprechenden mesophilen Fermentation lag. Lediglich die thermophile Fermentation von Rindergülle wies mit einer Säurekonzentration von im Mittel 2,62 g l<sup>-1</sup> ähnliche Werte wie die mesophilen Fermentationen auf.

### *Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft*

Die Ermittlung der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft erfolgte kulturunabhängig auf Basis der Nukleotidsequenz für das 16S rRNA Gen (16S rDNA). Hierzu wurde aus einer Probe aus den jeweiligen Biogasfermentationen die gesamte mikrobielle DNA extrahiert und dann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines Universal-Primerpaares (s. Tab. 1) das 16S rDNA Gen selektiv vermehrt. Durch die Verwendung von Universal-Primern sollte zugleich sowohl das 16S rDNA Gen für fermentative Bacteria also für methanbildende Archaea vermehrt werden [Klocke et al. 2007]. Durch Klonierung der aus der PCR erhaltenen Genfragmente wurde für jede Biogasreaktorprobe eine 16S rRNA Genbibliothek erzeugt. Die in der Genbibliothek enthaltenen Nukleotidsequenzen wurden zuerst mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse (PCR-RFLP, in der Literatur auch als *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA) bezeichnet) in Gruppen unterteilt. Jede Gruppe von Nukleotidsequenzen mit gleichem Restriktionsfragmentmuster wurde als eine taxonomische Einheit (*operational taxonomic unit*, OTU) gewertet.

Je Fermentation wurden zwischen 109 und 162 Klone bzw. Nukleotidsequenzen untersucht (Tab. 5). Mittels PCR-RFLP konnten zwischen 44 und 69 OTUs ermittelt werden. Die Abdeckung (berechnet nach Good) der Klonauswahl zur Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken beträgt zwischen 70 und 86%. Hieraus folgt, dass die Auswahl genügend groß war um die häufigsten taxonomischen Gruppen (OTUs) zu detektieren. Allerdings wurde eine relativ große Anzahl der OTUs nur anhand eines einzigen Klons in der Genbibliothek detektiert (Tab. 5, „Singulets“). Bei diesen OTUs besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sie in den Reaktoren nur gelegentlich bzw. in geringer Individuenzahl auftreten.

Die größte bakterielle Diversität wurde für die mesophile Fermentation von Futterrüben ermittelt ( $H = 3,818$ ). Grundsätzlich weisen die thermophilen Fermentationen geringere Werte für den Diversitätsindex auf als die Fermentationen unter mesophilem Temperaturregime. Dieses deutet auf eine grundsätzlich artenärmere Mikroflora unter thermophilen Bedingungen hin. Anzeichen auf einen Einfluss des Substrates auf die mikrobielle Diversität gibt es hingegen nicht.

Im Vergleich der mesophilen und der thermophilen Fermentationen ließen sich nur ausnahmsweise gemeinsame OTUs feststellen. Für alle taxonomischen Gruppen waren deutliche Unterschiede in den Nukleotidsequenzen der nachgewiesenen OTUs aus mesophilem und thermophilem Probenmaterial feststellbar. Ursächlich hierfür ist vor allem die Heterogenität der mesophilen Mikroflo-

ra wie aus den paarweisen Gleichheits- bzw. Similaritätsindices (*similarity index*, SI) ersichtlich (Tab. 6).

Tab. 5: Tabellarische Übersicht über die im Rahmen von Versuchsteil A entwickelten 16S rDNA Klonbibliotheken. Nicht auswertbare OTUs bzw. Sequenzen (z.B. chimerische Sequenzen, andere als 16S rDNA Sequenzen) wurden von der Analyse ausgeschlossen und sind nicht mit aufgeführt. Der Diversitätsindex wurde auf Basis der Häufigkeiten für bakterielle OTUs berechnet.

| Substrat                               | Mesophile Fermentation<br>(Versuchsteil A-1) |                  |                  |                   | Thermophile Fermentation<br>(Versuchsteil A-2) |                  |                  |                   |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
|                                        | Mais                                         | Rübe             | Gülle            | Gesamt            | Mais                                           | Rübe             | Gülle            | Gesamt            |
| <b>Klone mittels ARDRA analysiert</b>  | <b>109</b>                                   | <b>162</b>       | <b>116</b>       | <b>384</b>        | <b>158</b>                                     | <b>148</b>       | <b>142</b>       | <b>448</b>        |
| davon ausgefallen                      | 0                                            | 0                | 3                | 3                 | 5                                              | 6                | 4                | 15                |
| davon Bacteria                         | 109                                          | 153              | 113              | 375               | 153                                            | 142              | 137              | 432               |
| davon Archaea                          | 0                                            | 9                | 0                | 9                 | 0                                              | 0                | 1                | 1                 |
| <b>Detektierte OTU (ARDRA-Muster)</b>  | <b>44 (100%)</b>                             | <b>69 (100%)</b> | <b>57 (100%)</b> | <b>142 (100%)</b> | <b>53 (100%)</b>                               | <b>47 (100%)</b> | <b>60 (100%)</b> | <b>128 (100%)</b> |
| davon OTU mit 1 Klon (Singulets)       | 18 (41%)                                     | 43 (62%)         | 34 (60%)         | 79 (56%)          | 29 (55%)                                       | 26 (55%)         | 35 (58%)         | 61 (48%)          |
| davon Bacteria                         | 44 (100%)                                    | 63 (91%)         | 57 (100%)        | 136 (96%)         | 53 (100%)                                      | 47 (100%)        | 59 (98%)         | 127 (99%)         |
| davon Archaea                          | ND                                           | 6 (9%)           | ND               | 6 (4%)            | ND                                             | ND               | 1 (2%)           | 1 (1%)            |
| <b>Abdeckung (Coverage) n. Good *</b>  | 83%                                          | 73%              | 70%              | 79%               | 81%                                            | 82%              | 75%              | 86%               |
| <b>Diversitätsindex (H) n. Shannon</b> | 3.542                                        | 3.818            | 3.737            | NA                | 3.358                                          | 3.361            | 3.563            | NA                |
| <b>Evenness</b>                        | 0.785                                        | 0.660            | 0.737            | NA                | 0.542                                          | 0.613            | 0.588            | NA                |

\* [1 - (Singulets / alle Klone)]

Zur Berechnung von paarweisen SI-Werten sind in der Literatur eine Reihe verschiedener Algorithmen beschrieben; in dieser Studie wurde der Algorithmus nach JACCARD ohne und mit Korrektur nach CHAO verwendet [CHAO *et al.* 2005]. Durch die Einführung eines Korrektur-Algorithmus durch CHAO erfolgt die Berechnung des paarweisen SI unter Berücksichtigung einer Abschätzung der von der Stichprobe nicht erfassten OTUs. Somit ergeben sich für den korrigierten SI nach JACCARD automatisch höhere Werte als für den „klassischen“ JACCARD-SI. Für beide Ansätze gilt jedoch, dass eine 100%ige Übereinstimmung in der Diversität einen Wert von 1,0 ergibt, das Fehlen von Gemeinsamkeiten an einem SI von 0,0 erkennbar ist.

Im paarweisen Vergleich der mesophilen Fermentationen fielen die Werte für den paarweisen SI vergleichsweise gering aus (Tab. 6A). Der „klassische“ Jaccard-SI variierte zwischen 0,081 und 0,110, der CHAO-korrigierte JACCARD-SI zwischen 0,149 und 0,248. Keine einzige OTU konnte gleichzeitig in allen drei untersuchten mesophilen Fermentationen nachgewiesen werden. Dementsprechend verändert sich der Wert für den paarweisen SI kaum, wenn zur Berechnung ausschließlich die mehrfach detektierten OTUs verwendet werden (Tab. 6B).

Bei der Betrachtung der thermophilen Fermentationen treten dagegen deutlichere Gemeinsamkeiten auf (Tab. 7). Insbesondere im Vergleich der thermophilen Mono-Fermentation von Silagen (Mais- und Fütterrüben-Ganzpflanzensilage) ergab der CHAO-korrigierte JACCARD-SI mit Werten von 0,608 (alle OTUs) bzw. 0,742 (nur wiederholt detektierte OTUs) deutlich größere Übereinstimmungen. Insgesamt konnten 17 OTUs identisch für beide Fermentationen ermittelt werden. In der Genbibliothek für die Mais-Fermentation wurden diese 17 OTUs bei 54% aller untersuchten Klone detektiert, in der Klonbibliothek entwickelt aus einer Probe der Futterrüben-Fermentation konnten 61% der untersuchten Klone einer dieser 17 OTUs zugeordnet werden. Auffällig ist, dass sich die bakterielle Lebensgemeinschaft in der Gülle-Fermentation zu den Biozösen in Silage-Fermentationen unterscheidet. Die Werte für den CHAO-korrigierten JACCARD liegen zwischen 0,255 und 0,406 für den paarweisen Vergleich von thermophilen Gülle- und Silage-Fermentationen (Tab. 7).

Auf einen Vergleich mesophiler und thermophiler Fermentationen wurde verzichtet, da keine gemeinsamen OTUs detektiert werden konnten.

Tab. 6: Vergleich der bakteriellen Diversitäten für die mesophile Mono-Fermentation von Mais, Futterrübe und Rindergülle auf Basis der OTU-Häufigkeit. Dargestellt sind die Werte für den paarweisen Vergleich mittels Similaritätsindex (SI) nach JACCARD ohne und mit Korrektur nach CHAO [CHAO *et al.* 2005]. (A) Die Berechnung der SI erfolgte auf Basis aller OTUs, (B) Grundlage der Berechnung der SI waren ausschließlich wiederholt detektierte OTUs.

| (A)                                     |       |       |       |               | (B)                                     |       |       |       |               |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| Substrat                                | Mais  | Rübe  | Gülle | SI n. Jaccard | Substrat                                | Mais  | Rübe  | Gülle | SI n. Jaccard |
| Mais                                    | -     | 0.092 | 0.110 |               | Mais                                    | -     | 0.173 | 0.208 |               |
| Rübe                                    | 0.179 | -     | 0.081 |               | Rübe                                    | 0.226 | -     | 0.173 |               |
| Gülle                                   | 0.248 | 0.149 | -     |               | Gülle                                   | 0.329 | 0.202 | -     |               |
| SI nach Jaccard mit Korrektur nach Chao |       |       |       |               | SI nach Jaccard mit Korrektur nach Chao |       |       |       |               |

Tab. 7: Vergleich der bakteriellen Diversitäten für die thermophile Mono-Fermentation von Mais, Futterrübe und Gülle auf Basis der OTU-Häufigkeit. Dargestellt sind die Werte für den paarweisen Vergleich mittels Similaritätsindex (SI) nach JACCARD ohne und mit Korrektur nach CHAO [CHAO *et al.* 2005]. (A) Die Berechnung der SI erfolgte auf Basis aller OTUs, (B) Grundlage der Berechnung der SI waren ausschließlich wiederholt detektierte OTUs.

| (A)                                     |       |       |       |               | (B)                                     |       |       |       |               |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| Substrat                                | Mais  | Rübe  | Gülle | SI n. Jaccard | Substrat                                | Mais  | Rübe  | Gülle | SI n. Jaccard |
| Mais                                    | -     | 0.205 | 0.087 |               | Mais                                    | -     | 0.340 | 0.155 |               |
| Rübe                                    | 0.608 | -     | 0.128 |               | Rübe                                    | 0.742 | -     | 0.231 |               |
| Gülle                                   | 0.255 | 0.330 | -     |               | Gülle                                   | 0.314 | 0.406 | -     |               |
| SI nach Jaccard mit Korrektur nach Chao |       |       |       |               | SI nach Jaccard mit Korrektur nach Chao |       |       |       |               |

Aus den sechs Klonbibliotheken für das mikrobielle 16S rRNA Gen wurden die Nukleotidsequenzen für 142 „mesophile“ und 128 „thermophile“ OTUs ermittelt. Alle Sequenzen wurden mittels des Software-Paketes ARB [LUDWIG *et al.* 2004] taxonomisch in Relation zu bekannten Typenstämmen gesetzt. Hierfür wurden folgende Algorithmen angewandt: (1) Ermittlung der evolutionären Distanzen mit der Kimura-2-Parameter-Methode [KIMURA 1980], Konstruktion des Stammbaumes nach der Neighbor-Joining-Methode [SAITOU & NEI 1987], Bootstrap-Test mit 100 Wiederholungen [FELSENSTEIN 1985]; (2) Konstruktion des Stammbaumes nach der Maximum-Parsimony-Methode [ECK & DAYHOFF 1966]. Die ermittelten Stammbäume sind im Anhang dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine Einordnung der 16S rDNA Sequenzen über die RDP-Datenbank [COLE *et al.* 2009].

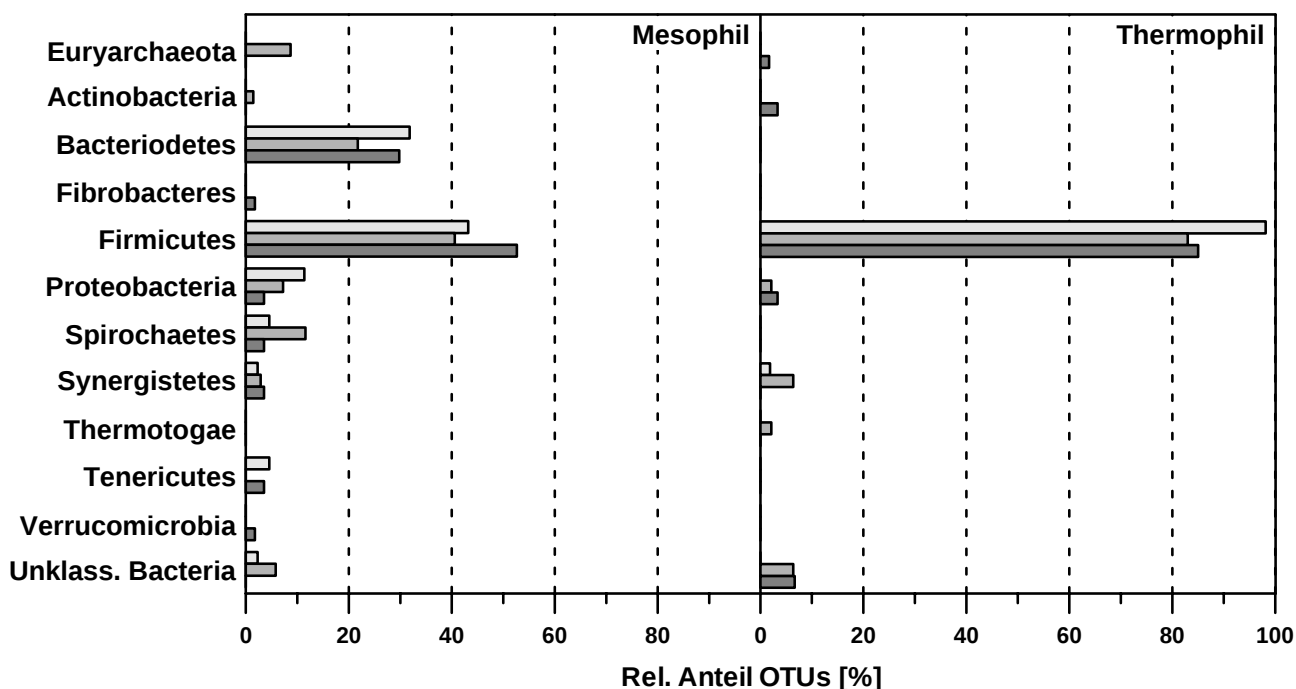


Abb. 5: Mikrobielle Diversität im Verlauf einer semikontinuierlichen Biogasfermentation bei mesophiler und thermophiler Mono-Fermentation unterschiedlicher Substrate. Der Nachweis individueller taxonomischer Einheiten (OTUs) erfolgte auf Basis der Nukleotidsequenz für das 16S rRNA Gen bzw. des entsprechenden PCR-RFLP-Musters. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an OTUs für den jeweiligen Stamm bezogen auf alle OTUs, welche in der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek beobachtet wurden. OTUs, welche nicht eindeutig einem Stamm zugeordnet werden konnten, werden als „Unklassifizierbare Bacteria“ abgebildet. Die Balkentönung repräsentiert das Substrat der Mono-Fermentation (hellgrau= Mais-Ganzpflanzensilage, grau= Futtermühen-Ganzpflanzensilage, dunkelgrau= Rindergülle).

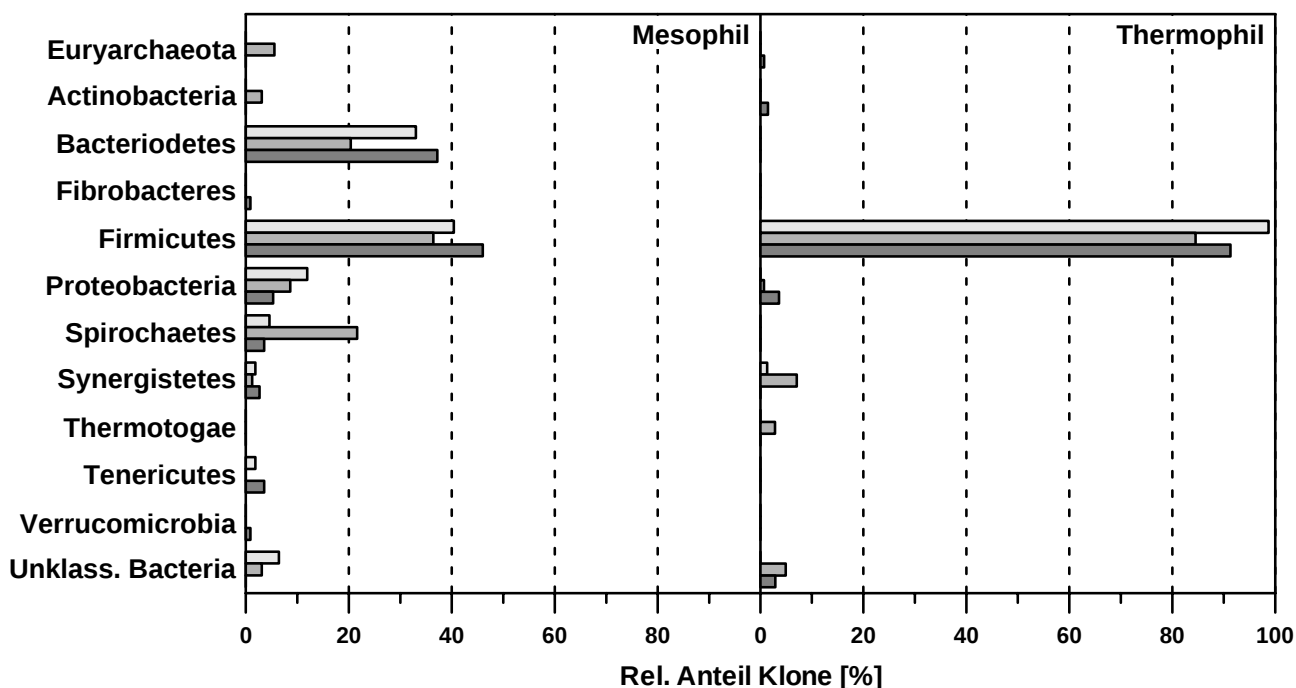


Abb. 6: Häufigkeit des Nachweises von OTUs in 16S rDNA Klonbibliotheken entwickelt aus Probenmaterial von mesophilen und thermophilen Mono-Fermentationen unterschiedlicher Substrate. Der Nachweis individueller taxonomischer Einheiten (OTUs) erfolgte auf Basis der Nukleotidsequenz für das 16S rRNA Gen bzw. des entsprechenden PCR-RFLP-Musters. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an OTUs für den jeweiligen Stamm bezogen auf alle OTUs, welche in der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek beobachtet wurden. OTUs, welche nicht eindeutig einem Stamm zugeordnet werden konnten, werden als „Unklassifizierbare Bacteria“ abgebildet. Die Balkentönung repräsentiert das Substrat der Mono-Fermentation (hellgrau= Mais-Ganzpflanzensilage, grau= Futtermühen-Ganzpflanzensilage, dunkelgrau= Rindergülle).

Ungeachtet der geringen Gemeinsamkeiten auf Ebene der OTUs lassen sich in den mesophilen Fermentationen Übereinstimmungen auf Ebene größerer taxonomischer Einheiten feststellen (Abb. 5 und 6). Ein Großteil der mikrobiellen Biozönose wurde durch Vertreter der Firmicutes, ausnahmslos aus der Klasse der Clostridia, gestellt. Zwischen 43% und 53% der detektierten OTUs konnten dieser Gruppe zugeordnet werden. In den 16S rRNA Genbibliotheken zählten zwischen 36% und 46% der untersuchten Klone zu den Firmicutes. Ebenfalls häufig in allen mesophilen Fermentationen wurden Vertreter der Bacteroidetes, vorrangig aus der Klasse Bacteroidia aber auch aus der Klasse Sphingobacteria nachgewiesen. Der Klasse Bacteroidia konnten jeweils zwischen 22% und 27% der detektierten OTUs zugeordnet werden, welche wiederum bei 20% bis 35% der Klone nachgewiesen wurden. Weiterhin wurden verschiedene Vertreter der Stämme Proteobacteria (Delta- und Gammaproteobacteria) sowie der Spirochaetes gefunden.

In den thermophilen Fermentationen bestand die bakterielle Lebensgemeinschaft überwiegend aus Vertretern der Firmicutes. 72% bis 87% der OTUs konnten der Klasse Clostridia zugeordnet werden, weitere OTUs wurden für die Klasse Bacilli detektiert. In den Klonbibliotheken wurden Clostridia-OTUs bei 82% bis 94% der untersuchten Klone nachgewiesen. Im Unterschied zu den mesophilen Fermentationen wurden in den thermophilen Fermentationen keine Vertreter der Bacteroidetes detektiert.

Vertreter der Klasse Clostridia werden in der Literatur häufig als vorrangige Fermentierer von Biomasse angesehen. Diese Annahme konnte durch diese Studie bestätigt werden. Allerdings liefert diese Studie zugleich einen Hinweis darauf, dass die Clostridia in Biogasfermentationen wesentlich artenreicher sind als bislang angenommen. Ebenso scheint es zu der Ansiedlung unterschiedlicher Arten von Clostridia je nach Substrat und Temperatur zu kommen. Die Analyse der Nukleotidsequenzen legt weiterhin die Vermutung nahe, dass die Mehrzahl dieser Clostridia bislang nicht kultiviert oder taxonomisch klassifiziert wurde.

Interessant ist zudem, dass unter mesophilen Bedingungen eine Ansiedlung von alternativen Biomasse-Abbauern wie Bacteroidia kommt. Bacteroidia sind in natürlichen anaeroben bis aeroben Habitaten wie z.B. Seesedimenten am Abbau von Biomasse beteiligt. In der Literatur selten belegt ist die Anwesenheit für strikt anaerobe Habitate wie Biogasfermentationen. Über die metabolische Aktivität dieser Mikroorganismen und deren eventuelle Konkurrenz zu den Clostridia kann daher nur spekuliert werden.

Im Vergleich zu der publizierten Vorstudie [KLOCKE *et al.* 2007] treten bezüglich der taxonomischen Zuordnung der Nukleotidsequenzen bzw. in der Definition von OTUs punktuelle Unterschiede auf. Die Gründe hierfür sind wie folgt: (1) Neubewertung der PCR-RFLP Muster, (2) Verfügbarkeit weiterer Referenz-Sequenzen, (3) Fortschritte in der Taxonomie, (4) umfangreichere phylogenetische Analysen u.a. auf Basis der ARB-Software. Es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren der Erkenntnisfortschritt in der bakteriellen Taxonomie eine Neubewertung der ermittelten Nukleotidsequenzen erforderlich macht.

Methanogene Archaea konnten entgegen der Ergebnisse aus der Vorstudie und der grundsätzlichen Erwartung bei Verwendung „universeller“ PCR-Primer nur vereinzelt detektiert werden. Für die mesophile Fermentation von Futterrüben-Ganzpflanzensilage wurden OTUs für Methanbildner verwandt mit *Methanosarcina* und *Methanosaeta* sowie für einen taxonomisch noch nicht klassifizierten Euryarchaeota nachgewiesen (Abb. 7). Dieses spricht für eine eher acetiklastische Methanogenenflora. Sowohl für die mesophile Fermentation von Maissilage bzw. von Rindergülle konnten keine OTUs für Methanbildner nachgewiesen werden. In den 16S rDNA Bibliotheken für die thermophilen Fermentationen konnte nur in einem einzigen Fall eine Nukleotidsequenz eines Vertreters der methanogenen Euryarchaeota detektiert werden. Diese OTU wies eine hohe Verwandt-

schaft zu *Methanothermobacter thermoautotrophicus* auf, einem thermophilen hydrogenotrophen Methanbildner.

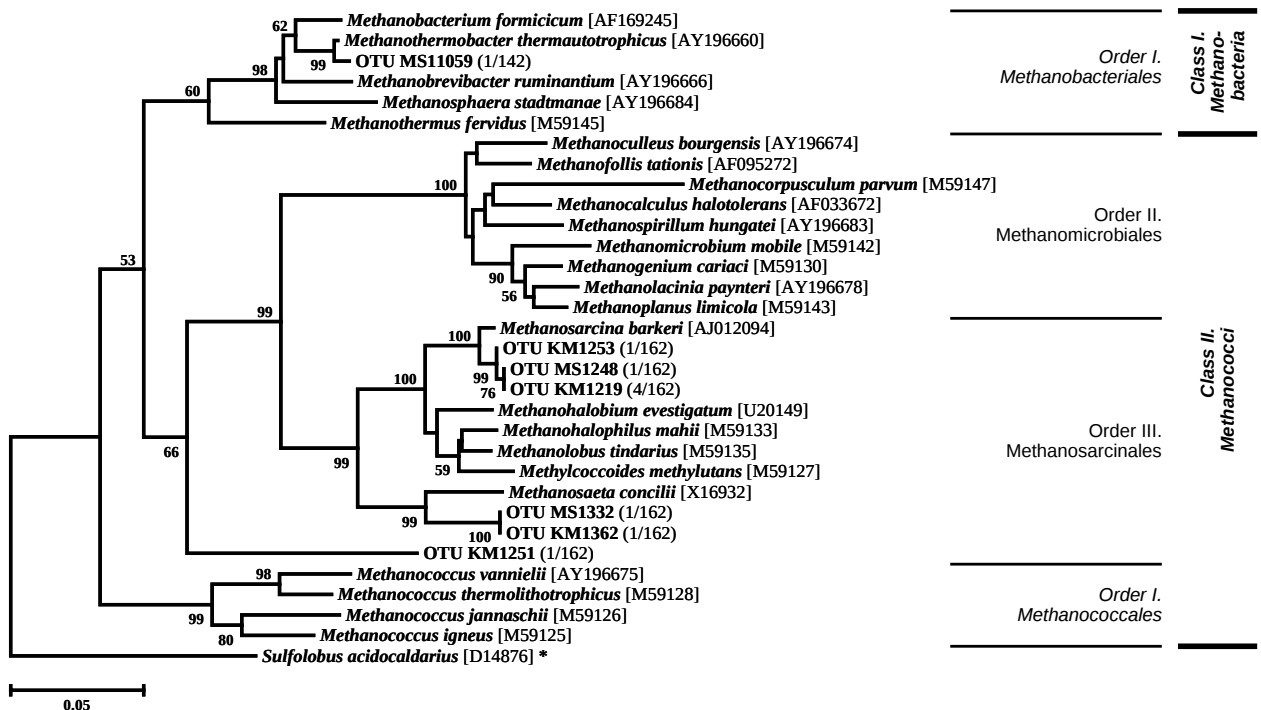


Abb. 7: Phylogenetischer Baum für die methanogenen Euryarchaeota detektiert in den mesophilen und thermophilen Mono-Fermentationen von Mais, Futterrüben und Rindergülle. Der Baum wurde mit der Neighbor-Joining Methode [SAITOU & NEI 1987] mit 1000x Bootstrap-Resampling [FELSENSTEIN 1985] in dem Softwarepaket MEGA berechnet [TAMURA *et al.* 2007]. Zahlen an den Knoten repräsentieren die prozentualen Bootstrap-Werte, auf die Darstellung von Werten kleiner als 50% wurde verzichtet. Der Größenmaßstab repräsentiert 5% evolutionäre Distanz berechnet nach der Kimura-2-Parameter Methode [Kimura 1980] auf Ebene eines ca. 420 bp großen Abschnitts des 16S rRNA Gens. In eckigen Klammern werden die Akzessionsnummern der NCBI-Genbank gegeben. Im Rahmen dieser Studie identifizierte Organismen sind mit OTU (*operational taxonomic unit*) gekennzeichnet. In runden Klammern ist die Häufigkeit des Nachweises in der jeweiligen Klonbibliothek vermerkt (Klone für die jeweilige OTU / alle untersuchten Klone).

Aus dem Befund, dass sich Methanogene mit dem gewählten Ansatz nicht zwingend detektieren lassen, ergibt sich für weitere Experimente folgende Empfehlung: (1) Analyse größerer Klonzahlen um die gegenüber den fermentativen Bacteria geringeren Zelldichten methanogener Archaea auszugleichen, (2) getrennte Analyse methanogener Archaea und fermentativer Bacteria durch die Entwicklung spezifischer 16S rRNA Genbibliotheken unter Verwendung spezifischer PCR-Primer. Beide Aspekte wurden bei der Durchführung von Versuchsteil B berücksichtigt.

Die relative Häufigkeit bestimmter Gruppen methanogener Archaea bzw. das Mengenverhältnis zwischen Archaea und Bacteria kann mittels quantitativer *realtime* PCR (Q-PCR) abgeschätzt werden. Hierzu wurden gruppenspezifische Primer und Taqman-Sonden (5'-Nuklease-Assay) aus der Literatur verwendet [Yu *et al.* 2005], das Reaktionsprotokoll und die Datenauswertung wurde entsprechend KLOCKE *et al.* [2008] bzw. NETTMANN *et al.* [2008] durchgeführt. Die versuchstechnischen Parameter werden in Tab. 8 aufgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt.

Tab. 8: Parameter der quantitativen realtime PCR zum Nachweis methanogener Archaea. NA= Nicht untersucht.

| Q-PCR Assay        | Slope | Intercept | R <sup>2</sup><br>(Standardkurve) | PCR-Effizienz | Threshold |
|--------------------|-------|-----------|-----------------------------------|---------------|-----------|
| Bacteria           | -3.30 | 40.51     | 0.96                              | 101%          | 0.05      |
| Archaea            | NA    | NA        | NA                                | NA            | NA        |
| Methanobacteriales | -3.84 | 45.11     | 0.96                              | 82%           | 0.05      |
| Methanomicrobiales | -3.60 | 53.20     | 0.96                              | 90%           | 0.05      |
| Methanosarcinaceae | -3.52 | 40.56     | 0.99                              | 92%           | 0.05      |
| Methanosaetaceae   | -3.76 | 44.16     | 0.97                              | 84%           | 0.05      |

Die Kopienzahl für das bakterielle 16S rRNA Gen in einem Nanogramm mikrobieller DNA isoliert aus den Biogasfermentationen wurde im Mittel mit  $1,2 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$  für die mesophilen Fermentationen und mit  $1,7 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$  für die thermophilen Fermentationen bestimmt. Im Falle der mesophilen Fermentation von Futterrüben wurden für das bakterielle 16S rRNA Gen  $0,4 \times 10^6 \pm 0,0 \times 10^6$  Kopien  $\text{ng}^{-1}$  ermittelt. Bei Verwendung von Maissilage fiel der entsprechende Wert etwa fünfmal höher aus ( $2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ ). Dieses kann als Indiz für eine höhere Bakteriendichte in der Maisfermentation gewertet werden. Für die Fementation von Rindergülle konnte aus technischen Gründen kein Wert erhoben werden.

Für methanogene Archaea wurden in der mesophilen Fermentation  $1,9 \times 10^4$  Kopien für das 16S rRNA Gen je Nanogramm mikrobieller DNA nachgewiesen. In thermophilen Fermentationen wurden für das 16S rRNA Gen von methanogenen Archaea Kopienzahlen von  $4,0 \times 10^4$  Kopien je Nanogramm DNA bestimmt. Umgerechnet auf Zelldichten je ml Fermentationsflüssigkeit bedeutet dieses, dass methanogene Archaea mit Anteilen zwischen 1% und 13% an der mikrobiellen Population beteiligt sind. Dieses stimmt mit den Zelldichten ermittelt aus mikroskopischen Analysen überein. Die höchsten relativen Anteile methanogener Archaea wurden für die mesophile Fermentation von Futterrüben (11%) sowie für die thermophile Fermentation von Rindergülle (13%) ermittelt.

Mittels der verwendeten Q-PCR-Assays wurden die hauptsächlichen Gruppen methanogener Archaea (Ordnungen Methanobacteriales und Methanomicrobiales, für die Ordnung Methanosarcinales die Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae) nachgewiesen. Erhöhte Anteile acetiklastischer Methanbildner wurden nur für die mesophile Fermentation von Futterrüben gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis der Analyse von 16S rRNA Genbibliotheken. Insbesondere für die thermophilen Fermentationen weisen die Q-PCR Ergebnisse auf eine nahezu überwiegend aus Methanobacteriales bestehende Archaea-Population hin. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Analyse der 16S rRNA Genbibliotheken. Neben diesen Methanbildnern wurden mittels der Q-PCR Analyse ebenfalls mit höheren Kopienzahlen die 16S rDNA von Methanomicrobiales nachgewiesen. Entsprechende Sequenzen konnten nicht in der Analyse der Genbibliotheken gefunden werden.

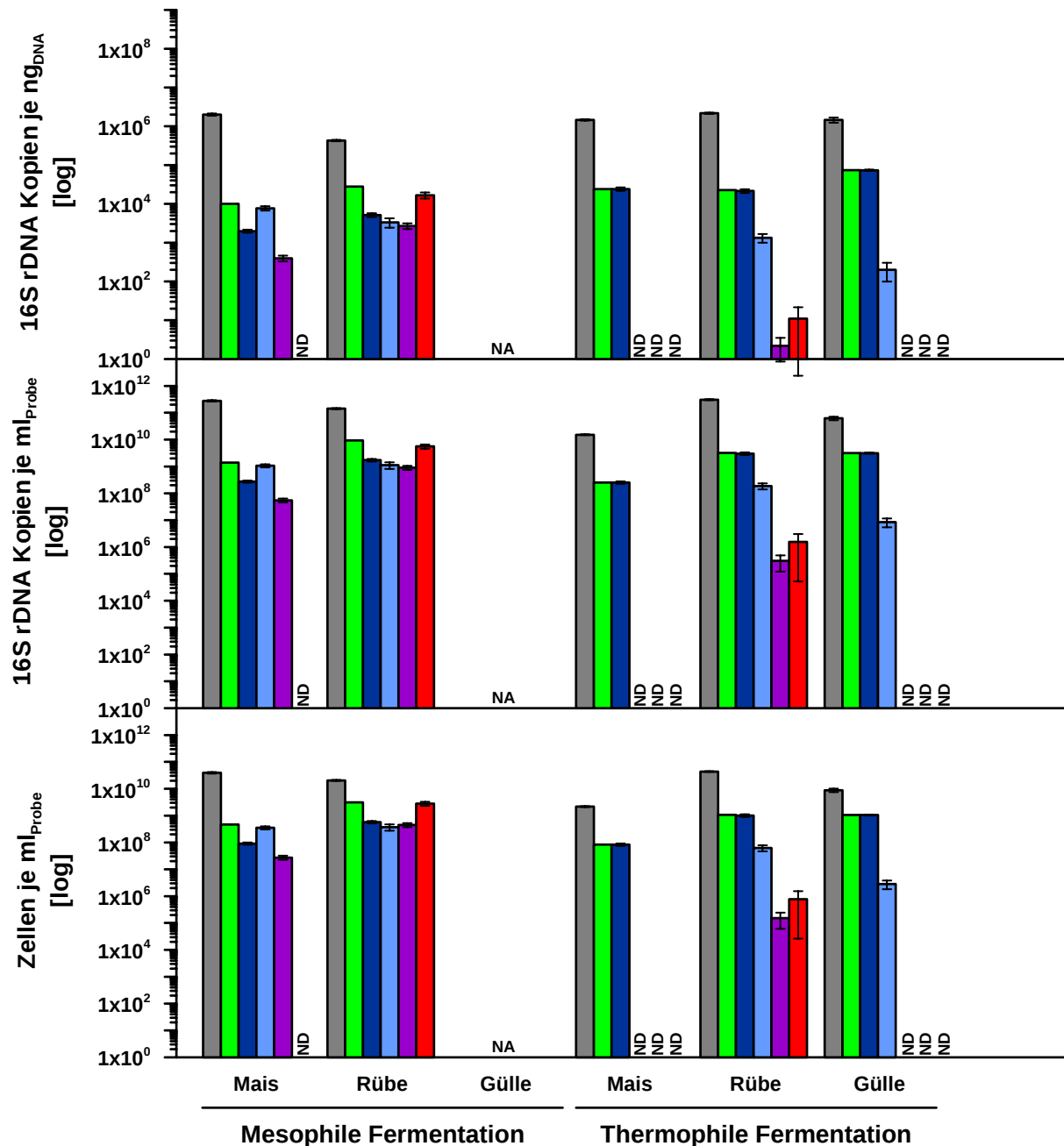


Abb. 8: Quantifizierung der Bacteria und Archaea in semi-kontinuierlichen Biogasfermentationen auf Basis der Bestimmung der Kopienzahl für das 16S rRNA Gen (16S rDNA) mittels quantitativer *realtime* PCR (5'-Nuklease-Assay, Abk. Q-PCR) unter Verwendung von 1 ng mikrobieller DNA als Template. Hierzu wurden gruppenspezifische Primer und Sonden nach Yu *et al.* [2005] verwendet, die Versuchsdurchführung und Datenauswertung erfolgte entsprechend KLOCKE *et al.* [2008] bzw. NETTMANN *et al.* [2008]. Mit Ausnahme des Wertes für Archaea ist immer der Mittelwert dreier Q-PCRs dargestellt, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Als Kopienzahl für Archaea wurde die Summe der gemittelten Werte für Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae angegeben. Alle Q-PCRs erfolgten in einem Messdurchgang, sind also direkt miteinander vergleichbar. Weitere Parameter zur statistischen Beurteilung werden in Tab. 8 gegeben.

(Oben) 16S rDNA Kopien je Nanogramm mikrobieller DNA, (Mitte) 16S rDNA Kopien je ml Reaktorflüssigkeit, (Unten) Berechnete Zellzahl je ml Reaktorflüssigkeit unter der Annahme, dass im Mittel 3 Genkopien je archaellem Genom und 7 Genkopien je bakteriellem Genom vorliegen.

Grau: Bacteria (BAC-Set), Grün: Archaea (= Summe MBT-Set, MMB-Set, MSC-Set, MST-Set), Dunkelblau: Methanobacteriales (MBT-Set), Hellblau: Methanomicrobiales (MMB-Set), Violett: Methanosarcinaceae (MSC-Set), Rot: Methanosaetaceae (MST-Set). NA= Nicht untersucht, ND= Nicht nachgewiesen.

## Versuchsteil B - Mikrobielle Diversität bei gesteigerter Raumbelastung

Der Einfluss einer steigenden Raumbelastung auf die Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Biogasfermenter sollte am Beispiel der Monovergärung von Maissilage untersucht werden. Hierzu wurden 16S rDNA Klonbibliotheken getrennt für methanogene Archaea (Primerpaar 69f / ARC934r) und fermentative Bacteria (Primerpaar 27f / 1492r, *nearly full length* Sequenzen) sowohl für eine mesophile als auch eine thermophile Vergärung zu vier verschiedenen Belastungsstufen (Startphase, OLR ca.  $2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , OLR ca.  $3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , Übersäuerung) konstruiert.

### Mesophiler Ansatz

Der Versuch zur semikontinuierlichen Fermentation von Maisganzpflanzensilage unter mesophilen Bedingungen erfolgte über 46 Wochen. Die Entwicklung der Fermentation ist in Abb. 9 und 10 wiedergegeben.

Bei einer mittleren Raumbelastung von 2 bis  $3 \text{ kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  wurden Biogasausbeuten zwischen 0,6 und  $0,8 \text{ m}^3 \text{ kg}_{\text{oTS}}^{-1}$  mit einem Methananteil von ca. 55% erzielt (Tab. 9). Der pH lag relativ konstant bei Werten zwischen 7,8 bis 8,1. Erhöhte Werte konnten weder für den Gehalt an organischen Säuren noch für den Gehalt an  $\text{NH}_4$ -Stickstoff beobachtet werden. Durch eine sukzessive Belastungssteigerung bis hin zu Raumbelastungen über  $4 \text{ kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  kam es ab Versuchswoche 37 zu einem Anstieg in dem Gehalt an organischen Säuren und sekundär ab Woche 43 zu einem raschen Abfall der Biogas- und Methanausbeute. Insbesondere die Konzentration an Propionsäure und in etwas geringerem Umfang auch an Essigsäure und Valeriansäure stieg während der letzten Versuchswochen stark an (Abb. 11). Andere Karbonsäuren wie Buttersäure, Iso-Buttersäure, Iso-Valeriansäure und Capronsäure nahmen in ihrer Konzentration ebenfalls zu, die jeweiligen Gehalte machten jedoch nur einen Bruchteil der Gehalte der erstgenannten Säuren aus (Abb. 12).

Die Probennahme erfolgte zu den ursprünglich geplanten Zeitpunkten. Die über drei Wochen vor der Probennahme gemittelten Werte für die wichtigsten Prozessparameter sind in Tab. 9 aufgeführt. Die zum Zeitpunkt der Probennahme vorliegenden Werte können Abb. 9 bis 12 entnommen werden.

Tab. 9: Kenngrößen der mesophilen Fermentation. Die Werte sind gemittelt über die letzten drei Wochen vor der Probennahme zu Versuchsteil B-1. oTS= organische Trockensubstanz, GPS= Ganzpflanzensilage. A= Startphase (04.02.2004), B= OLR ca.  $2 \text{ kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (04.08.2004), C= OLR ca.  $3 \text{ kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (29.09.2004), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (22.12.2004).

| Probe | Raum-<br>belastung<br>[ $\text{kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ] | Biogas-<br>ausbeute<br>[ $\text{m}^3 \text{ kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ ] | Methan-<br>ausbeute<br>[ $\text{m}^3 \text{ kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ ] | Relativer<br>Methananteil<br>im Biogas | pH                     | Gehalt an<br>$\text{NH}_4$ -Stickstoff<br>[ $\text{g l}^{-1}$ ] | Gehalt an<br>org. Säuren<br>[ $\text{g l}^{-1}$ ] |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| A     | Start                                                                            |                                                                      |                                                                      |                                        |                        |                                                                 |                                                   |
| B     | $1,98 \pm 0,01$<br>0%                                                            | $0,80 \pm 0,02$<br>2%                                                | $0,44 \pm 0,01$<br>1%                                                | $55\% \pm 1\%$<br>1%                   | $7,98 \pm 0,07$<br>1%  | $2,19 \pm 0,02$<br>1%                                           | $2,23 \pm 0,59$<br>26%                            |
| C     | $2,69 \pm 0,24$<br>9%                                                            | $0,67 \pm 0,03$<br>4%                                                | $0,37 \pm 0,02$<br>5%                                                | $55\% \pm 1\%$<br>1%                   | $7,85 \pm 0,04$<br>1%  | $2,39 \pm 0,05$<br>2%                                           | $2,35 \pm 0,27$<br>12%                            |
| D     | $4,22 \pm 0,10$<br>2%                                                            | $0,22 \pm 0,15$<br>69%                                               | $0,07 \pm 0,09$<br>120%                                              | $26\% \pm 21\%$<br>83%                 | $6,10 \pm 0,72$<br>12% | $2,27 \pm 0,19$<br>8%                                           | $17,07 \pm 4,41$<br>26%                           |

Gemittelt über die letzten 3 Wochen vor der Probennahme

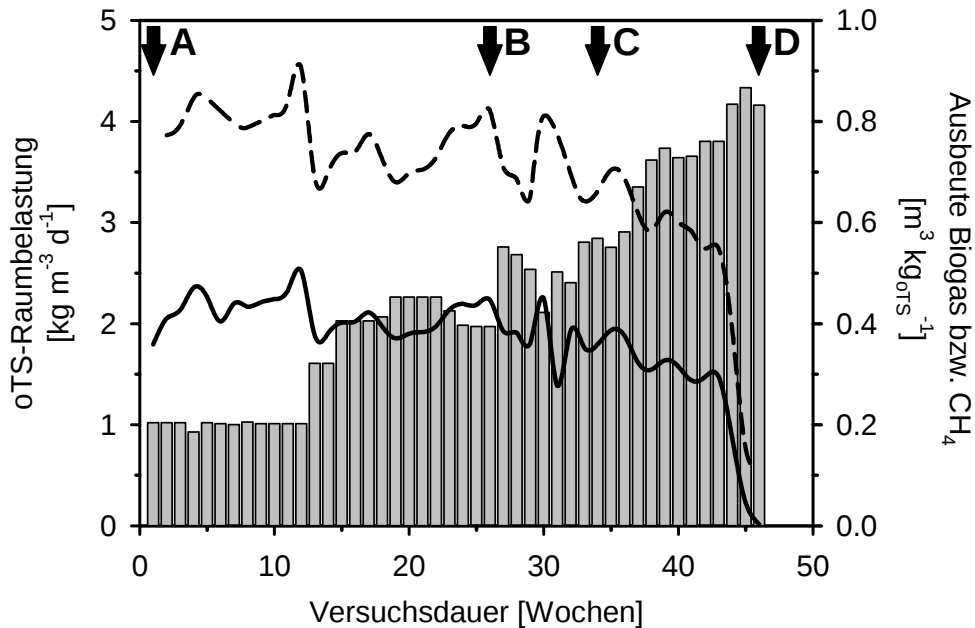


Abb. 9: Raumbelastung (Balken) und Ausbeute an Biogas (- - -) bzw. Methan (—) während der semi-kontinuierlichen Fermentation von Mais-Ganzpflanzensilage unter mesophilen Bedingungen. Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-1 sind durch Pfeile markiert. A= Startphase (04.02.2004), B= OLR ca. 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (04.08.2004), C= OLR ca. 3 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (29.09.2004), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (22.12.2004).

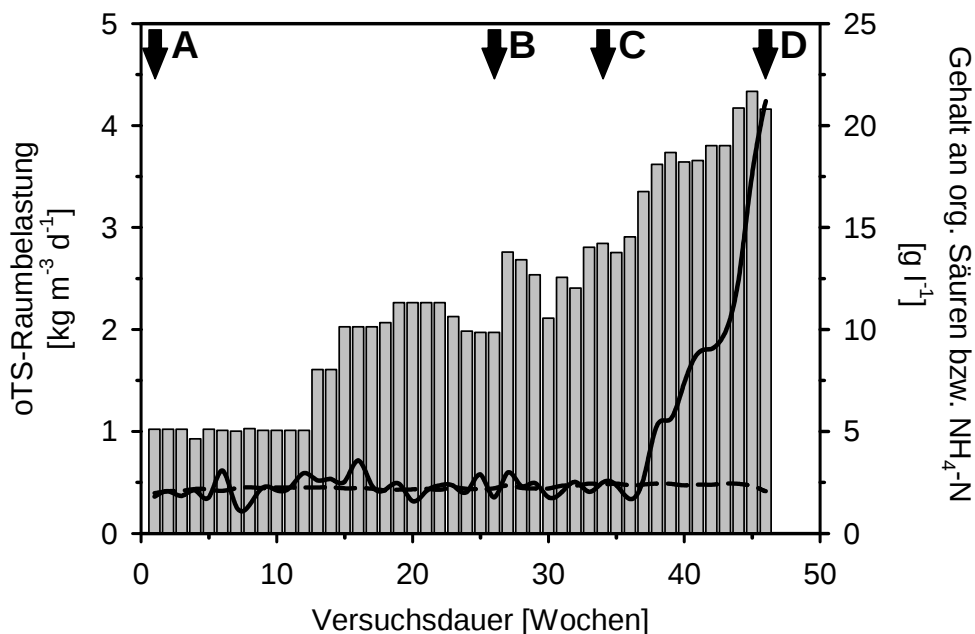


Abb. 10: Raumbelastung (Balken) und Gehalt an Ammonium-Stickstoff (- - -) bzw. organischen Säuren (—) während der semi-kontinuierlichen Fermentation von Mais-Ganzpflanzensilage unter mesophilen Bedingungen. Der pH lag bis Woche 41 bei  $7,91 \pm 0,11$  (Minimum: 7,61; Maximum: 8,13). Ab Woche 41 verringert sich der pH, bis er in Woche 46 einen Wert von 5,58 erreicht.

Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-1 sind durch Pfeile markiert. A= Startphase (04.02.2004), B= OLR ca. 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (04.08.2004), C= OLR ca. 3 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (29.09.2004), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (22.12.2004).

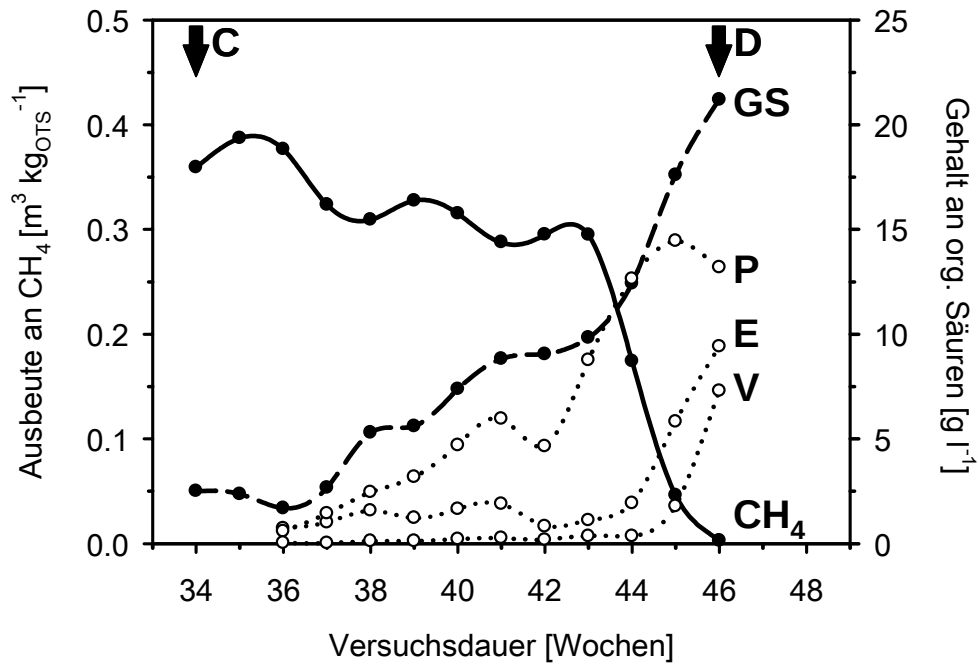


Abb. 11: Entwicklung der Gehalte an organischen Säuren im Verlauf der Übersäuerung der mesophilen Fermentation (Woche 34 bis 46) hervorgerufen durch eine gesteigerte Raumbelastung mit Maissilage (vgl. Abb. 10). Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-1 (C und D) sind durch Pfeile markiert. Dargestellt ist der Gehalt aller organischer Säuren (GS, ermittelt als Summenparameter ohne Differenzierung zwischen den einzelnen Säuren), der Gehalt an Essigsäure (E), Propionsäure (P) und Valeriansäure (V) sowie die Methanausbeute ( $\text{CH}_4$ ).

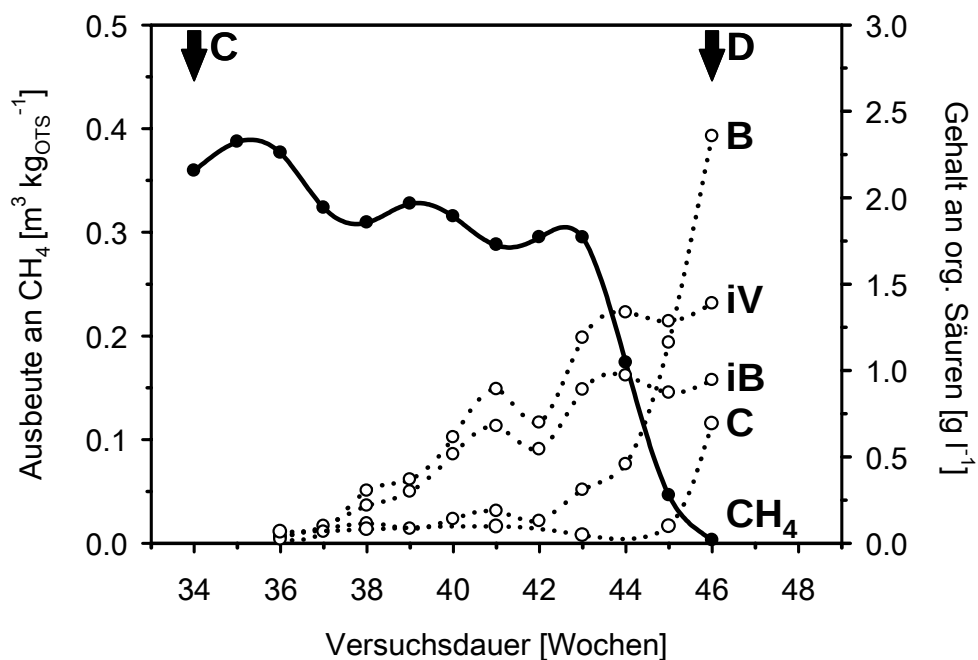


Abb. 12: Entwicklung der Gehalte von Buttersäure (B), Iso-Buttersäure (iB), Iso-Valeriansäure (iV) und Capronsäure (C) sowie die Methanausbeute ( $\text{CH}_4$ ) im Verlauf der Übersäuerung der mesophilen Fermentation (Woche 34 bis 46) hervorgerufen durch eine gesteigerte Raumbelastung mit Maissilage (vgl. Abb. 10). Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-1 (C und D) sind durch Pfeile markiert. Der Gehalt an Ethanol und Propanol betrug nach der letzten Versuchswoche 1,26 bzw. 0,29 g  $\text{l}^{-1}$ .

### Thermophiler Ansatz

Der Versuch zur semikontinuierlichen Fermentation von Maisganzpflanzensilage unter thermophilen Bedingungen erfolgte über 51 Wochen. Die Entwicklung der Fermentation ist in Abb.13 und 14 wiedergegeben.

Verglichen mit der Fermentation unter mesophilem Temperaturregime konnten ähnlich hohe Ausbeuten an Biogas und Methan erzielt werden (Tab. 10). Bei einer mittleren Raumbelastung von 2 bis 3 kg<sub>oTS</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> betrugen die Biogasausbeuten zwischen 0,6 und 0,8 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup> mit einem Methananteil von ca. 56%. Unter thermophilen Bedingungen war der pH leicht in den alkalischen Bereich verschoben, die Werte für den pH bewegten sich meist zwischen 8,1 und 8,4. Bei einer mittleren Raumbelastung wurden NH<sub>4</sub>-Stickstoff-Gehalte zwischen 2,3 und 2,8 g l<sup>-1</sup> beobachtet.

Deutlich erhöht gegenüber der mesophilen Fermentation war der Gehalt an organischen Säuren. Die Gesamtkonzentration betrug zwischen 4,1 und 8,6 g l<sup>-1</sup> und damit bis zum vierfachen der Konzentration an organischen Säuren unter mesophilen Bedingungen. Im Unterschied zu der mesophilen Fermentation unterlag die Säurekonzentration allerdings geringeren Schwankungen.

Im Zuge der sukzessiven Steigerung der Raumbelastung kam es ab Versuchswoche 27 zu einem Anstieg in dem Gehalt an organischen Säuren und sekundär ab Woche 41 zu einem raschen Abfall der Biogas- und Methanausbeute (Abb. 13 und 14). Im Unterschied zu der mesophilen Fermentation traten sowohl der Anstieg in der Säurekonzentration als auch der Abfall in der Methanausbeute bei geringeren Raumbelastungen auf. Die Raumbelastung in Versuchswoche 27 betrug 1,85 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup> (vergleichbarer Status bei der mesophilen Fermentation bei 3,35 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup>) in Versuchswoche 41 3,02 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup> (vergleichbarer Status bei der mesophilen Fermentation bei 4,34 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup>).

Wie unter mesophilem Temperaturregime stieg insbesondere der Gehalt an Propionsäure an. Der Gehalt an Essigsäure betrug ca. ein Drittel des Gehaltes an Propionsäure, alle weiteren Karbonsäuren waren mit Konzentrationen unterhalb von 1 g l<sup>-1</sup> vertreten (Abb. 15 und 16).

Die Probennahme erfolgte zu den ursprünglich geplanten Zeitpunkten. Die über drei Wochen vor der Probennahme gemittelten Werte für die wichtigsten Prozessparameter sind in Tab. 10 aufgeführt. Die zum Zeitpunkt der Probennahme vorliegenden Werte können Abb. 13 bis 16 entnommen werden.

Tab. 10: Kenngrößen der thermophilen Fermentation. Die Werte sind gemittelt über die letzten drei Wochen vor der Probennahme zu Versuchsteil B-2. A= Startphase (09.03.2005), B= OLR ca. 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (02.11.2005), C= OLR ca. 3 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (14.12.2005), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (18.01.2005).

| Probe | Raum-<br>belastung<br>[kg <sub>oTS</sub> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ] | Biogas-<br>ausbeute<br>[m <sup>3</sup> kg <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> ] | Methan-<br>ausbeute<br>[m <sup>3</sup> kg <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> ] | Relativer<br>Methananteil<br>im Biogas | pH                | Gehalt an<br>NH <sub>4</sub> -Stickstoff<br>[g l <sup>-1</sup> ] | Gehalt an<br>org. Säuren<br>[g l <sup>-1</sup> ] |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| A     |                                                                            |                                                                          |                                                                          | Start                                  |                   |                                                                  |                                                  |
| B     | 2,18 ± 0,02<br>1%                                                          | 0,68 ± 0,04<br>6%                                                        | 0,38 ± 0,03<br>8%                                                        | 56% ± 1%<br>2%                         | 8,39 ± 0,06<br>1% | 2,71 ± 0,07<br>3%                                                | 6,74 ± 0,58<br>9%                                |
| C     | 3,02 ± 0,00<br>0%                                                          | 0,75 ± 0,03<br>4%                                                        | ND                                                                       | NA                                     | 8,16 ± 0,08<br>1% | 2,47 ± 0,16<br>6%                                                | 7,05 ± 0,46<br>7%                                |
| D     | 3,34 ± 0,14<br>4%                                                          | 0,61 ± 0,06<br>11%                                                       | ND                                                                       | NA                                     | 7,88 ± 0,21<br>3% | 2,85 ± 0,09<br>3%                                                | 9,93 ± 1,69<br>17%                               |

Gemittelt über die letzten 3 Wochen vor der Probennahme

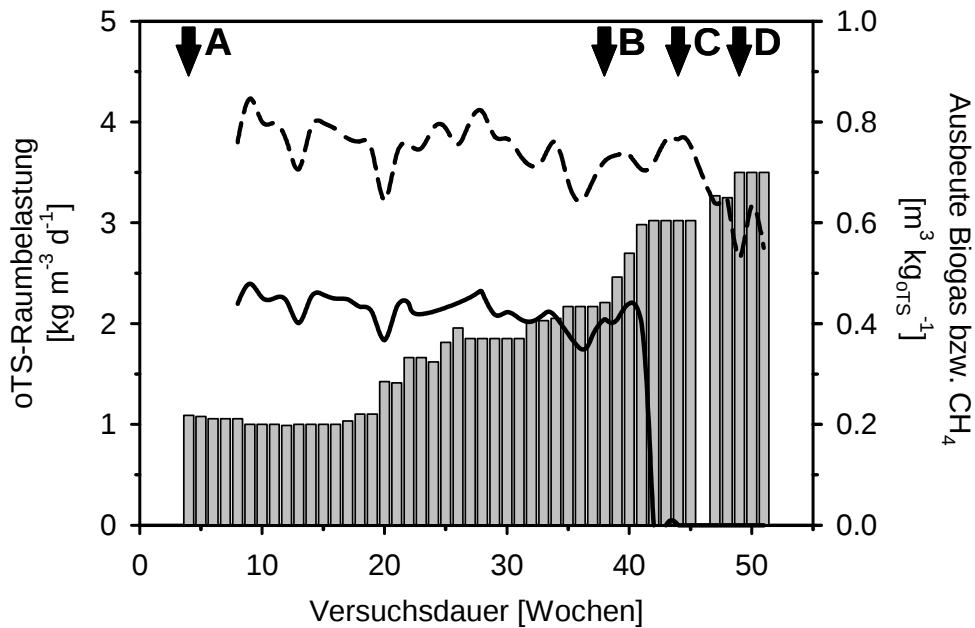


Abb. 13: Raumbelastung (Balken) und Ausbeute an Biogas (- - -) bzw. Methan (—) während der semi-kontinuierlichen Fermentation von Mais-Ganzpflanzensilage unter thermophilen Bedingungen. Die Zeitpunkte der Probennahme für Versuchsteil B-2 sind durch Pfeile markiert. A= Startphase (09.03.2005), B= OLR ca.  $2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (02.11.2005), C= OLR ca.  $3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (14.12.2005), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (18.01.2005).

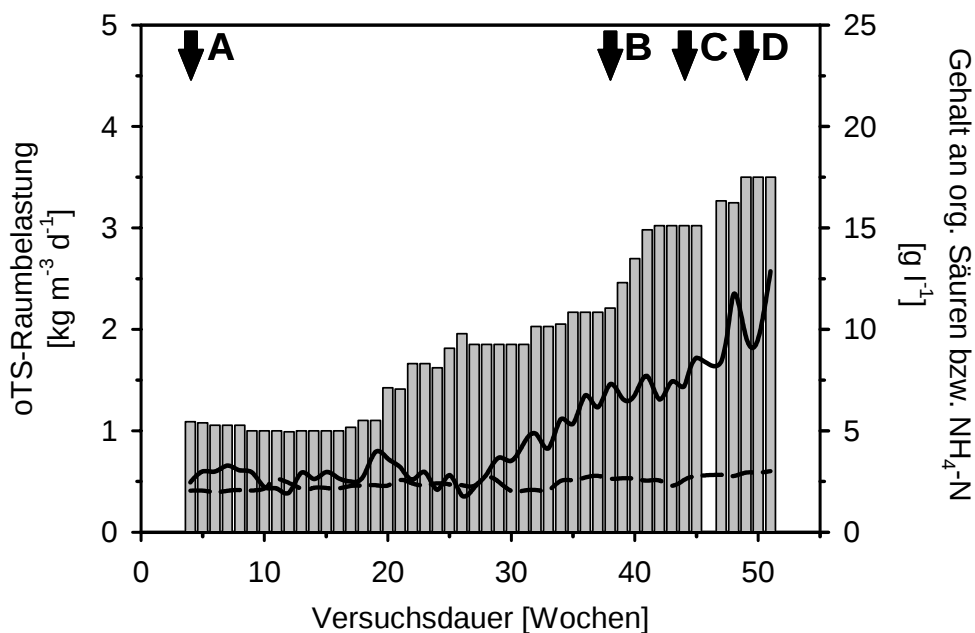


Abb. 14: Raumbelastung (Balken) und Gehalt an Ammonium-Stickstoff (- - -) bzw. organischen Säuren (—) während der semi-kontinuierlichen Fermentation von Mais-Ganzpflanzensilage unter thermophilen Bedingungen. Der pH lag bis Woche 47 bei  $8,32 \pm 0,10$  (Minimum: 8,09; Maximum: 8,47). Ab Woche 47 verringert sich der pH, bis er in Woche 51 einen Wert von 7,37 erreicht.

Die Zeitpunkte der Probennahme für Versuchsteil B-2 sind durch Pfeile markiert. A= Startphase (09.03.2005), B= OLR ca.  $2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (02.11.2005), C= OLR ca.  $3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (14.12.2005), D= übersäuerter Reaktorzustand nach Überladung (18.01.2005).

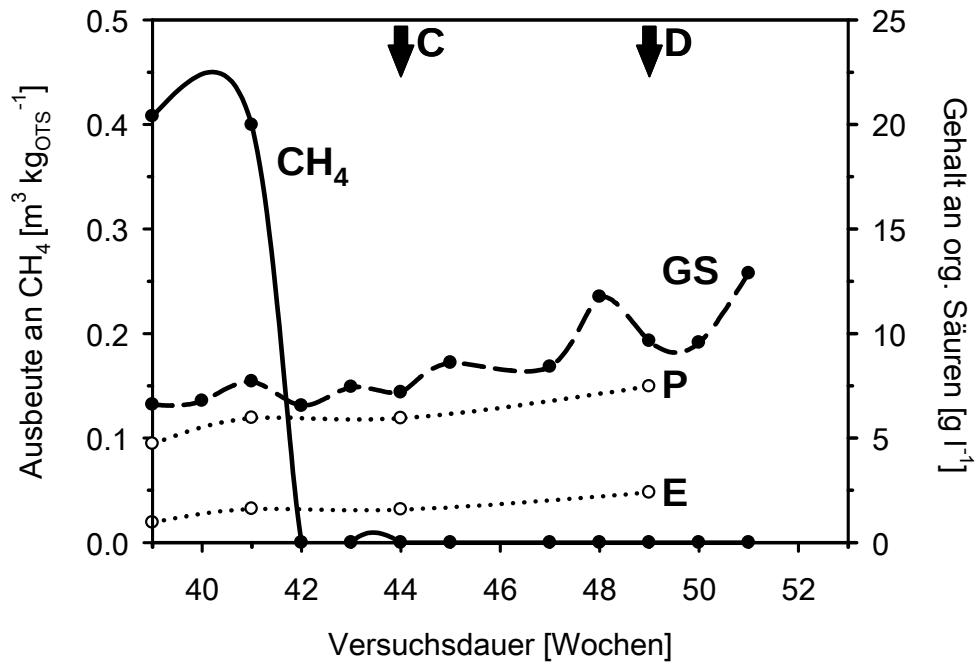


Abb. 15: Entwicklung der Gehalte an organischen Säuren im Verlauf der Übersäuerung der thermophilen Fermentation (Woche 39 bis 51) hervorgerufen durch eine gesteigerte Raumbelastung mit Maissilage (vgl. Abb. 13). Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-2 (C und D) sind durch Pfeile markiert. Dargestellt ist der Gehalt aller organischer Säuren (GS, ermittelt als Summenparameter ohne Differenzierung zwischen den einzelnen Säuren), der Gehalt an Essigsäure (E) und Propionsäure (P) sowie die Methanausbeute (CH<sub>4</sub>).

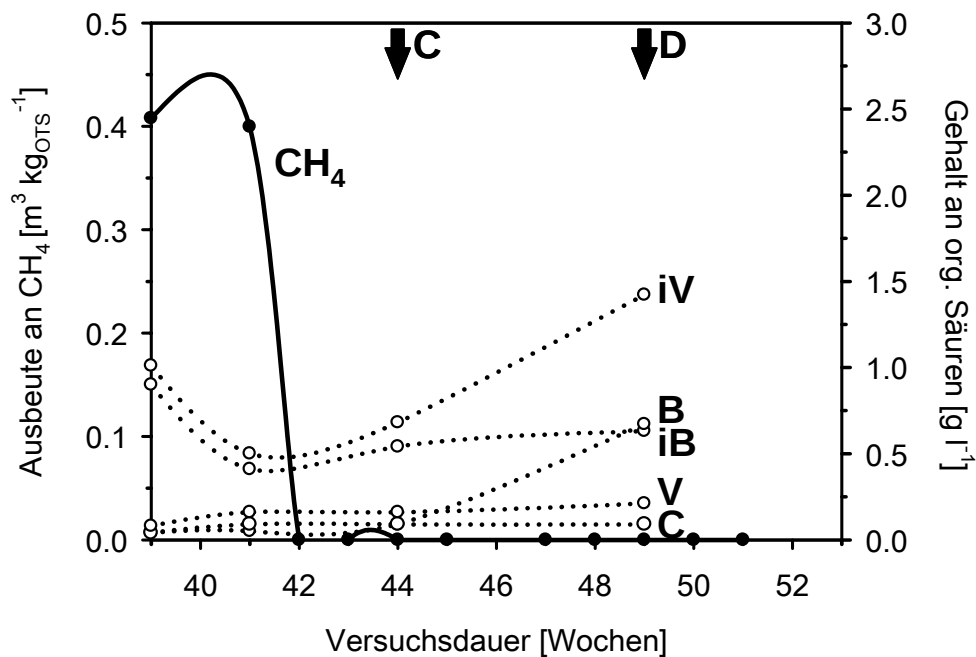


Abb. 16: Entwicklung der Gehalte von Buttersäure (B), Iso-Buttersäure (iB), Valeriansäure (V), Iso-Valeriansäure (iV) und Capronsäure (C) sowie die Methanausbeute (CH<sub>4</sub>) im Verlauf der Übersäuerung der thermophilen Fermentation (Woche 39 bis 51) hervorgerufen durch eine gesteigerte Raumbelastung mit Maissilage (vgl. Abb. 13). Die Zeitpunkte der Probenahme für Versuchsteil B-2 (C und D) sind durch Pfeile markiert. Der Gehalt an Ethanol und Propanol wurde nicht ermittelt.

### Struktur der bakteriellen Gemeinschaft

Zur Erfassung der mikrobiellen Diversität innerhalb der an der Vergärung von Maissilage beteiligten Bacteria wurden aus einer mesophilen und einer thermophilen Fermentation Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei unterschiedlichen Belastungsraten (OLR) entnommen und hieraus die mikrobielle DNA isoliert. Aus der gesamten mikrobiellen DNA wurden die Gene für die bakterielle 16S rRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und kloniert. Von den resultierenden Klonbibliotheken wurden zwischen 366 und 391 Klone mittels PCR-RFLP (ARDRA) in einzelne taxonomische Gruppen (*operational taxonomic units*, OTUs) eingeteilt (Tab. 11). Insgesamt wurden 3.062 16S rDNA Nukleotidsequenzen untersucht, welche in 655 bakterielle OTUs klassifiziert werden konnten. Mittels dieses Versuchsansatzes wurden erwartungsgemäß in keiner Klonbibliothek archaeelle 16S rDNA Sequenzen detektiert.

Die Abdeckung (berechnet nach GOOD) der Klonauswahl zur Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken beträgt zwischen 65 und 87%. Hieraus folgt, dass die Auswahl genügend groß war um die häufigsten taxonomischen Gruppen (OTUs) zu detektieren. Dennoch erwiesen sich 65% aller detektierten OTUs als Singulets, d.h. sie wurden nur ein einziges Mal in einer der acht Klonbibliotheken detektiert. Bei diesen OTUs besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sie in den Reaktoren nur gelegentlich bzw. in geringer Individuenzahl auftreten. Daher wurden in der Sequenzanalyse ausschließlich die redundant auftretenden OTUs bearbeitet.

Tab. 11: Tabellarische Übersicht über die im Rahmen von Versuchsteil B entwickelten Bacteria spezifischen 16S rRNA Genbibliotheken. Nicht auswertbare OTUs bzw. Sequenzen (z.B. chimerische Sequenzen, andere als 16S rRNA Gensequenzen) wurden von der Analyse ausgeschlossen und sind nicht mit aufgeführt.

| Raumbelastung                                                      | Mesophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-1) |                                      |                                      |                       | Thermophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-2) |                                      |                                      |                       | Gesamt                  |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                                                                    | Start                                                 | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert            | Start                                                   | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert            |                         |
| Klone mittels ARDRA analysiert                                     | 369                                                   | 366                                  | 388                                  | 384                   | 386                                                     | 391                                  | 389                                  | 389                   | 3062                    |
| Detektierte OTU (ARDRA-Muster)<br>davon OTU mit 1 Klon (Singulets) | 166 (100%)<br>129 (78%)                               | 154 (100%)<br>118 (77%)              | 118 (100%)<br>82 (69%)               | 86 (100%)<br>50 (58%) | 122 (100%)<br>74 (61%)                                  | 81 (100%)<br>45 (55%)                | 82 (100%)<br>51 (62%)                | 86 (100%)<br>51 (59%) | 655 (100%)<br>426 (65%) |
| Abdeckung (Coverage) n. Good *                                     | 65%                                                   | 68%                                  | 79%                                  | 87%                   | 81%                                                     | 88%                                  | 87%                                  | 87%                   | 86%                     |
| Diversitätsindex (H) n. Shannon                                    | 4.217                                                 | 4.232                                | 3.725                                | 3.385                 | 3.873                                                   | 3.245                                | 3.121                                | 3.413                 | NA                      |
| Evenness                                                           | 0.409                                                 | 0.447                                | 0.351                                | 0.343                 | 0.394                                                   | 0.317                                | 0.276                                | 0.353                 | NA                      |

\* [1 - (Singulets / alle Klone)]

Die meisten OTUs für fermentative Bacteria wurden zu Beginn der mesophilen Fermentation nachgewiesen. Im Laufe der Fermentation nahm die Diversität ab, bis sie nach 46 Wochen im Zustand der Übersäuerung einen Tiefpunkt erreicht hatte. So nahm der Diversitätsindex nach SHANNON von 4,217 auf 3,385 ab. Dementsprechend fällt die Abdeckung der Klonbibliothek auch zu Beginn der Fermentation am geringsten aus.

Ähnlich verhielt es sich in der thermophilen Fermentation. Auch hierbei wurde zu Beginn der Fermentation die größte Diversität mit den meisten OTUs, im Vergleich mit der mesophilen Fermentation allerdings weniger, festgestellt. Im Laufe der Fermentation war ebenfalls eine Verarmung der bakteriellen Mikroflora zu beobachten. Insgesamt war aber die bakterielle Population unter thermophilen Bedingungen immer artenärmer als unter mesophilen Temperaturen bei ansonsten gleichen Bedingungen.

Zur Bestimmung des Ausmaßes von Übereinstimmungen zwischen zwei mikrobiellen Diversitäten kann der Gleichheits- bzw. Similaritätsindex (*similarity index*, SI) herangezogen werden. In dieser Studie wurde zur Berechnung der paarweisen SI der Algorithmus nach Jaccard ohne und mit Korrektur nach CHAO verwendet [CHAO *et al.* 2005] (Tab. 12 und 13). Bei der Betrachtung aller nachgewiesenen OTUs und der resultierenden SI wird deutlich, dass die mikrobiellen Gemeinschaften einer starken Dynamik im Verlauf der mesophilen Fermentation unterliegen. Unter thermophilen

Bedingungen bestehen zwischen den Biozönosen mehr Gemeinsamkeiten, mit Werten kleiner als 0,62 für den CHAO-JACCARD SI fallen diese allerdings verglichen mit anderen Biozönosen relativ gering aus (100% Übereinstimmung = 1,0).

Im Vergleich der SI-Werte berechnet nach JACCARD einerseits ohne andererseits mit Korrektur nach CHAO wird deutlich, dass der klassische Ansatz ohne Korrektur grundsätzlich geringere Werte ergibt, als mit Korrektur nach CHAO. So ist mittels des klassischen JACCARD-SI zwischen keiner der untersuchten Proben eine Ähnlichkeit bezüglich der mikrobiellen Diversität feststellbar. Mit dem CHAO-korrigierten SI hingegen werden Zusammenhänge insbesondere innerhalb der thermophilen Fermentationen deutlich.

Tab. 12: Vergleich der Diversitäten innerhalb der fermentativen Bacteria auf Basis der Häufigkeit der detektierten OTUs in den Klonbibliotheken (Tab. 11). Dargestellt sind die Werte für den paarweisen Vergleich mittels Similaritätsindex (SI) nach JACCARD ohne und mit Korrektur nach CHAO [CHAO *et al.* 2005]. SI-Werte für zeitlich aufeinander folgende Proben sind fett markiert. In kursiv ist der SI-Wert für den paarweisen Vergleich der bakteriellen Diversität zu Beginn der Fermentation gegeben.

| Vergärung von Mais                    |                                      | Mesophil<br>(Versuchsteil B-1) |       |                                         |                                         | Thermophil<br>(Versuchsteil B-2) |       |                                         |                                         | SI n. Jaccard |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|
|                                       |                                      | Raumbelastung                  | Start | 2<br>kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3<br>kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert                       | Start | 2<br>kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3<br>kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |               |
| Mesophil<br>(Versuchsteil B-1)        | Start                                | -                              | 0.088 | 0.109                                   | 0.059                                   | 0.055                            | 0.033 | 0.046                                   | 0.063                                   |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.292                          | -     | 0.115                                   | 0.106                                   | 0.070                            | 0.040 | 0.031                                   | 0.048                                   |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.343                          | 0.359 | -                                       | 0.091                                   | 0.039                            | 0.053 | 0.053                                   | 0.057                                   |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.156                          | 0.301 | 0.164                                   | -                                       | 0.067                            | 0.037 | 0.037                                   | 0.055                                   |               |
| Thermophil<br>(Versuchsteil B-2)      | Start                                | 0.083                          | 0.176 | 0.107                                   | 0.080                                   | -                                | 0.080 | 0.172                                   | 0.143                                   |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.082                          | 0.132 | 0.118                                   | 0.059                                   | 0.311                            | -     | 0.148                                   | 0.136                                   |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.082                          | 0.129 | 0.084                                   | 0.050                                   | 0.543                            | 0.611 | -                                       | 0.209                                   |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.204                          | 0.113 | 0.063                                   | 0.062                                   | 0.475                            | 0.428 | 0.536                                   | -                                       |               |
| SI n. Jaccard mit Korrektur nach Chao |                                      |                                |       |                                         |                                         |                                  |       |                                         |                                         |               |

Tab. 13: Vergleich der Diversitäten innerhalb der fermentativen Bacteria auf Basis der Häufigkeit der wiederholt detektierten OTUs in den Klonbibliotheken (Tab. 11). Im Unterschied zu Tab. 12 wurden bei dieser Berechnung OTUs, welche nur in einer einzigen von acht untersuchten Proben nachgewiesen wurden, von der Berechnung ausgeschlossen. Alle weiteren Details wie in Tab. 12.

| Vergärung von Mais                    |                                      | Mesophil<br>(Versuchsteil B-1) |                                    |                                    |            | Thermophil<br>(Versuchsteil B-2) |                                    |                                    |            | SI n. Jaccard |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|---------------|
| Raumbelastung                         |                                      | Start                          | 2                                  | 3                                  | Übersäuert | Start                            | 2                                  | 3                                  | Übersäuert |               |
|                                       |                                      |                                | kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |            |                                  | kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |            |               |
| Mesophil<br>(Versuchsteil B-1)        | Start                                | -                              | 0.313                              | 0.364                              | 0.192      | 0.167                            | 0.104                              | 0.118                              | 0.169      |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.525                          | -                                  | 0.368                              | 0.365      | 0.209                            | 0.120                              | 0.073                              | 0.120      |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.664                          | 0.674                              | -                                  | 0.262      | 0.099                            | 0.143                              | 0.112                              | 0.125      |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.298                          | 0.601                              | 0.317                              | -          | 0.171                            | 0.107                              | 0.080                              | 0.125      |               |
| Thermophil<br>(Versuchsteil B-2)      | Start                                | 0.124                          | 0.274                              | 0.164                              | 0.108      | -                                | 0.231                              | 0.435                              | 0.356      |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.111                          | 0.186                              | 0.170                              | 0.096      | 0.466                            | -                                  | 0.362                              | 0.339      |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.103                          | 0.168                              | 0.105                              | 0.079      | 0.810                            | 0.810                              | -                                  | 0.420      |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.287                          | 0.148                              | 0.080                              | 0.094      | 0.713                            | 0.555                              | 0.670                              | -          |               |
| SI n. Jaccard mit Korrektur nach Chao |                                      |                                |                                    |                                    |            |                                  |                                    |                                    |            |               |

Wesentlich stärker treten Gemeinsamkeiten zwischen den Populationen hervor, wenn zur Berechnung des SI ausschließlich die wiederholt in mehreren Proben nachgewiesenen OTUs herangezogen werden (Tab. 13). Unabhängig von der Art der Berechnung fallen die Werte für den paarweisen SI größer aus als bei Berechnung auf Grundlage aller OTUs. So treten zwischen den thermophilen Fermentationen durchaus SI bis zu 0,810 auf, was für größere Übereinstimmungen zwi-

schen diesen mikrobiellen Lebensgemeinschaften bezogen auf bestimmte, verhältnismäßig häufig vorkommende Arten spricht.

Aus den acht Klonbibliotheken für das bakterielle 16S rDNA Gen wurden die Nukleotidsequenzen für 229 wiederholt detektierte PCR-RFLP-Muster ermittelt. Die durchschnittliche Sequenzlänge lag bei  $868 \pm 76$  bp. Die minimale Leseweite lag bei 538 bp, maximal konnten 1014 bp ermittelt werden. Der Median lag mit 891 bp geringfügig über dem Mittelwert.

Die untersuchten 16S rDNA Sequenzen wiesen zu der 16S rDNA von Referenzorganismen im Mittel eine p-Distanz (ohne Korrektur) von  $11\% \pm 5\%$  auf. Maximal trat eine p-Distanz von 24% auf (OTU MS14492-B496, 912 bp). In der Literatur wird auf Artebene für gewöhnlich eine Variabilität innerhalb der 16S rDNA Gensequenz von 2-3% angenommen. Je nach Art kann dieser Wert jedoch stark variieren. So lassen sich z.B. bei manchen *Lactobacillus*-Arten (Stamm Firmicutes, Klasse Bacilli) keine Unterschiede innerhalb des 16S rDNA Gens detektieren. Die taxonomische Einordnung erfolgte daher primär nach der Anordnung in den phylogenetischen Stammbäumen.

In den vier aus der mesophilen semikontinuierlichen Fermentation von Mais-Ganzpflanzensilagen entwickelten 16S rRNA Genbibliotheken konnten 144 wiederholt auftretende bakterielle OTUs ermittelt werden. Die phylogenetische Einordnung dieser OTUs ergab in den überwiegenden Fällen (72%) eine Zuordnung zu dem Stamm Firmicutes, und innerhalb dieses zu der Klasse Clostridia (Abb. 17). Am zweithäufigsten traten OTUs für den Stamm Bacteroidetes auf (15%), weitere OTUs wurden für die Stämme Actinobacteria (5%), Tenericutes (2%), Chlorobium (1%), Fusobacteria (1%) und Spirochaetes (1%) detektiert. 4% aller OTUs waren keiner bekannten taxonomischen Gruppe zuordbar.

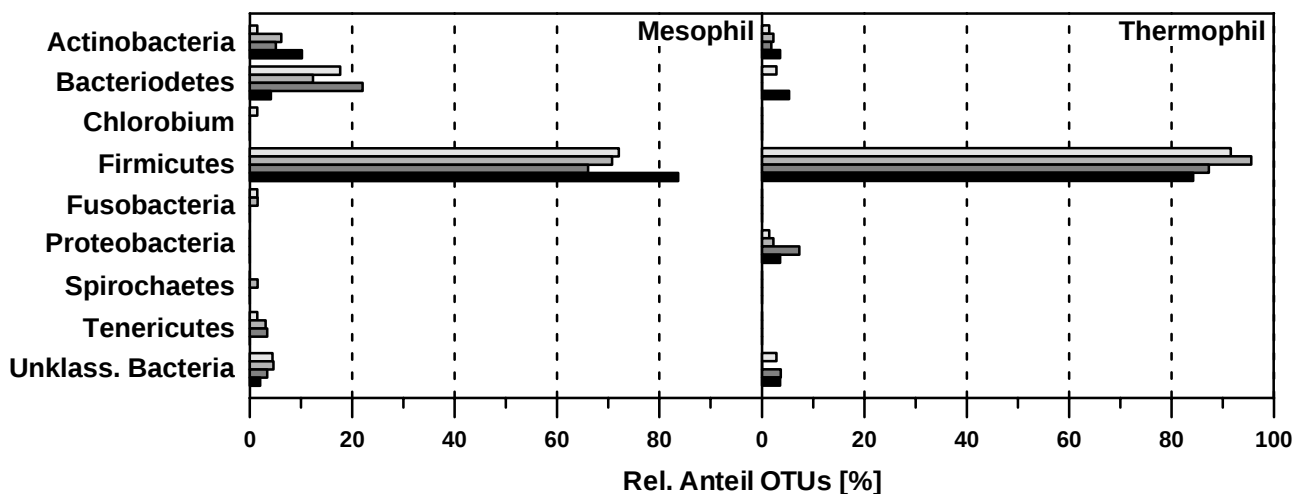


Abb. 17: Bakterielle Diversität im Verlauf einer semikontinuierlichen Biogasfermentation bei unterschiedlichen Belastungsraten mit Maissilage unter mesophilem und thermophilem Temperaturregime. Der Nachweis individueller taxonomischer Einheiten (OTUs) erfolgte auf Basis der klonierten bakteriellen 16S rDNA Sequenz bzw. des entsprechenden PCR-RFLP-Musters. Ausgewertet wurden ausschließlich wiederholt detektierte OTUs. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an OTUs für den jeweiligen Stamm bezogen auf alle OTUs, welche in der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek beobachtet wurden. OTUs, welche nicht eindeutig einem Stamm zugeordnet werden konnten, werden als „Unklassifizierbare Bacteria“ abgebildet. Die Balkentönung repräsentiert mit zunehmender Dunkelheit eine zunehmende Raumbelastung (hellgrau= Startphase, schwarz= Übersäuerung, dazwischenliegende Grautöne repräsentieren eine Raumbelastung von 2 bzw. 3  $\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$ ).

Wie bereits zuvor gezeigt, sind nur wenige OTUs durchgängig in allen Fermentationen präsent. Nichtsdestotrotz stellen die Firmicutes in zu jedem Zeitpunkt der Fermentation die artenreichste Gruppe innerhalb der fermentativen Mikroorganismen dar. Insbesondere scheinen die Firmicutes

am ehesten einen Zustand der Übersäuerung mit dem damit verbundenen Abfall im pH-Wert und der Akkumulation von organischen Säuren zu überstehen.

In den 16S rDNA Genbibliotheken konnten ebenfalls eine große Zahl der detektierten OTUs den Firmicutes zugeordnet werden. Von den nachgewiesenen 229 bakteriellen OTUs zeigten 181 (79%) in der phylogenetischen Analyse die höchste Verwandtschaft mit Vertretern der Firmicutes insbesondere zu Angehörigen der Klasse Clostridia. Andere Gruppen von Bakterien wurden in geringerer Artenzahl als in den mesophilen Fermentationen detektiert. 3% der OTUs konnten den Bacteroidetes zugeordnet werden, 3% den Actinobacteria sowie 3% den Proteobacteria. Vertreter der Stämme Chlorobium, Fusobacteria, Tenericutes und Spirochaetes wurden nicht detektiert. 4% der OTUs konnten keiner taxonomischen Gruppe zugeordnet werden.

Im Unterschied zu der mesophilen Fermentation ist die mikrobielle Lebensgemeinschaft der thermophilen Fermentation etwas artenärmer. Auffällig ist, dass durch die thermophilen Bedingungen es zu einer Anreicherung von Firmicutes kommt, während nur wenige Bacteroidetes an die erhöhten Temperaturen angepasst sind. Auffällig ist, dass Proteobacteria, zu welchen typische Sekundärfermentierer zählen, welche u.a. die Umwandlung von kurzkettigen Fettsäuren durchführen, nur mit wenigen OTUs und nur unter thermophilen Bedingungen nachgewiesen wurden. Somit scheinen Firmicutes sowohl einen Großteil der primären- wie auch der sekundären Fermentationsprozesse durchzuführen. Die Frage, welchen Anteil alternative Biomasseabbauer wie die detektierten Vertreter der Bacteroides an den Substratumsätzen insbesondere unter mesophilen Bedingungen haben, bleibt zu klären.

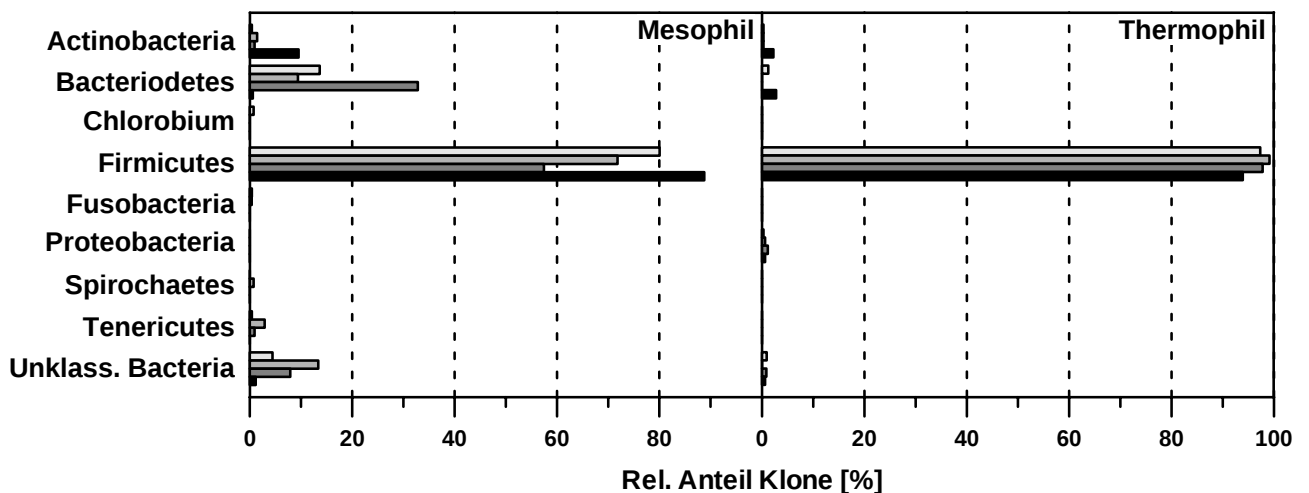


Abb. 18: Häufigkeit des Nachweises bakterieller OTUs in 16S rDNA Klonbibliotheken entwickelt aus Probenmaterial aus einer semikontinuierlichen Biogasfermentation bei unterschiedlichen Belastungsraten mit Maissilage unter mesophilem und thermophilem Temperaturregime. Der Nachweis individueller taxonomischer Einheiten (OTUs) erfolgte auf Basis der klonierten bakteriellen 16S rDNA Sequenz bzw. des entsprechenden PCR-RFLP-Musters. Ausgewertet wurden ausschließlich wiederholt detektierte OTUs. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Klonen für den jeweiligen Stamm bezogen auf alle Klonen, welche aus der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek analysiert wurden. Klonen für OTUs, welche nicht eindeutig einem Stamm zugeordnet werden konnten, werden als „Unklassifizierbare Bacteria“ dargestellt. Die Balkentönung repräsentiert mit zunehmender Dunkelheit eine zunehmende Raumbelastung (hellgrau= Startphase, schwarz= Übersäuerung, dazwischenliegende Grautöne repräsentieren eine Raumbelastung von 2 bzw. 3 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>).

Obwohl aus technischen Gründen kein unmittelbar zur Quantifizierung von Mikroorganismen geeigneter Ansatz, so kann doch die Häufigkeit mit der Nukleotidsequenzen in einer 16S rDNA Genbibliothek auftreten als Indiz für die relative Häufigkeit der Ursprungsorganismen dienen. Taxonomische Gruppen mit wesentlich höherer Individuenzahl sollten auch mehr DNA in der Präparation der mikrobiellen DNA stellen und somit mehr 16S rRNA Genkopien in PCR-Produkt und Klonbiblio-

thek. Faktoren wie zwischen den Arten variierende Kopienzahlen des 16S rRNA Gens im Genom, unterschiedliche Lysierungsraten und die nicht-lineare Vermehrung während der PCR können zwar die Proportionalität unter Umständen dramatisch beeinflussen, nichtsdestotrotz sollten in den meisten Fällen extreme Unterschiede in der Populationsgröße einzelner taxonomischer Gruppen in der Klonbibliothek abgebildet werden.

In den 16S rRNA Genbibliotheken für die mesophilen Fermentationen wurden die meisten 16S rRNA Gensequenzen für Vertreter der Firmicutes detektiert (Abb. 18). Bei insgesamt 75% der untersuchten 1224 Klone wurde eine der 104 Firmicutes-OTUs detektiert. 14% der Klone konnten der Gruppe der Bacteroidetes zugeordnet werden. Die taxonomischen Gruppen, welche mit der höchsten Artenzahl nachgewiesen wurden, stellten somit auch die häufigsten Nukleotidsequenzen in der Genbibliothek. Beides sind starke Indizien für eine hohe Organismenzahl in der Biogasfermentation.

Die Klonhäufigkeiten legen nahe, dass sich verschiedene Bacteroidetes im Verlauf der mesophilen Fermentation anreichern. So ist nach 34 Wochen Fermentation der relative Anteil an 16S rRNA Gensequenzen von Bacteroidetes von 14% auf 33% gestiegen. Nach Eintritt der Übersäuerung fällt der Anteil allerdings auf 1%, ein weiteres Indiz dafür, dass Bacteroidetes schlechter an versäuerte Habitate angepasst sind als Firmicutes.

Unter thermophilen Bedingungen finden sich bei fast allen untersuchten Klonen 16S rDNA Sequenzen von Vertretern der Firmicutes. Von 2636 untersuchten Sequenzen konnten 97% den Firmicutes zugeordnet werden. Vertreter anderer Stämme wurden nur vereinzelt nachgewiesen. Auch dieser Befund ist ein Beleg dafür, dass thermophile Bedingungen die Ansiedelung von Firmicutes fördern. Zur Ermittlung der konkreten Zelldichten sind jedoch weitere Arbeiten notwendig, insbesondere unter Berücksichtigung der Majorität der bislang nicht taxonomisch beschriebenen OTUs.

### *Struktur der Gemeinschaft methanogener Archaea*

Zur Bestimmung der in den Biogasfermentationen anwesenden methanbildenden Archaea wurden insgesamt acht 16S rDNA Klonbibliotheken mit zusammen 1082 Klonen angelegt. Die Ergebnisse der Auswertung der Archaea 16S rDNA Klonbibliotheken sind in Tab. 14 zusammengefasst. Je Reaktor und Zustand wurden zwischen 104 und 144 Klone der jeweiligen 16S rDNA Klonbibliothek mittels ARDRA (PCR-RFLP) untersucht. Hierbei wurden zwischen 13 und 48 verschiedene taxonomische Gruppen detektiert, welche als *operational taxonomic units* (OTUs) gewertet wurden. Nach der Sequenzierung und bioinformatischen Auswertung der zugehörigen 16S rDNA Nukleotidsequenzen erwiesen sich zwischen 8% und 53% der detektierten OTU als zugehörig zu der Domäne Archaea. Die restlichen OTU repräsentierten entweder Bakterien oder waren nicht auswertbar.

Die detektierten OTU für methanogene Archaea wurden bei 18% bis 83% der Klone der jeweiligen 16S rDNA Klonbibliothek nachgewiesen. Insbesondere bei den Klonbibliotheken, welche aus Probenmaterial aus mesophilen Biogasreaktoren entwickelt wurden, erwiesen sich viele der klonierten 16S rDNA Sequenzen als bakteriellen Ursprungs. Im Minimum wurden 25 16S rDNA Sequenzen für methanogene Archaea ermittelt. Nichtsdestotrotz ergab die Berechnung der Abdeckung nach der Formel von GOOD Werte zwischen 95 und 100% bezogen auf die Archaea Diversität. Hieraus ergibt sich, dass die Größe der gewählten Stichprobe (*i.e.* Anzahl der analysierten Klone) als ausreichend zur vollständigen Beschreibung der Archaea Diversität angesehen werden kann.

Der Diversitätsindex nach SHANNON für die Archaea Diversität innerhalb der untersuchten Biogasreaktoren lag zwischen 0,421 und 1,822. In einem Fall, bei der thermophilen Vergärung und einer Raumbelastung zwischen 2,0 und 2,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, betrug der Diversitätsindex 0, da nur eine einzige

OTU für methanogene Archaea detektiert wurde. Grundsätzlich ist jedoch, unabhängig von der Belastungsrate, bei einer mesophilen Vergärung von Maissilage eine höhere Archaea-Diversität zu beobachten als bei der thermophilen Vergärung.

Tab. 14: Tabellarische Übersicht über die im Rahmen von Versuchsteil B entwickelten Archaea spezifischen 16S rRNA Genbibliotheken. Es ist zu beachten, dass der Versuchsansatz technisch bedingt keine Aussagen über die Bacteria-Gemeinschaft zulässt.

| Raumbelastung                          | Mesophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-1) |                                      |                                      |                   | Thermophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-2) |                                      |                                      |                   | Gesamt             |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
|                                        | Start                                                 | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert        | Start                                                   | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert        |                    |
| <b>Klone gesamt</b>                    | <b>144</b>                                            | <b>119</b>                           | <b>144</b>                           | <b>142</b>        | <b>149</b>                                              | <b>104</b>                           | <b>138</b>                           | <b>142</b>        | <b>1082</b>        |
| davon nicht auswertbar                 | 10                                                    | 4                                    | 8                                    | 4                 | 4                                                       | 9                                    | 0                                    | 8                 | 47                 |
| <b>Klone mittels ARDRA analysiert</b>  | <b>134 (100%)</b>                                     | <b>115 (100%)</b>                    | <b>136 (100%)</b>                    | <b>138 (100%)</b> | <b>145 (100%)</b>                                       | <b>95 (100%)</b>                     | <b>138 (100%)</b>                    | <b>134 (100%)</b> | <b>1035 (100%)</b> |
| <b>Detektierte OTU (ARDRA-Muster)</b>  | <b>46 (100%)</b>                                      | <b>48 (100%)</b>                     | <b>36 (100%)</b>                     | <b>29 (100%)</b>  | <b>17 (100%)</b>                                        | <b>13 (100%)</b>                     | <b>17 (100%)</b>                     | <b>18 (100%)</b>  | <b>133 (100%)</b>  |
| davon OTU mit 1 Klon (Singulett)       | 32                                                    | 28                                   | 23                                   | 13                | 8                                                       | 8                                    | 12                                   | 5                 | 110                |
| <b>Detektierte Archaea OTU</b>         | <b>14 (30%)</b>                                       | <b>10 (21%)</b>                      | <b>8 (22%)</b>                       | <b>9 (31%)</b>    | <b>9 (53%)</b>                                          | <b>1 (8%)</b>                        | <b>8 (47%)</b>                       | <b>6 (33%)</b>    | <b>30 (23%)</b>    |
| davon OTU mit 1 Klon (Singulett)       | 6                                                     | 6                                    | 5                                    | 5                 | 4                                                       | 0                                    | 7                                    | 1                 | 15                 |
| <b>Klone mit 16S rDNA von Archaea</b>  | <b>90 (67%)</b>                                       | <b>45 (39%)</b>                      | <b>42 (31%)</b>                      | <b>25 (18%)</b>   | <b>121 (83%)</b>                                        | <b>42 (44%)</b>                      | <b>91 (66%)</b>                      | <b>86 (64%)</b>   | <b>542 (52%)</b>   |
| <b>Detektierte Bacteria OTU</b>        | <b>32 (70%)</b>                                       | <b>38 (79%)</b>                      | <b>28 (78%)</b>                      | <b>20 (69%)</b>   | <b>8 (47%)</b>                                          | <b>12 (92%)</b>                      | <b>9 (53%)</b>                       | <b>12 (67%)</b>   | <b>103 (77%)</b>   |
| davon OTU mit 1 Klon (Singulett)       | 26                                                    | 22                                   | 18                                   | 8                 | 4                                                       | 8                                    | 5                                    | 4                 | 95                 |
| <b>Klone mit 16S rDNA von Bacteria</b> | <b>44 (33%)</b>                                       | <b>70 (61%)</b>                      | <b>94 (69%)</b>                      | <b>113 (82%)</b>  | <b>24 (17%)</b>                                         | <b>53 (56%)</b>                      | <b>47 (34%)</b>                      | <b>48 (34%)</b>   | <b>493 (48%)</b>   |
| <b>Abdeckung (Coverage) n. Good *</b>  |                                                       |                                      |                                      |                   |                                                         |                                      |                                      |                   |                    |
| Gesamt                                 | 76%                                                   | 76%                                  | 83%                                  | 91%               | 94%                                                     | 92%                                  | 91%                                  | 96%               | Ø = 87%            |
| nur Archaea                            | 96%                                                   | 95%                                  | 96%                                  | 96%               | 97%                                                     | 100%                                 | 95%                                  | 99%               | Ø = 97%            |
| <b>Diversitätsindex (H) n. Shannon</b> |                                                       |                                      |                                      |                   |                                                         |                                      |                                      |                   |                    |
| Gesamt                                 | 2.943                                                 | 3.320                                | 2.669                                | 2.264             | 1.805                                                   | 1.674                                | 1.464                                | 1.770             | NA                 |
| nur Archaea                            | 1.822                                                 | 1.450                                | 1.423                                | 1.811             | 1.290                                                   | 0.000                                | 0.421                                | 0.616             | NA                 |
| <b>Evenness</b>                        |                                                       |                                      |                                      |                   |                                                         |                                      |                                      |                   |                    |
| Gesamt                                 | 0.412                                                 | 0.577                                | 0.401                                | 0.332             | 0.358                                                   | 0.410                                | 0.254                                | 0.326             | NA                 |
| nur Archaea                            | 0.442                                                 | 0.427                                | 0.519                                | 0.679             | 0.404                                                   | 1.000                                | 0.190                                | 0.309             | NA                 |

\* [1 - (Singulett / alle Klone)]

Die isolierten 16S rRNA Gen Nukleotidsequenzen für Archaea wurden in einer phylogenetischen Analyse taxonomisch klassifiziert. Eine Übersicht über die phylogenetische Einordnung wird in Abb. 19 und 20 gegeben. In Tab. 15 erfolgt die summarische Darstellung der relativen Anteile der nachgewiesenen OTUs in den jeweiligen Klonbibliotheken. Eine graphische Darstellung der OTU-Häufigkeiten erfolgt in Abb. 22.

Die in der 16S rDNA Analyse ermittelten Nukleotidsequenzen konnten verschiedenen Vertretern der Ordnungen Methanobacteriales, Methanomicrobiales und Methanosarcinales zugeordnet werden (Tab. 15). Hierbei ist zu beachten, dass ein gewisser Anteil der OTUs nur auf Ebene der Gattungen bereits bekannter Arten zuordbar war (Abb. 21). Zwischen 44 und 80% der nachgewiesenen OTUs für methanogene Archaea konnten nicht eindeutig bekannten Typenstämmen zugeordnet werden (vgl. Abb. 19 und 20). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass im Falle der untersuchten Region der 16S rDNA Sequenz die Annahme eines pauschalen Wertes für die maximal zulässige Unähnlichkeit als Grundlage für die Zuordnung zu einer Art nicht möglich ist. (In der Literatur werden hierzu Werte zwischen 2 und 3 % diskutiert). Wie aus Abb. 21 hervorgeht, werden diese „unbekannten“ OTUs aber durchaus in größeren Anteilen im Biogasfermenter gefunden (<76%) und könnten u.U. einen entsprechenden Einfluss auf die Methanbildung und damit auf die Reaktoreffizienz aufweisen.

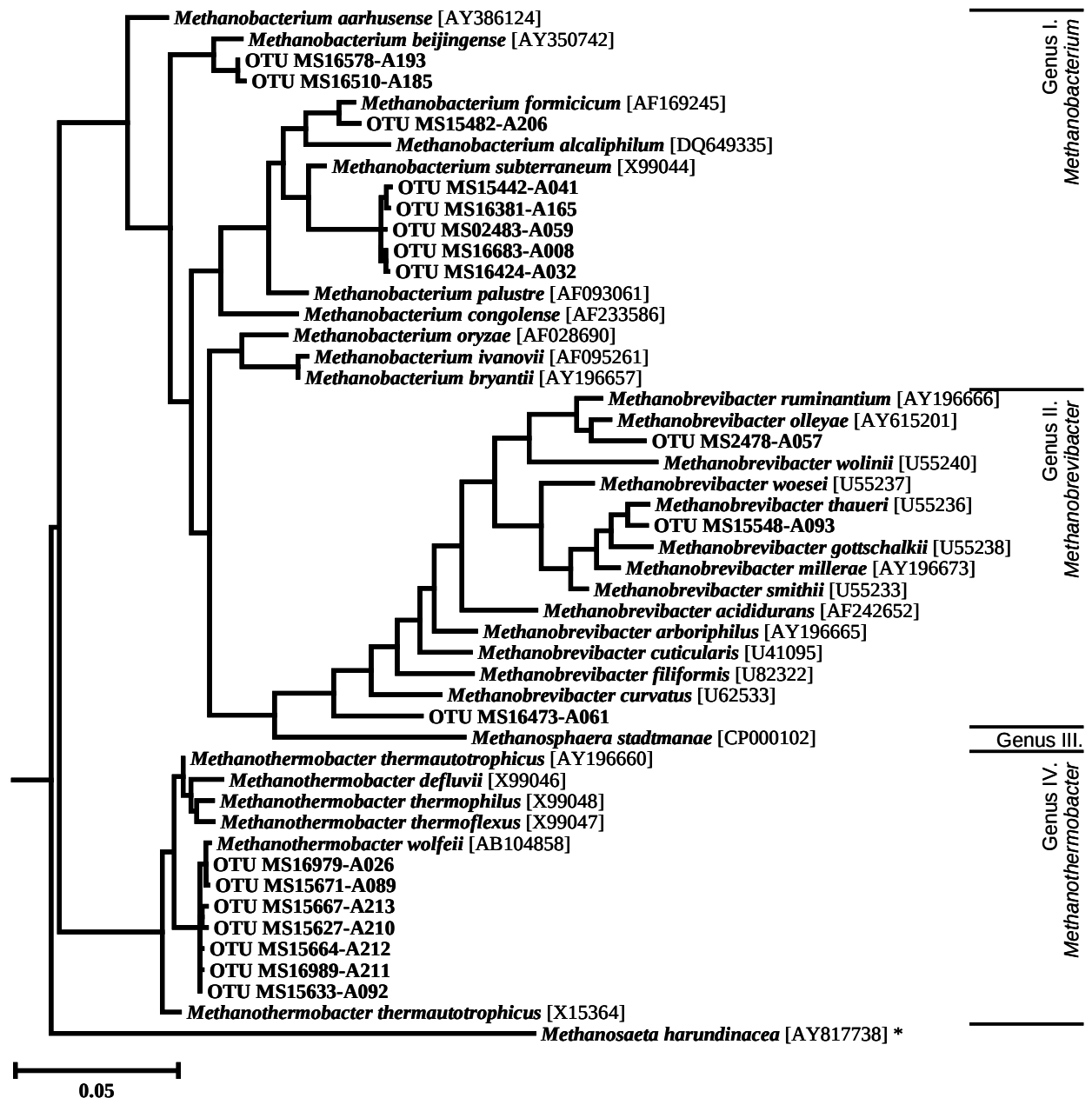


Abb. 19: Phylogentischer Baum für die Ordnung Methanobacteriales, Familie Methanobacteriaceae. Der Baum wurde mit der Maximum Parsimony Methode [ECK & DAYHOFF 1966] in dem Softwarepaket ARB berechnet [LUDWIG *et al.* 2004]. Der Größenmaßstab repräsentiert 5% evolutionäre Distanz auf Ebene eines ca. 800 bp großen Abschnitts des 16S rDNA Gens. In eckigen Klammern werden die Akzessionsnummern der NCBI-Genbank gegeben. Im Rahmen dieser Studie identifizierte Organismen sind mit OTU (*operational taxonomic unit*) gekennzeichnet. Nomenklatur entsprechend Bergey's Manual.

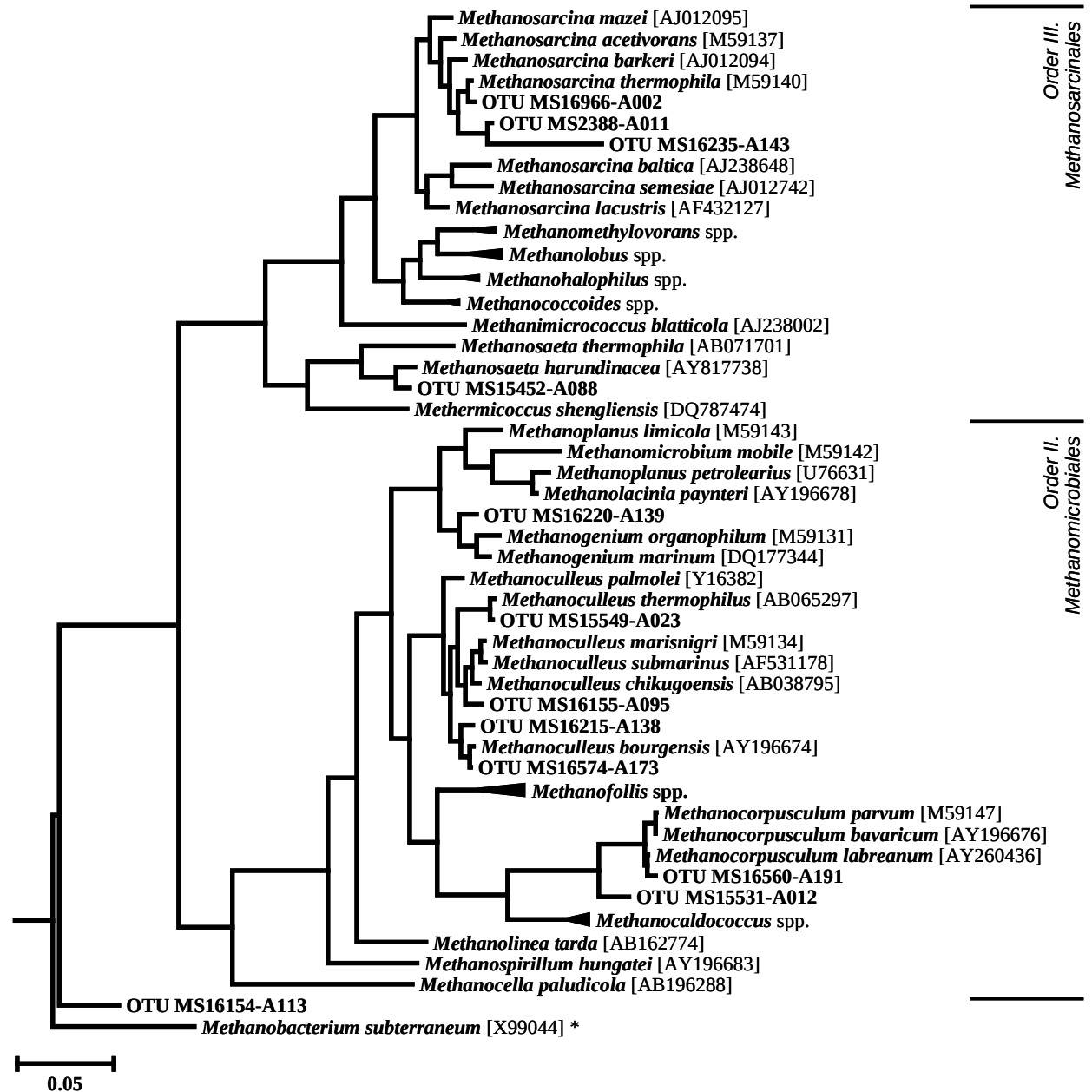


Abb. 20: Phylogenetischer Baum für die Ordnungen Methanosarcinales und Methanomicrobiales. Der Baum wurde mit der Maximum Parsimony Methode [ECK & DAYHOFF 1966] in dem Softwarepaket ARB berechnet [LUDWIG *et al.* 2004]. Der Größenmaßstab repräsentiert 5% evolutionäre Distanz auf Ebene eines ca. 800 bp großen Abschnitts des 16S rDNA Gens. In eckigen Klammern werden die Akzessionsnummern der NCBI-Genbank gegeben. Im Rahmen dieser Studie identifizierte Organismen sind mit OTU (*operational taxonomic unit*) gekennzeichnet.

Tab. 15: Taxonomische Einordnung der untersuchten 16S rRNA Gensequenzen methanogener Archaea.

Prozentuale Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil der jeweiligen taxonomischen Einheiten (OTUs) bzw. Klone in der jeweiligen Klonbibliothek. ND = nicht detektiert.

| Raumbelastung [kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ] | Mesophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-1) |              |                                      |       |                                      |       |            |       | Thermophile Fermentation von Mais<br>(Versuchsteil B-2) |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|------------|-------|---------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|------------|-------|
|                                                     | Start                                                 |              | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |       | Übersäuert |       | Start                                                   |       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> |       | Übersäuert |       |
|                                                     | OTUs                                                  | Klone        | OTUs                                 | Klone | OTUs                                 | Klone | OTUs       | Klone | OTUs                                                    | Klone | OTUs                                 | Klone | OTUs                                 | Klone | OTUs       | Klone |
| <b>Gesamt</b>                                       | 14                                                    | 90           | 10                                   | 45    | 8                                    | 42    | 9          | 25    | 9                                                       | 121   | 1                                    | 42    | 8                                    | 91    | 6          | 86    |
| Phylum All. Euryarchaeota                           |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Class I. Methanobacteria                            |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Order I. Methanobacteriales                         |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Family I. Methanobacteriaceae                       |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus I. <i>Methanobacterium</i>                    |                                                       | ND           | 40%                                  | 29%   | 50%                                  | 74%   | 56%        | 84%   | 22%                                                     | 2%    |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |
| <i>Methanobacterium beijingense</i>                 |                                                       |              |                                      | ND    |                                      | ND    | 22%        | 12%   |                                                         | ND    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| <i>Methanobacterium formicicum</i>                  |                                                       |              |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |                                                         | 11%   |                                      | 1%    |                                      |       |            |       |
| <i>Methanobacterium</i> sp.                         |                                                       |              | 40%                                  | 29%   | 50%                                  | 74%   | 33%        | 72%   |                                                         | 11%   |                                      | 2%    |                                      |       |            |       |
| Genus II. <i>Methanobrevibacter</i>                 | 14%                                                   | 4%           | 20%                                  | 4%    | 13%                                  | 2%    | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 8%    |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |
| <i>Methanobrevibacter</i> sp.                       | 14%                                                   | 4%           | 20%                                  | 4%    | 13%                                  | 2%    | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 8%    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus IV. <i>Methanothermobacter</i>                | 21%                                                   | 13%          |                                      | ND    | 13%                                  | 2%    |            | ND    | 22%                                                     | 46%   | 100%                                 | 100%  | 88%                                  | 99%   | 67%        | 94%   |
| <i>Methanothermobacter wolfeii</i>                  | 21%                                                   | 13%          |                                      |       | 13%                                  | 2%    |            |       | 22%                                                     | 46%   | 100%                                 | 100%  | 88%                                  | 99%   | 67%        | 94%   |
| Class II. Methanococci                              |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Order II. Methanomicrobiales                        |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Family I. Methanomicrobiaceae                       |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus II. <i>Methanoculleus</i>                     | 21%                                                   | 13%          | 10%                                  | 2%    | 13%                                  | 2%    | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 37%   |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |
| <i>Methanoculleus bourgensis</i>                    | 7%                                                    | 1%           |                                      | ND    | 13%                                  | 2%    | 11%        | 4%    |                                                         | ND    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| <i>Methanoculleus thermophilus</i>                  | 7%                                                    | 10%          | 10%                                  | 2%    |                                      | ND    |            | ND    | 11%                                                     | 37%   |                                      |       |                                      |       |            |       |
| <i>Methanoculleus</i> sp.                           | 7%                                                    | 2%           |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |                                                         | ND    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus IV. <i>Methanogenium</i>                      | 7%                                                    | 1%           |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |                                                         | ND    |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |
| <i>Methanogenium</i> sp.                            | 7%                                                    | 1%           |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Family II. Methanocorpusculaceae                    |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus I. <i>Methanocorpusculum</i>                  | 7%                                                    | 1%           | 10%                                  | 4%    |                                      | ND    | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 1%    |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |
| <i>Methanocorpusculum labreanum</i>                 |                                                       | ND           |                                      | ND    |                                      |       | 11%        | 4%    |                                                         | ND    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| <i>Methanocorpusculum</i> sp.                       | 7%                                                    | 1%           | 10%                                  | 4%    |                                      |       |            | ND    | 11%                                                     | 1%    |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Order III. Methanosarcinales                        |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Family I. Methanosarcinaceae                        |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus I. <i>Methanosarcina</i>                      | 14%                                                   | 22%          | 20%                                  | 60%   | 13%                                  | 19%   |            | ND    | 11%                                                     | 1%    |                                      | ND    |                                      | ND    | 17%        | 2%    |
| <i>Methanosarcina thermophila</i>                   | 7%                                                    | 21%          | 10%                                  | 58%   | 13%                                  | 19%   |            |       | 11%                                                     | 1%    |                                      |       |                                      |       | 17%        | 2%    |
| <i>Methanosarcina</i> sp.                           | 7%                                                    | 1%           | 10%                                  | 2%    |                                      | ND    |            |       |                                                         | ND    |                                      |       |                                      |       |            | ND    |
| Family II. Methanosaetaceae                         |                                                       |              |                                      |       |                                      |       |            |       |                                                         |       |                                      |       |                                      |       |            |       |
| Genus I. <i>Methanosaeta</i>                        | 7%                                                    | 43%          |                                      | ND    |                                      | ND    | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 4%    |                                      | ND    | 13%                                  | 1%    | 17%        | 3%    |
| <i>Methanosaeta harundinacea</i>                    | 7%                                                    | 43%          |                                      |       |                                      |       | 11%        | 4%    | 11%                                                     | 4%    |                                      |       | 13%                                  | 1%    | 17%        | 3%    |
| <b>Euryarchaeota unklarer taxonom. Klass.</b>       | <b>0.071</b>                                          | <b>0.011</b> |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |                                                         | ND    |                                      | ND    |                                      | ND    |            | ND    |

Sowohl im Falle der mesophilen wie auch der thermophilen Vergärung liegt zu Beginn der Fermentation eine artreiche Gemeinschaft verschiedener methanogener Archaea vor. Nachgewiesen wurden verschiedene Vertreter der Ordnungen Methanobacteriales, Methanomicrobiales und Methanosarcinales, Methanococcales wurden dagegen in keiner Fermentation gefunden.

Während der Fermentation unter mesophilen Temperaturregime war eine Anreicherung von Vertretern der Methanobacteriales zu beobachten. Neben OTUs mit enger phylogenetischer Verwandtschaft zu *Methanobacterium beijingense* reicherten sich *Methanobacterium*-Arten mit deutlichen Unterschieden zu den bekannten *Methanobacterium*-Stämmen (z.B. *Methanobacterium subterraneum*, p-Distanz 0,04) an. Eine genauere taxonomische Einordnung ist daher nicht möglich (Abb. 19).

Bei der thermophilen Fermentation kommt es frühzeitig, d.h. schon bei einer OLR 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> bzw. 38 Wochen Fermentation, zu einer Durchsetzung von *Methanothermobacter* sp. Hierbei erscheint eine Einordnung der detektierten OTUs als *Methanothermobacter wolfeii* als sehr wahrscheinlich (p-Distanz 0,00). Phasenweise ist diese Art in der thermophilen Fermentation die einzige nachweisbare methanogene Art.

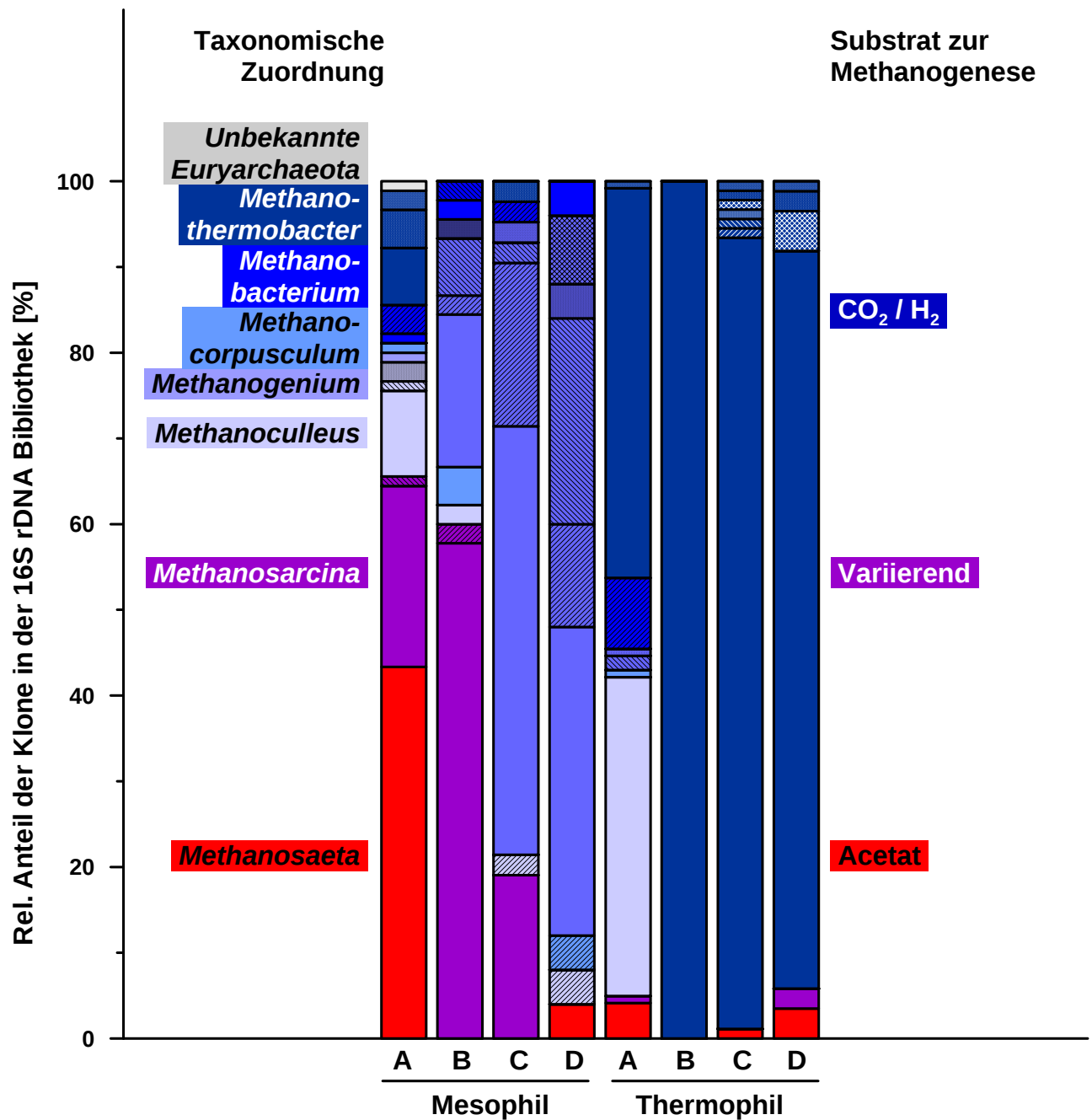


Abb. 22: Relative Häufigkeit verschiedener Archaea OTUs bzw. der entsprechenden 16S rDNA Sequenzen in den Klonbibliotheken entwickelt aus Proben aus mesophilen und thermophilen semikontinuierlichen Biogasfermentationen (Rührkesselreaktoren, CSTR) auf Basis von Maissilagen. (A) = Startphase zu Beginn der Fermentation, (B) OLR = 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, (C) OLR = 3 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, (D) nach Übersäuerung des Fermenters verursacht durch hohe OLR > 3,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Acetoklastische Methanbildner sind rot eingefärbt, hydrogenotrophe Methanbildner sind in Blautönen dargestellt, violette Balken repräsentieren mixotrophe Methanogene. Eine Farb-/Muster-Kombination symbolisiert eine OTU.

Acetat-verwertende Methanogene sind außer in der thermophilen Fermentation (OLR 2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) bei allen Fermentationsregimen nachweisbar. Insbesondere zu Beginn der mesophilen Fermentation treten obligat (*Methanosaeta* spp.) oder fakultativ (*Methanosarcina* spp.) acetoklastische Methanogene mit einem Anteil von 65% der untersuchten Klone der 16S rDNA Bibliothek bzw. über 21% der detektierten OTU auf (Tab. 15, Abb. 22). Dieser Anteil nimmt kontinuierlich während der Fermentation ab. Während sich *Methanosarcina* in der mesophilen Fermentation auch bei steigenden Belastungsraten noch behaupten können (60% der Klone bei OLR 2,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>).

$\text{d}^{-1}$ , 19% bei  $\text{OLR } 3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ), scheinen *Methanosaeta*en vergleichsweise schnell aus der Fermentation zu verschwinden. Interessanterweise sind nach Erliegen der Methanbildung im Zuge einer durch gesteigerte Substratzugabe provozierten Übersäuerung wieder Vertreter der *Methanosaeta* nachweisbar.

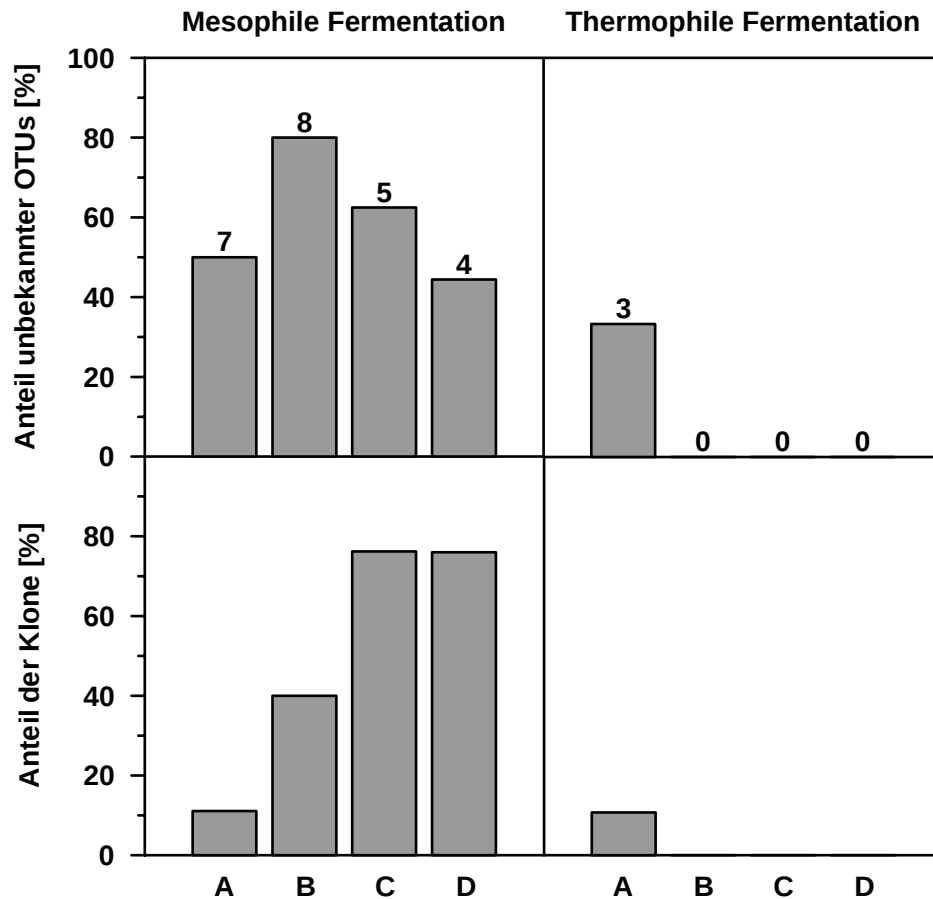


Abb. 21: Verteilung taxonomisch nicht eindeutig klassifizierbarer OTUs sowie der entsprechenden Klonzahlen in den 16S rDNA Klonbibliotheken. (A) = Startphase zu Beginn der Fermentation, (B)  $\text{OLR} = 2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , (C)  $\text{OLR} = 3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , (D) nach Übersäuerung des Fermenters verursacht durch hohe  $\text{OLR} > 3,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Zahlen über den Balken repräsentieren die absolute Anzahl unbekannter OTUs innerhalb der jeweiligen Klonbibliothek.

In der thermophilen Fermentation waren dagegen zu Beginn nur vereinzelt *Methanosaeta* spp. und *Methanosarcina* spp. Letztere wurden im Verlauf der Fermentation nicht mehr detektiert und erst wieder im Zustand der Übersäuerung nach 49 Wochen Fermentation nachgewiesen. Auch *Methanosaeta* spp. wurde zu keinem Zeitpunkt der thermophilen Fermentation in dem Ausmaß wie in der mesophilen Fermentation nachgewiesen.

In der mesophilen Fermentation konnte keine der detektierten OTUs für methanogene Archaea durchgängig während der 46 Wochen andauernden Versuchsdauer nachgewiesen werden. Dieses spricht für eine gewisse Fluktuation innerhalb der Archaea-Population. Verdeutlicht wird diese Dynamik durch den paarweisen Similaritätsindex nach JACCARD (Tab. 16), welche für die aufeinanderfolgenden Stadien der mesophilen Fermentation lediglich Werte zwischen 0,2 und 0,3 annimmt (100% Übereinstimmung = 1,0). In der Berechnung mit Korrektur nach CHAO [CHAO *et al.* 2005] ergeben sich für den Vergleich  $\text{OLR } 2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  zu  $\text{OLR } 3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  und  $\text{OLR } 3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  zu übersäuertem Reaktorzustand wesentlich höhere Werte (0,750 - 0,875). Dieses zeigt an, dass sich aus der heterogenen Archaea-Population zu Beginn der Fermentation im Laufe der Fermentation eine angepasste Archaea-Gemeinschaft entwickelt.

Ein entsprechendes Bild ergibt sich für die thermophile Fermentation. Die Similaritätsindices nach JACCARD mit CHAO-Korrektur nehmen sogar noch höhere Werte (bis 0,972) an, wobei allerdings die geringe Artenzahl zu berücksichtigen ist. Auch hier bestätigt der paarweise Vergleich, dass es im Zuge der andauernden Fermentation zu einer Selektion bestimmter Arten kommt.

Der paarweise Vergleich der Startbedingungen für die mesophile und thermophile Fermentation mittels CHAO-JACCARD-Index ergibt einen Wert von 0,979. Dieser vergleichsweise hohe Wert ist ein Beleg dafür, dass die mikrobiellen Gemeinschaften trotz der auf den ersten Blick unterschiedlichen Zusammensetzung grundsätzliche Gemeinsamkeiten aufweisen. Daher kann trotz des großen zeitlichen Abstands der Fermentationen (> 13 Monate) von ungefähr identischen Startbedingungen bezogen auf die eingesetzte Archaea-Population ausgegangen werden.

Tab. 16: Vergleich der Diversitäten innerhalb der methanogenen Archaea auf Basis der Häufigkeit der detektierten OTUs in den Klonbibliotheken (Tab. 15). Dargestellt sind die Werte für den paarweisen Vergleich mittels Similaritätsindex (SI) nach JACCARD ohne und mit Korrektur nach CHAO [CHAO *et al.* 2005]. SI-Werte für zeitlich aufeinander folgende Proben sind fett markiert. In kursiv ist der SI-Wert für den paarweisen Vergleich der Archaea Diversität zu Beginn der Fermentation gegeben.

| Monovergärung<br>von Mais             | Raumbelastung                        | Mesophil<br>(Versuchsteil B-1) |                                      |                                      |            | Thermophil<br>(Versuchsteil B-2) |                                      |                                      |            | SI n. Jaccard |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------|---------------|
|                                       |                                      | Start                          | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert | Start                            | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | Übersäuert |               |
| Mesophil<br>(Versuchsteil B-1)        | Start                                | -                              | 0.200                                | 0.158                                | 0.095      | 0.438                            | 0.071                                | 0.222                                | 0.333      |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.381                          | -                                    | 0.286                                | 0.267      | 0.267                            | 0                                    | 0                                    | 0.067      |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.168                          | 0.875                                | -                                    | 0.308      | 0.214                            | 0                                    | 0.067                                | 0.167      |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.098                          | 0.292                                | 0.750                                | -          | 0.125                            | 0                                    | 0.063                                | 0.071      |               |
| Thermophil<br>(Versuchsteil B-2)      | Start                                | 0.979                          | 0.587                                | 0.145                                | 0.065      | -                                | 0.111                                | 0.214                                | 0.364      |               |
|                                       | 2 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.067                          | 0                                    | 0                                    | 0          | 0.455                            | -                                    | 0.125                                | 0.167      |               |
|                                       | 3 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> | 0.956                          | 0                                    | 0.011                                | 0.013      | 0.538                            | 0.923                                | -                                    | 0.556      |               |
|                                       | Übersäuert                           | 0.754                          | 0.023                                | 0.048                                | 0.023      | 0.507                            | 0.860                                | 0.972                                | -          |               |
| SI n. Jaccard mit Korrektur nach Chao |                                      |                                |                                      |                                      |            |                                  |                                      |                                      |            |               |

Die Häufigkeit, mit der ein DNA-Fragment in einer Klonbibliothek nachweisbar ist, ist ein Indiz für die Häufigkeit dieses DNA-Fragments in der ursprünglichen DNA-Probe und lässt damit Rückschlüsse auf den relativen Anteil des Ursprungsorganismus in der Fermentorprobe zu. Aufgrund der nicht linearen Vermehrung der DNA in der PCR kann jedoch keine lineare Abhängigkeit angenommen werden.

Um aber dennoch eine Bestätigung (oder Ablehnung) der in den Klonbibliotheken für einzelne Archaea gefundenen relativen Anteile zu erhalten, wurde ein Assay basierend auf einer quantitativen real-time PCR (Q-PCR) durchgeführt. Hierzu wurden gruppenspezifische Primer und Taqman-Sonden (5'-Nuklease-Assay) aus der Literatur verwendet [Yu *et al.* 2005], das Reaktionsprotokoll und die Datenauswertung wurde entsprechend KLOCKE *et al.* [2007] durchgeführt. Die versuchstechnischen Parameter werden in Tab. 17 aufgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.

Die Kopienzahl für das bakterielle 16S rDNA Gen in einem Nanogramm mikrobieller DNA isoliert aus den Biogasfermentationen wurde im Mittel mit  $1,2 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$  für die mesophilen Fermentationen und mit  $4,1 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$  für die thermophilen Fermentationen bestimmt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Kopienzahl für die mesophile Fermentation im Zustand der Übersäuerung deutlich niedriger ausfällt als bei den übrigen Messungen (Faktor 100). Da für diese DNA-Probe jedoch für alle Q-PCR-Assays vergleichsweise niedrige Werte erhalten wurden, könnte eventuell eine Verunreinigung der DNA durch inhibierende Substanzen unter Umständen resultierend aus der Übersäuerung vorgelegen haben. Die Frage, ob die leicht differierenden Werte für die bakterielle 16S rDNA Kopienzahl auf eine (vierfach) höhere Bakteriendichte in der thermophilen Fermentation hindeuten, kann ohne weitere Versuche nicht geklärt werden.

Für Archaea wurde in der mesophilen Fermentation  $4,8 \times 10^3$  Kopien für das 16S rDNA Gen je Nanogramm mikrobieller DNA nachgewiesen. Für DNA aus thermophilen Fermentationen wurde wie zuvor ein geringfügig höherer Wert von  $1,2 \times 10^4$  Kopien je Nanogramm DNA gemessen. Die 16S rDNA Kopienzahl für Archaea betrug damit 0,03% bis 0,04% der Kopienzahl für Bacteria. Übertragen auf die Organismenzahl würde dieses bedeuten, dass in den Fermentern auf 10.000 Bakterien lediglich 3 bis 4 (methanogene) Archaea kommen. Dieses ist ein relativ geringer Anteil im Vergleich mit Literaturdaten, wo von Archaea:Bacteria Relationen zwischen 1% und 0,1% in Biogasanlagen berichtet wird [z.B. NETTMANN *et al.* eingereicht].

Mittels der verwendeten Q-PCR-Assays wurden die hauptsächlichen Gruppen methanogener Archaea (Ordnungen Methanobacteriales und Methanomicrobiales, für die Ordnung Methanosarcinales die Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae) nachgewiesen. Hierbei wurde im Allgemeinen für alle Fermentationen eine ähnliche Zusammensetzung der Archaea-Gemeinschaft wie mittels der Klonbibliotheken ermittelt (Tab. 17). Die in den Klonbibliotheken ermittelten relativen Anteile der taxonomischen Gruppen konnten jedoch nicht grundsätzlich bestätigt werden. Mittels der Q-Assays konnte jedoch bestätigt werden, dass der Anteil acetiklastischer Methanogener im Verlauf sowohl der mesophilen wie auch der thermophilen Fermentation abnimmt.

Ein Problem der Quantifizierung mittels Q-PCR stellt die Findung einer geeigneten Basis für relative Größen dar. In der vorliegenden Studie wurde als Basis die 16S rDNA Kopienzahl für Archaea gewählt. Es zeigte sich jedoch, dass die Kopienzahlen für einzelne Gruppen von Archaea bis auf eine Ausnahme nur 23% bis 67% der Archaea insgesamt gemessenen Kopienzahlen ausmachten. Hierfür kommen verschiedene Gründe in Frage, von denen eine ungenügende Spezifität des Archaea-Primer-Sets am Wahrscheinlichsten erscheint. Entsprechend der bei der Analyse der Klonbibliotheken gemachten Beobachtungen würde dieses bedeuten, dass ein gewisser Anteil an bakteriellen 16S rDNA Sequenzen mit detektiert wird. Andererseits wurden grundsätzlich verhältnismäßig geringe Anteile an Archaea 16S rRNA Genkopien verglichen mit bakterieller 16S rDNA gemessen. In wie weit sich also das Q-PCR-Assay zur Quantifizierung von Mikroorganismen einsetzen lässt, müssen weitere Arbeiten zeigen.

Tab.17: Parameter der quantitativen realtime PCR zum Nachweis methanogener Archaea.

| Q-PCR Assay        | Slope | Intercept | R <sup>2</sup><br>(Standardkurve) | PCR-Effizienz | Threshold |
|--------------------|-------|-----------|-----------------------------------|---------------|-----------|
| Bacteria           | -3,46 | 47,56     | 0,97                              | 95%           | 0,05      |
| Archaea            | -3,66 | 44,39     | 0,98                              | 88%           | 0,05      |
| Methanobacteriales | -3,44 | 40,29     | 0,99                              | 95%           | 0,05      |
| Methanomicrobiales | -3,60 | 53,20     | 0,96                              | 90%           | 0,05      |
| Methanosarcinaceae | -3,41 | 41,68     | 0,98                              | 96%           | 0,05      |
| Methanosaetaceae   | -3,78 | 45,51     | 0,99                              | 84%           | 0,05      |

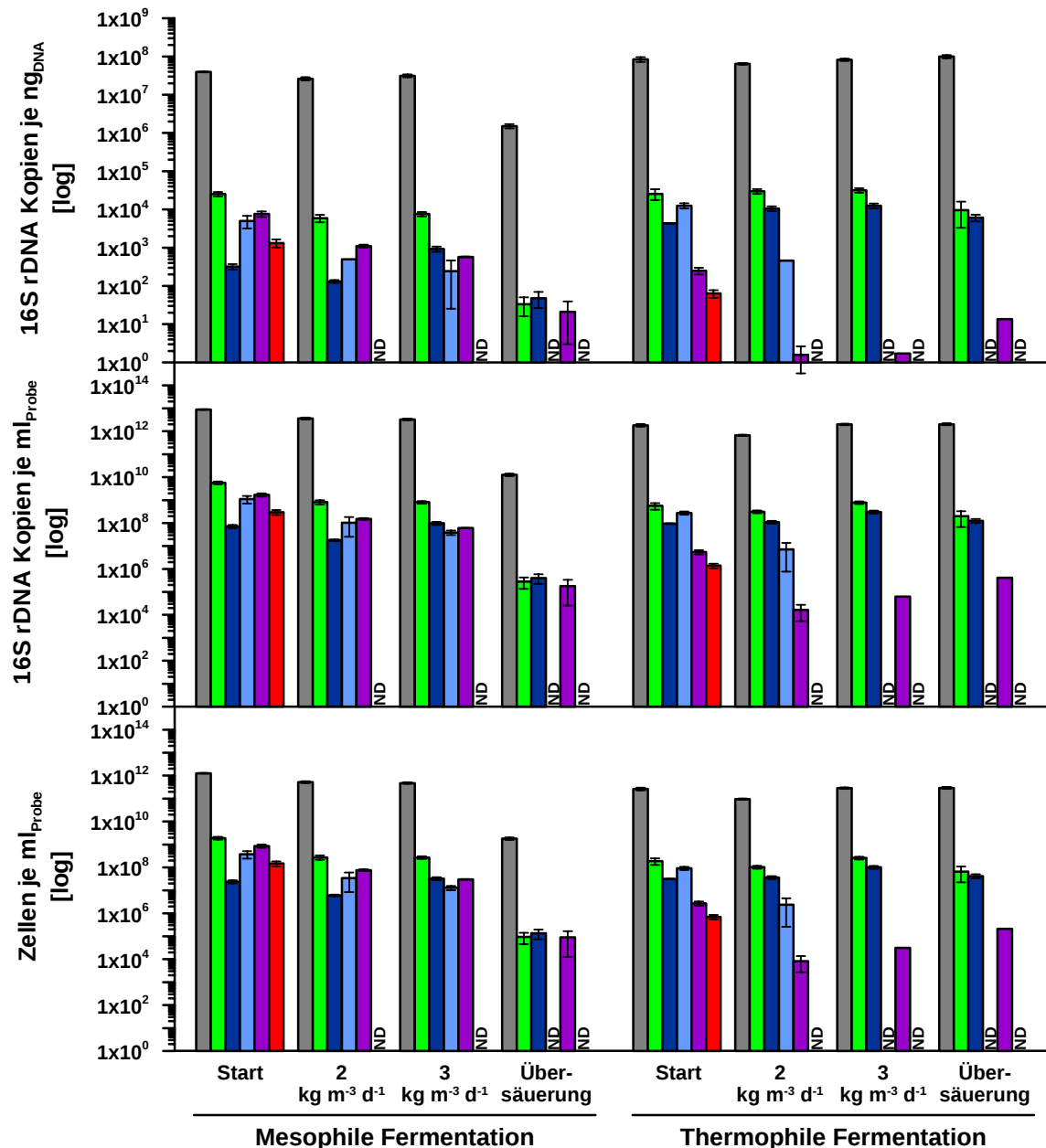


Abb. 23: Quantifizierung der Bacteria und Archaea in Probenmaterial aus einer semikontinuierlichen Biogasfermentation bei unterschiedlichen Belastungsraten mit Maissilage unter mesophilem und thermophilem Temperaturregime auf Basis der Bestimmung der Kopienzahl für das 16S rRNA Gen (16S rDNA) mittels quantitativer *realtime* PCR (5'-Nuklease-Assay, Abk. Q-PCR) unter Verwendung von 1 ng mikrobieller DNA als Template. Hierzu wurden gruppenspezifische Primer und Sonden nach Yu *et al.* [2005] verwendet, die Versuchsdurchführung und Datenauswertung erfolgte entsprechend KLOCKE *et al.* [2008] bzw. NETTMANN *et al.* [2008]. Mit Ausnahme des Wertes für Archaea ist immer der Mittelwert dreier Q-PCRs dargestellt, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Als Kopienzahl für Archaea wurde die Summe der gemittelten Werte für Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae angegeben. Alle Q-PCRs erfolgten in einem Messdurchgang, sind also direkt miteinander vergleichbar. Weitere Parameter zur statistischen Beurteilung werden in Tab. 17 gegeben.

(oben) 16S rDNA Kopien je Nanogramm mikrobieller DNA, (mitte) 16S rDNA Kopien je ml Reaktorflüssigkeit, (unten) Berechnete Zellzahl je ml Reaktorflüssigkeit unter der Annahme, dass im Mittel 3 Genkopien je archaealem Genom und 7 Genkopien je bakteriellem Genom vorliegen.

Grau: Bacteria (BAC-Set), Grün: Archaea (= Summe MBT-Set, MMB-Set, MSC-Set, MST-Set), Dunkelblau: Methanobacteriales (MBT-Set), Hellblau: Methanomicrobiales (MMB-Set), Violett: Methanosarcinaceae (MSC-Set), Rot: Methanosaetaceae (MST-Set). NA= Nicht untersucht, ND= Nicht nachgewiesen.



## Zitierte Literatur

- BERGMANN I, MUNDT K, SONTAG M, BAUMSTARK I, NETTMANN E, KLOCKE M (2010) Influence of DNA isolation on Q-PCR based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Syst Appl Microbiol* 33:78-84
- CHAO A, CHAZDON RL, COLWELL RK, SHEN TJ (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* 8:148-159
- COLE JR, WANG Q, CARDENAS E, FISH J, CHAI B *et al.* (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:D141-D145
- ECK RV, DAYHOFF MO (1966) Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 39:783-791
- KIMURA M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- KLOCKE M, NETTMANN E, BERGMANN I, MUNDT K, SOUIDI K, MUMME J, LINKE B (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst Appl Microbiol* 31:190-205
- LINKE B, MÄHNERT P (2005) Biogas production from cattle slurry and energy crops: effect of fermenter's load. *Landtechnik* 60:276-277
- 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
- NETTMANN E, BERGMANN I, MUNDT K, LINKE B, KLOCKE M (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J Appl Microbiol* 105:1835-1850
- SAITOU N & NEI M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- YU Y, LEE C, HWANG S (2005a) Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci Technol* 52:85-91
- YU Y, LEE C, KIM J, HWANG S. (2005b) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* 89:670-679

## II.2 Verwertung

Im Rahmen dieses Projektes wurden Arbeiten zur Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Biogasfermentationen auf Basis nachwachsender Rohstoffe durchgeführt. Hierbei wurden sowohl der Einfluss des Substrates (Mais, Futterrübe, Rindergülle) als auch der Raumbelastung (exemplarisch für Maissilage) auf die bakterielle und archaeelle Mikroflora betrachtet. Die Analyse der mikrobiellen Diversität erfolgte kulturunabhängig mittels Isolierung und Analyse des bakteriellen bzw. archaeellen Gens für die 16S rRNA (16S rDNA). Zur Ergänzung wurde eine relative Quantifizierung von Bakterien und Archaeen bzw. von einzelnen taxonomischen Gruppen innerhalb der methanogenen Archaeen mittels quantitativer *realtime* PCR (Q-PCR) durchgeführt.

Diese Studie liefert wesentliche Beiträge zum Verständnis der Struktur und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen. Die Ergebnisse der Studie wurden bislang auf fünf Fachvorträgen einem internationalen wissenschaftlichen Publikum vorgestellt (s. II.4). Die Veröffentlichung in wissenschaftlichen Fachzeitschriften ist für 2010 geplant. Alle im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Nukleotidsequenzen werden an die NCBI GenBank zur allgemeinen Verfügung übermittelt.

## II.3 Erkenntnisse von Dritten

Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene themenbezogene Publikationen anderer Arbeitsgruppen veröffentlicht. Eine molekulare Analyse der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasreaktoren betrieben unter Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen und Gällen wurde in folgenden Publikationen vorgestellt:

- (1) WANG H, TOLVANEN K, LEHTOMÄKI A, PUHAKKA J, RINTALA J (2010) Microbial community structure in anaerobic co-digestion of grass silage and cow manure in a laboratory continuously stirred tank reactor. *Biodegradation* 21:135-146.
- (2) LIU FH, WANG SB, ZHANG JS, ZHANG J, YAN X, ZHOU HK, ZHAO GP, ZHOU ZH (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
- (3) WANG H, LEHTOMÄKI A, TOLVANEN K, PUHAKKA J, RINTALA J (2009) Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure. *Biore-source Technol* 100:2311-2315.
- (4) DEMIREL B, NEUMANN L, SCHERER P (2008) Microbial community dynamics of a continuous mesophilic anaerobic biogas digester fed with sugar beet silage. *Eng Life Sci* 8:390-398
- (5) KROBER M, BEKEL T, DIAZ NN, GOESMANN A, JAENICKE S, KRAUSE L, MILLER D, RUNTE KJ, VIEHOVER 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 Biotechnol* 142:S38-S49

Im Unterschied zu dieser Studie untersuchten die zitierten Arbeiten vorrangig Co-Fermentationen. Ebenfalls unterschiedlich war der experimentelle Ansatz, die zitierten Arbeiten nutzten vorrangig DGGE, T-RFLP und mikroskopische Verfahren anstelle der direkten Sequenzanalyse. Besonders interessant ist der Ansatz einer Arbeitsgruppe der Universität Bielefeld zur Erfassung des Metagenoms einer Biogasreaktorprobe [Krober et al. 2009].

## II.4 Veröffentlichungen

Einzelne Teilaspekte der Arbeiten wurden im Rahmen von folgenden Fachvorträgen (mit Einladung durch den Veranstalter) vorgestellt:

- (1) KLOCKE M (2010) Microbial communities in biogas plants. CeBiTec Kolloquium, Bielefeld, 11. Januar 2010.
- (2) KLOCKE M (2009) Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Biogasreaktoren. Fachkolloquium Hochschule Aachen, Institut für Nano- und Biotechnologien, Jülich, 6. Oktober 2009.
- (3) KLOCKE M, NETTMANN E (2009) Mikrobielle Diversität in Biogasreaktoren bei der Vergärung von Nachwachsenden Rohstoffen. Internationale Fachtagung Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven, Weimar, 15.-16. September 2009.
- (4) KLOCKE M, SCHÖNBERG M, LINKE B (2009) Vergärung von Roggen-Ganzpflanzensilage - Verfahrenstechnische und mikrobiologische Charakterisierung eines zweistufigen Bioleaching-Prozesses. Fachtagung Biogas-Crops-Network Symposium, Potsdam, Germany, 7. Mai 2009.
- (5) KLOCKE M (2008) Diversity and abundance of methanogenic Archaea in biogas reactors. Internationale Fachtagung 3<sup>rd</sup> CeBiTec Symposium Solar Bio-Fuels 2008, Bielefeld, 12.-14. August 2008.

## Anhänge

- Anhang 1: Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil A ermittelten taxonomischen Einheiten
- Anhang 2: Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil B ermittelten taxonomischen Einheiten
- Anhang 3: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A1 ermittelten OTUs
- Anhang 4: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A2 ermittelten OTUs
- Anhang 5: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Bacteria
- Anhang 6: Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Archaea

## Anhang 1

**Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil A ermittelten taxonomischen Einheiten**

Alle Sequenzen wurden mittels des Software-Paketes ARB [LUDWIG *et al.* 2004] taxonomisch in Relation zu bekannten Typenstämmen gesetzt. Hierfür wurden folgende zwei Algorithmen angewandt: (1) Ermittlung der evolutionären Distanzen mit der Kimura-2-Parameter-Methode [KIMURA 1980], Konstruktion des Stammbaums nach der Neighbor-Joining-Methode [SAITOU & NEI 1987], *Bootstrap*-Test mit 100 Wiederholungen [FELSENSTEIN 1985]; (2) Konstruktion des Stammbaums nach der Maximum-Parsimony-Methode [ECK & DAYHOFF 1966].

In den folgenden Abbildungen sind die in dieser Studie ermittelten taxonomischen Einheiten bzw. die Nukleotidsequenzen für das 16S rRNA Gen mit „OTU“ markiert. Für die Referenzsequenzen bzw. -organismen wurde in eckigen Klammern die Akzessionsnummer der NCBI GenBank angegeben. Der Größenmaßstab repräsentiert die evolutionäre Distanz. Zahlen an den Knoten repräsentieren den Anteil der Replikate der *Bootstrap*-Analyse an dem Konsensusbaum, auf die Darstellung kleinerer Werte als 50 wurde verzichtet. Die *Outgroup* ist mit einem Stern markiert.

Die taxonomische Einordnung erfolgt nach dem System von Bergey's Manual, in Einzelfällen wurde hilfsweise auf das taxonomische System der NCBI GenBank zurückgegriffen.

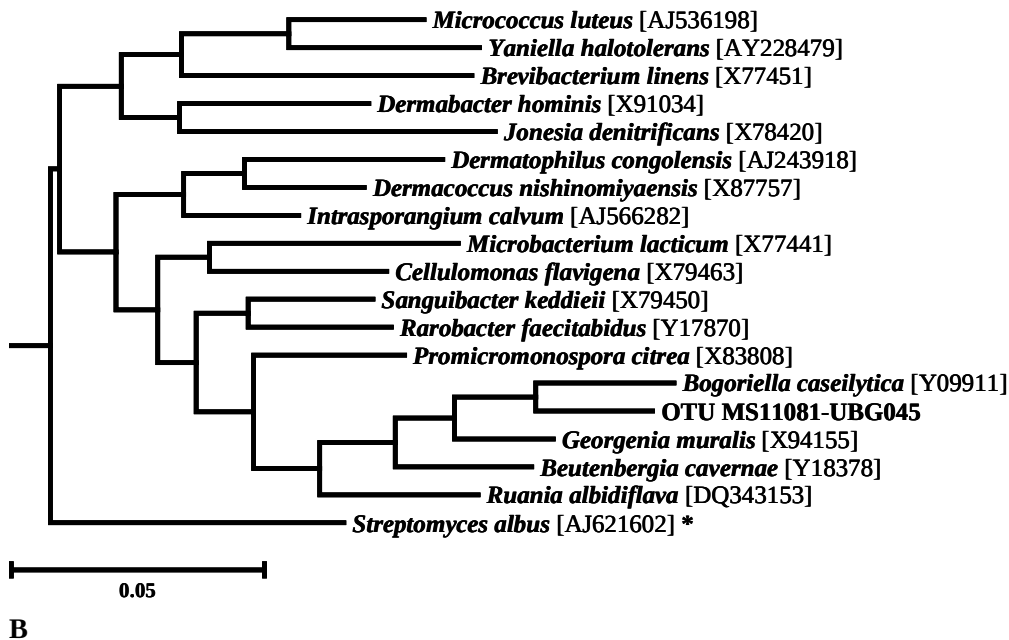
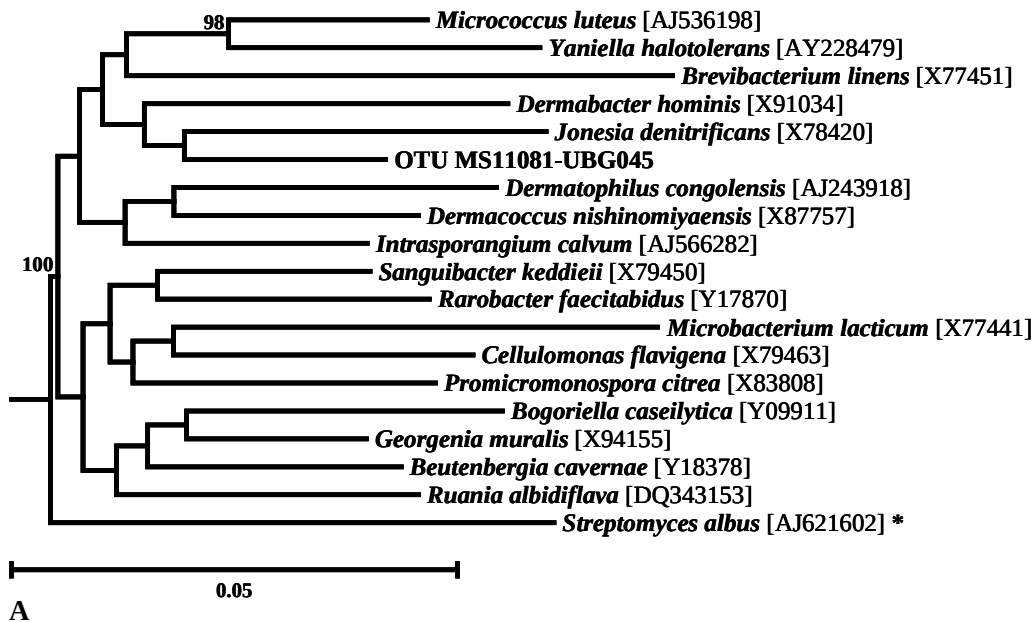


Abb. A-1: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm und Klasse **Actinobacteria**, Ordnung **Actinomycetales**, Unterordnung **Micrococcineae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

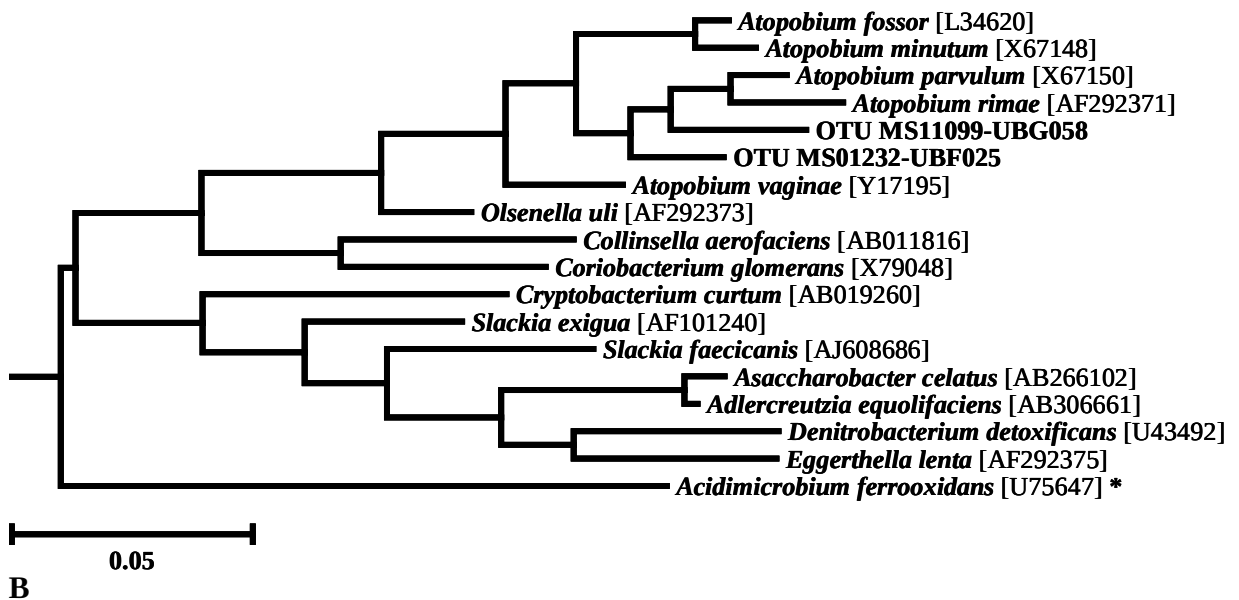
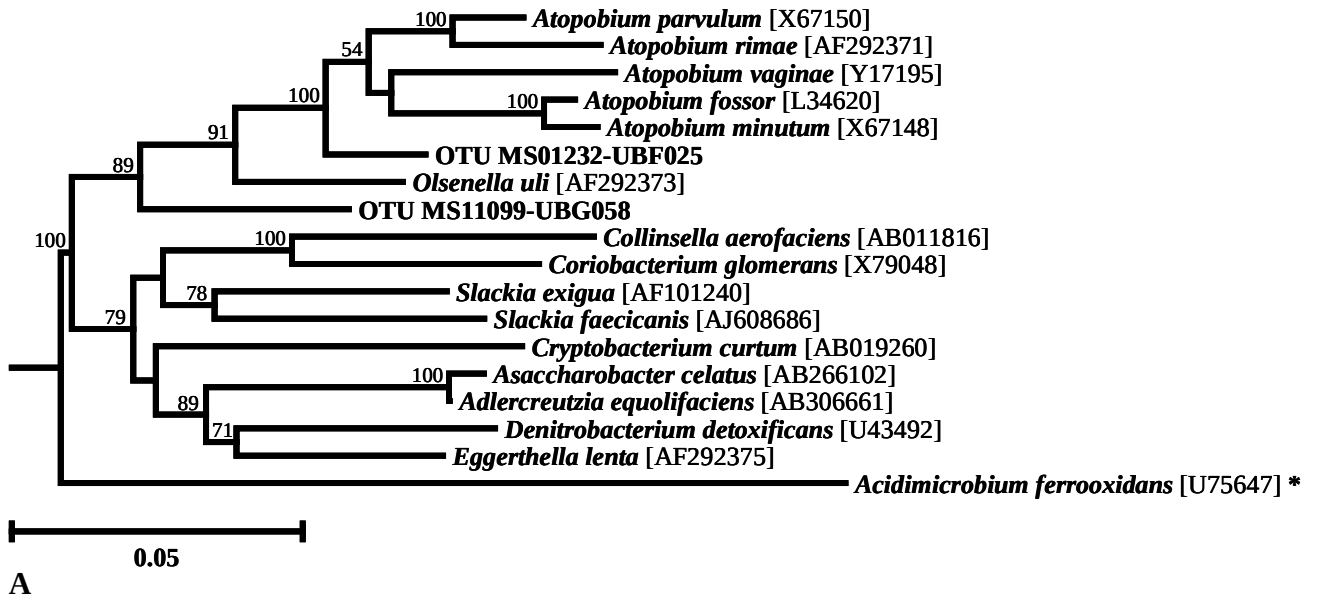


Abb. A-2: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm und Klasse **Actinobacteria**, Ordnung **Coriobacteriales**, Familie **Coriobacteriaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

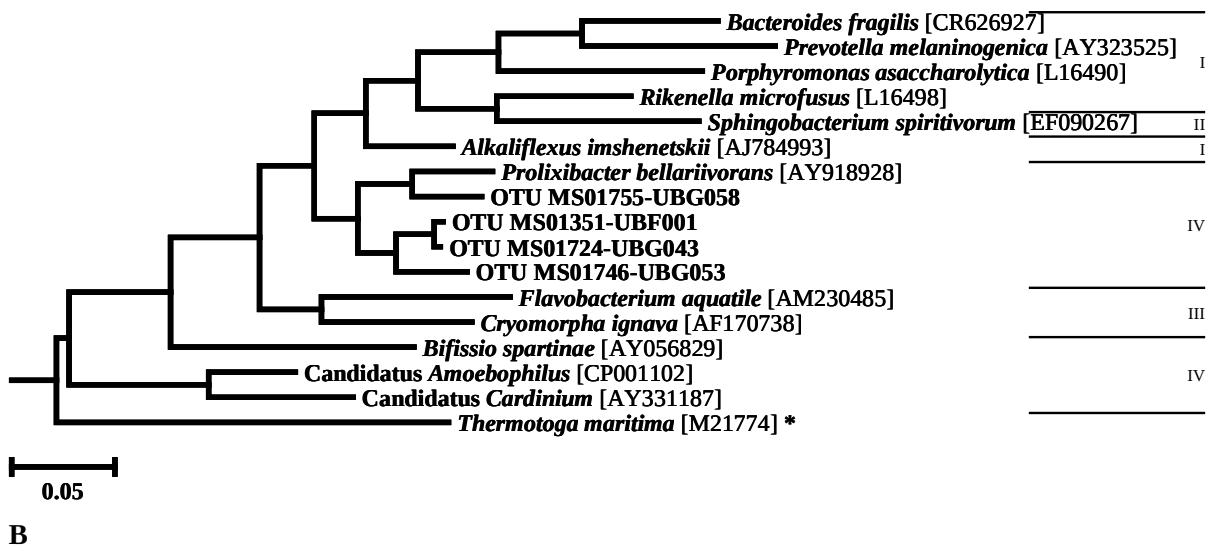
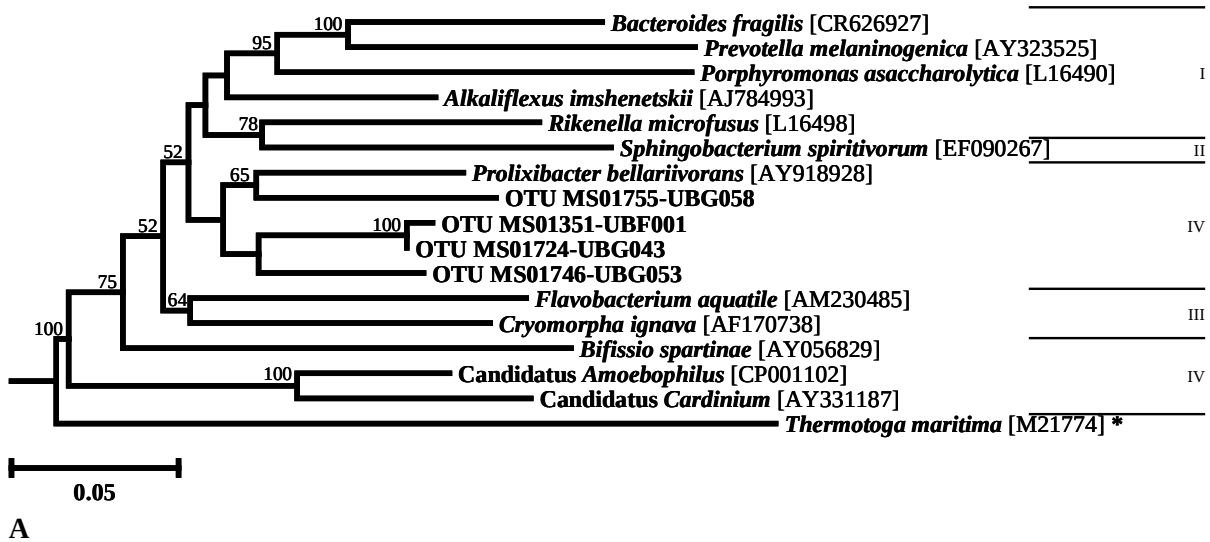


Abb. A-3: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**. I: Klasse Bacteroidia; II: Klasse Sphingobacteria; III: Klasse Flavobacteria; IV: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Bacteroidetes. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

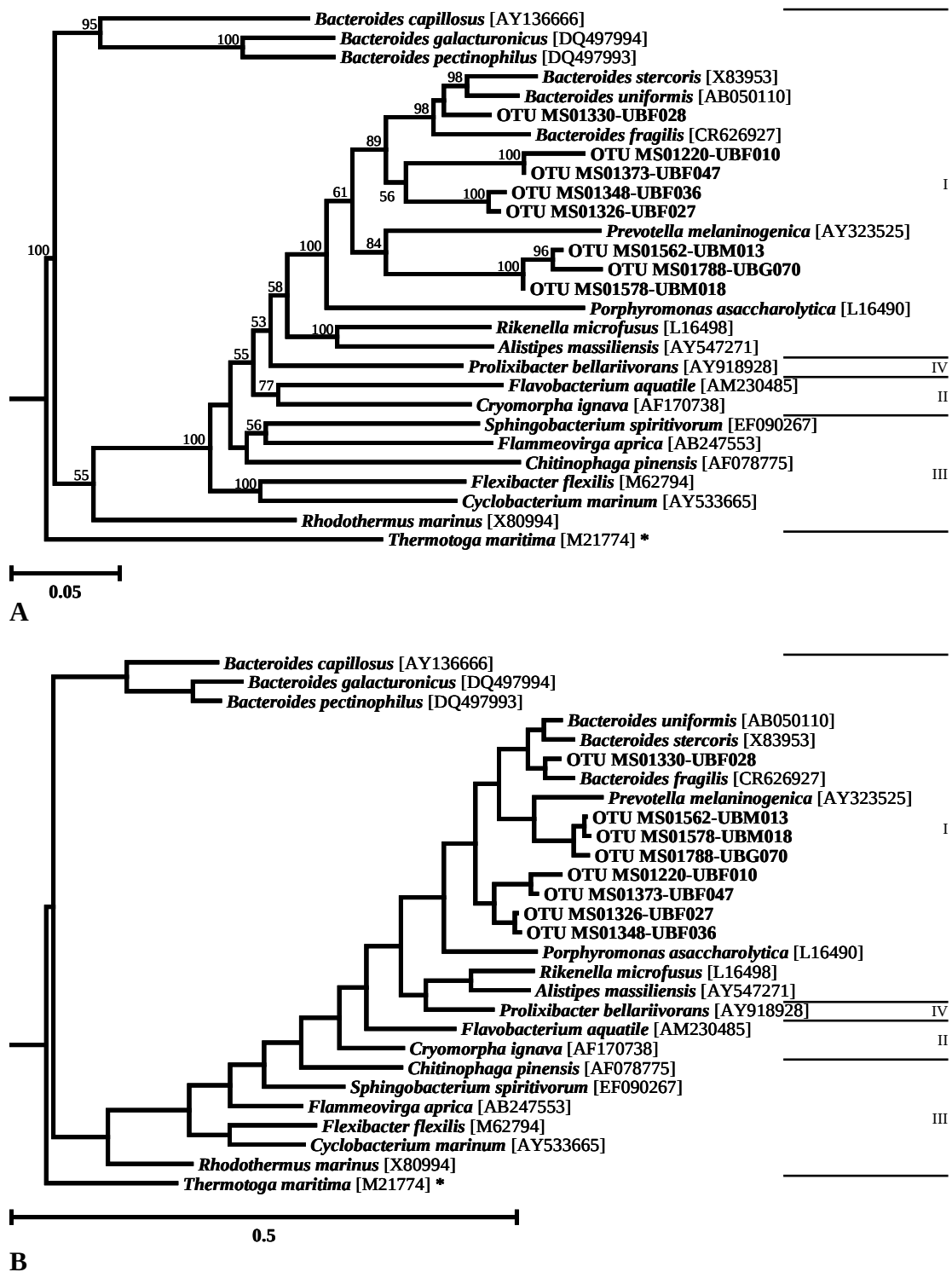


Abb. A-4: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**. I: Klasse Bacteroidia, Ordnung Bacteroidales; II: Klasse Flavobacteria, Ordnung Flavobacteriales; III: Klasse Sphingobacteria, Ordnung Sphingobacteriales; IV: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Bacteroidetes. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

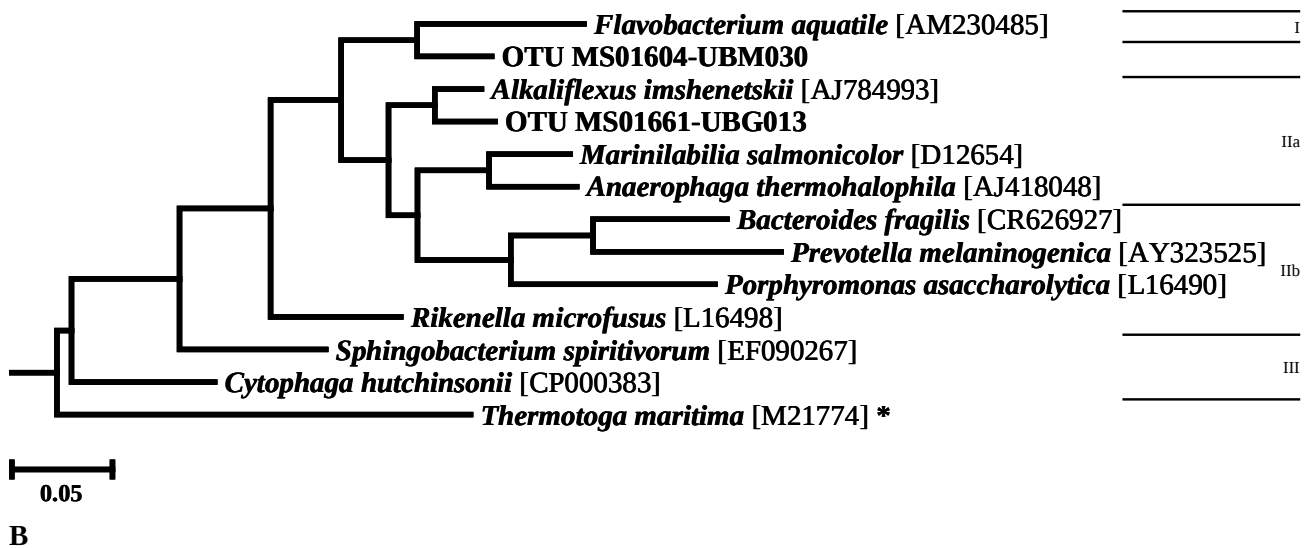
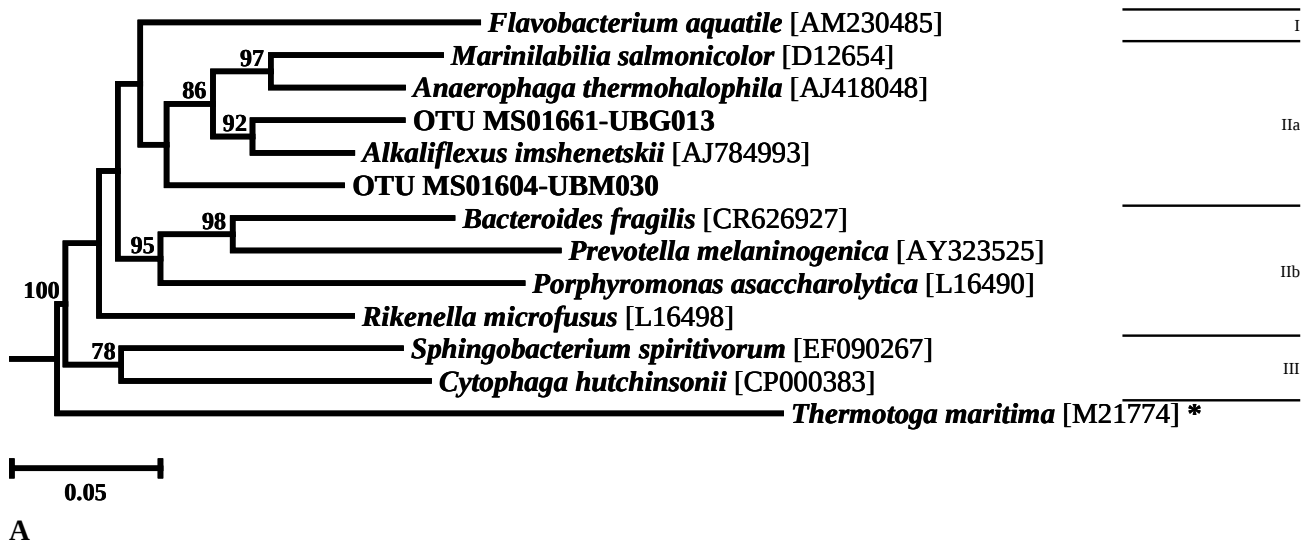


Abb. A-5: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**. I: Klasse Flavobacteria, Ordnung Flavobacteriales; II: Klasse Bacteroidia, Ordnung Bacteroidales (IIa: Familie Marinilabiaceae, IIb: übrige Familien); III: Klasse Sphingobacteria, Ordnung Sphingobacteriales. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

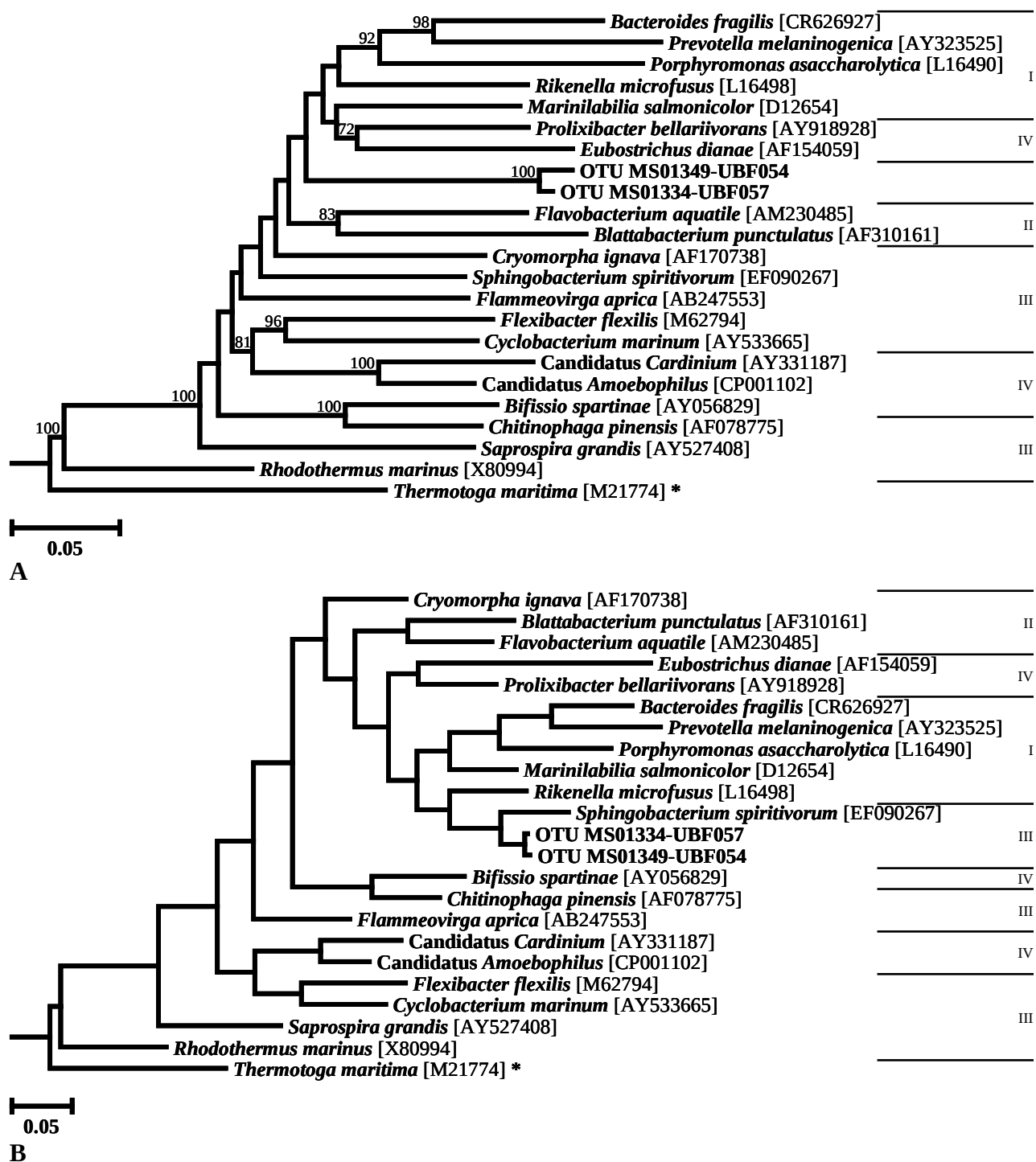
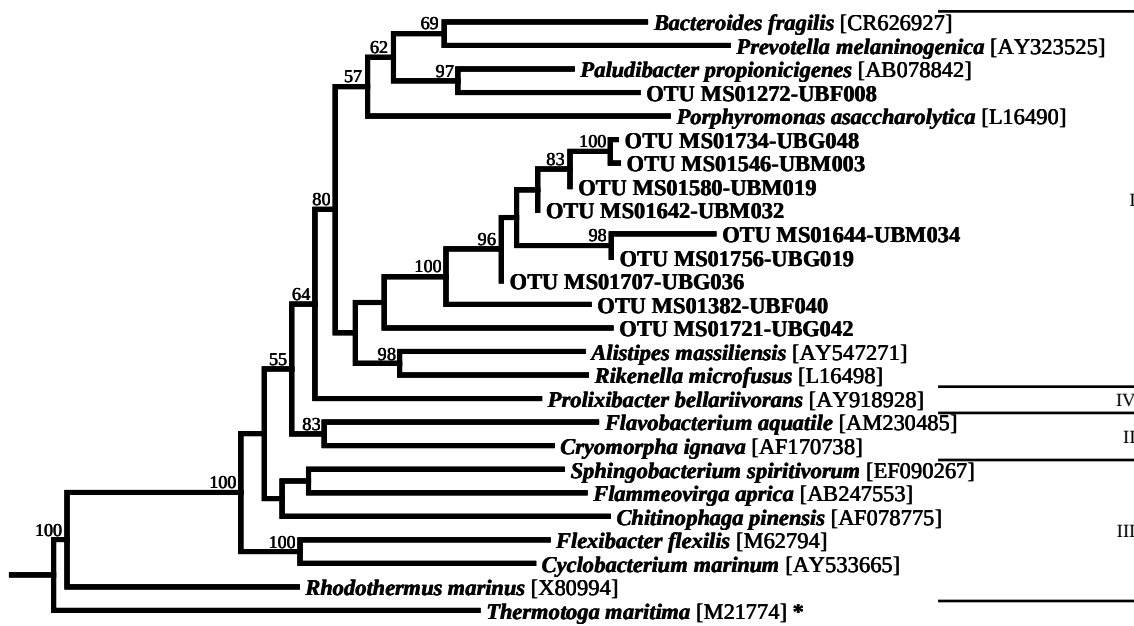
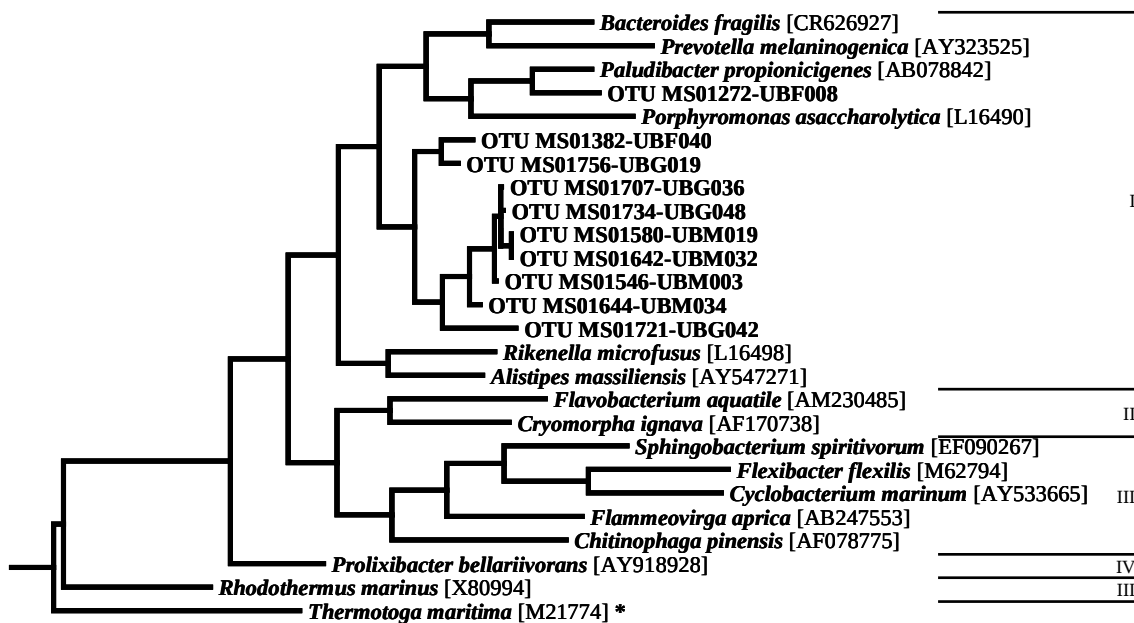


Abb. A-6: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**. I: Klasse Bacteroidia, Ordnung Bacteroidales; II: Klasse Flavobacteria, Ordnung Flavobacteriales; III: Klasse Sphingobacteria, Ordnung Sphingobacteriales; IV: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Bacteroidetes. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

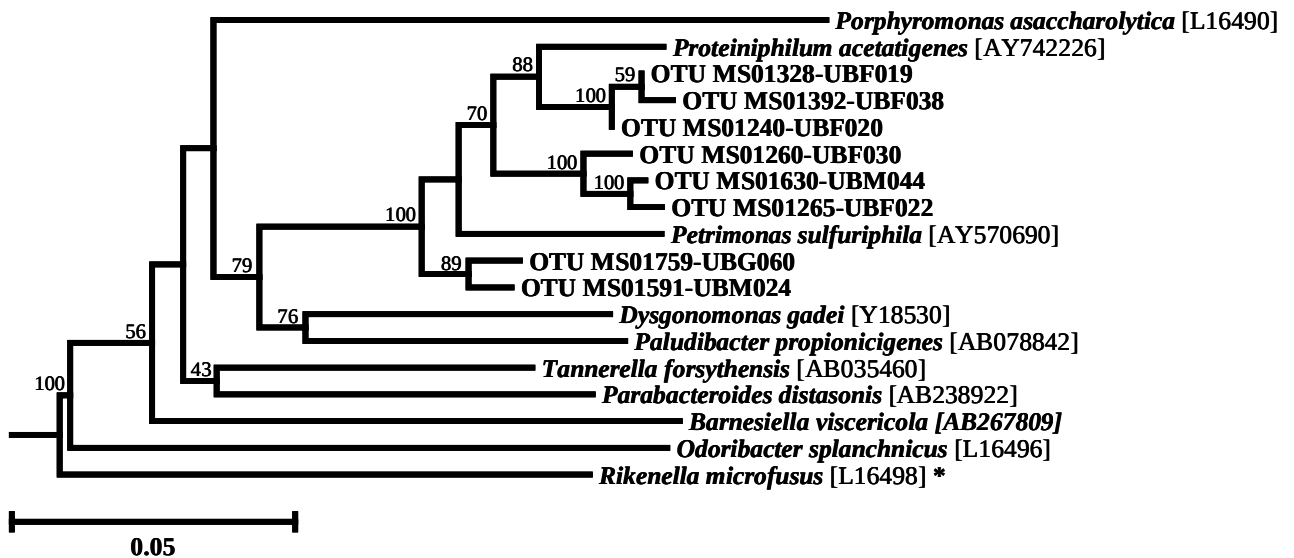


A

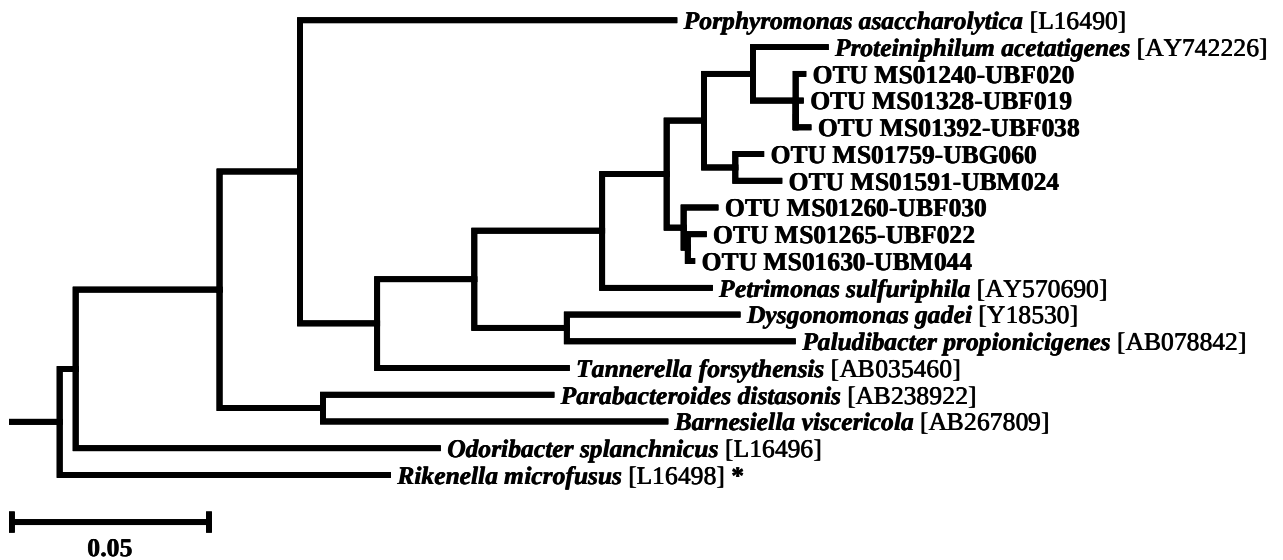


B

Abb. A-7: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**. I: Klasse Bacteroidia, Ordnung Bacteroidales; II: Klasse Flavobacteria, Ordnung Flavobacteriales; III: Klasse Sphingobacteria, Ordnung Sphingobacteriales; IV: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Bacteroidetes. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

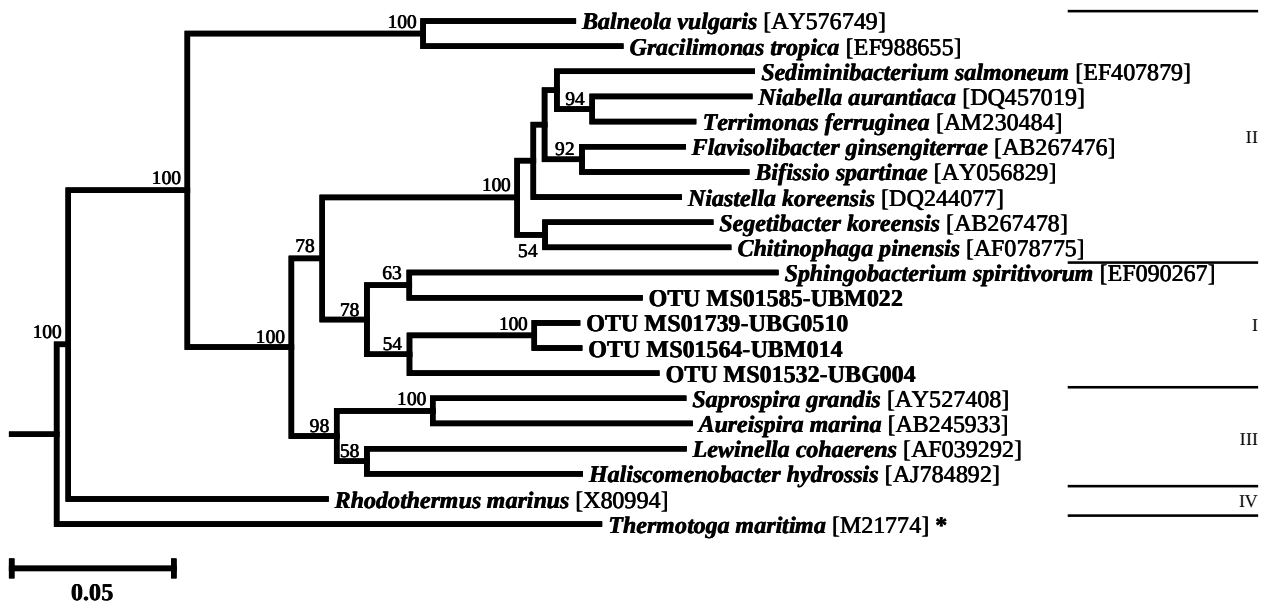


A

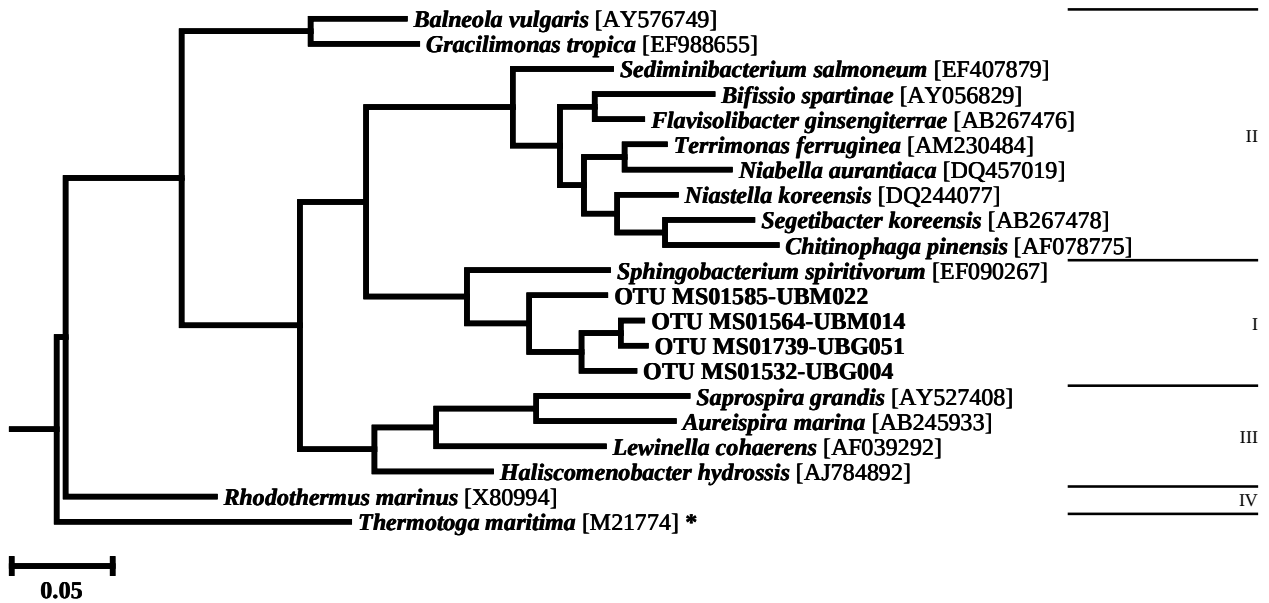


B

Abb. A-8: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**, Klasse **Bacteroidia**, Ordnung **Bacteroidales**, Familie **Porphyromonadaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-9: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Bacteroidetes**, Klasse **Sphingobacteria**, Ordnung **Sphingobacteriales**. I: Familie Sphingobacteriaceae; II: Familie Chitinophagaceae; III: Familie Saprospiraceae; IV: Rhodothermaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

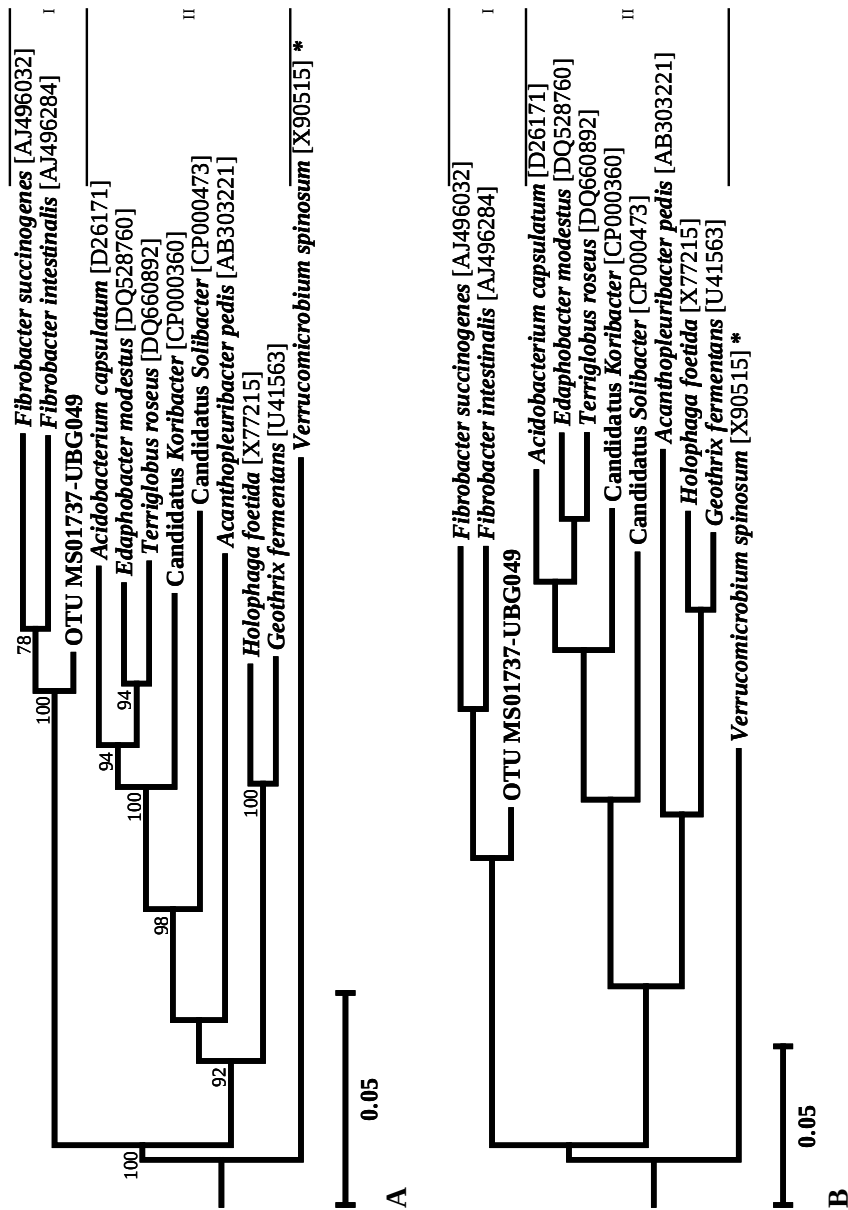


Abb. A-10: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für die **Fibrobacteres / Acidobacteria Gruppe**. I: Stamm und Klasse Fibrobacteres, Ordnung Fibrobacterales, Familie Fibrobacteraceae, Gattung Fibrobacter (komplett); II: Stamm Acidobacteria. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

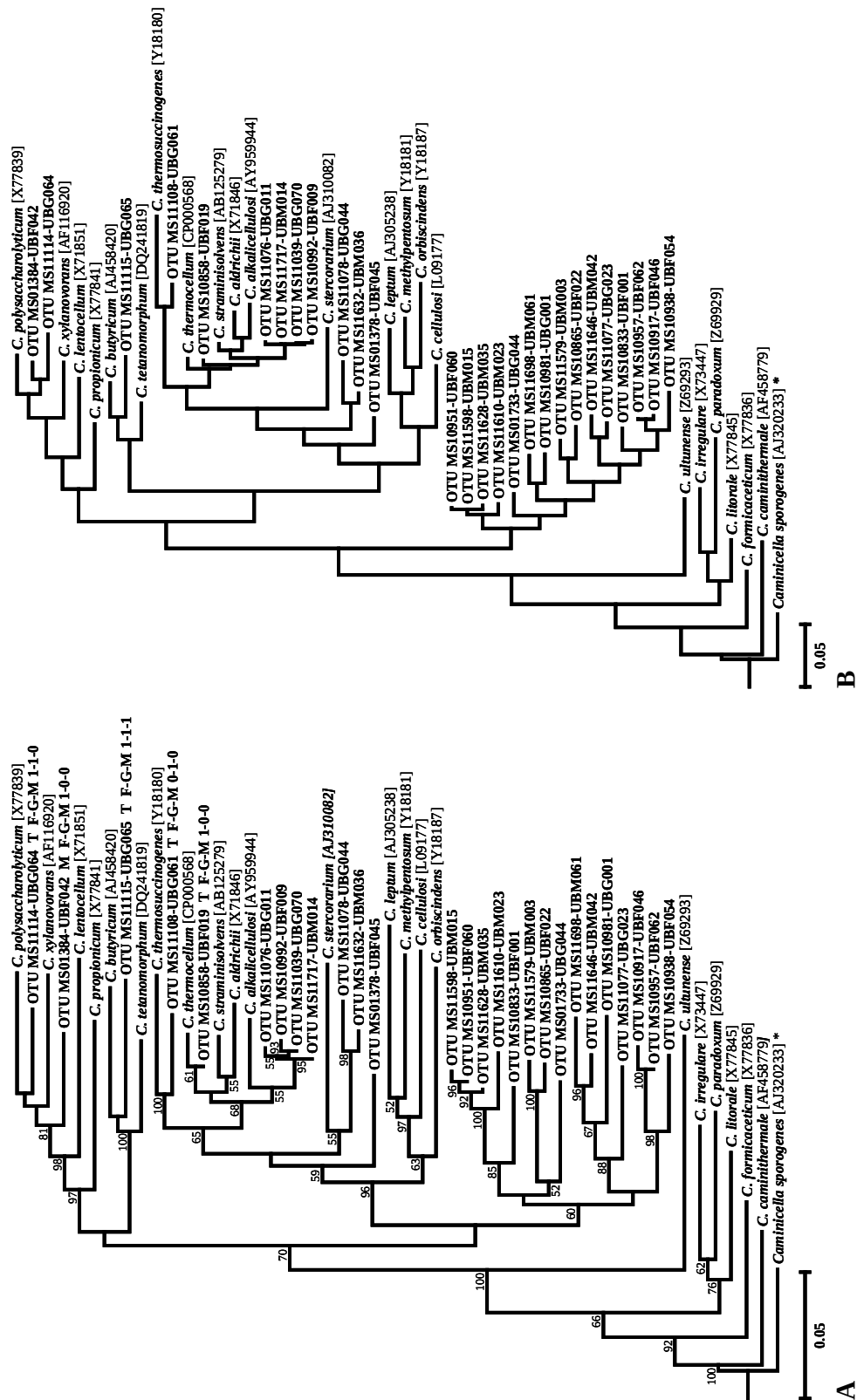


Abb. A-11: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Clostridiaceae**, Gattung **Clostridium**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

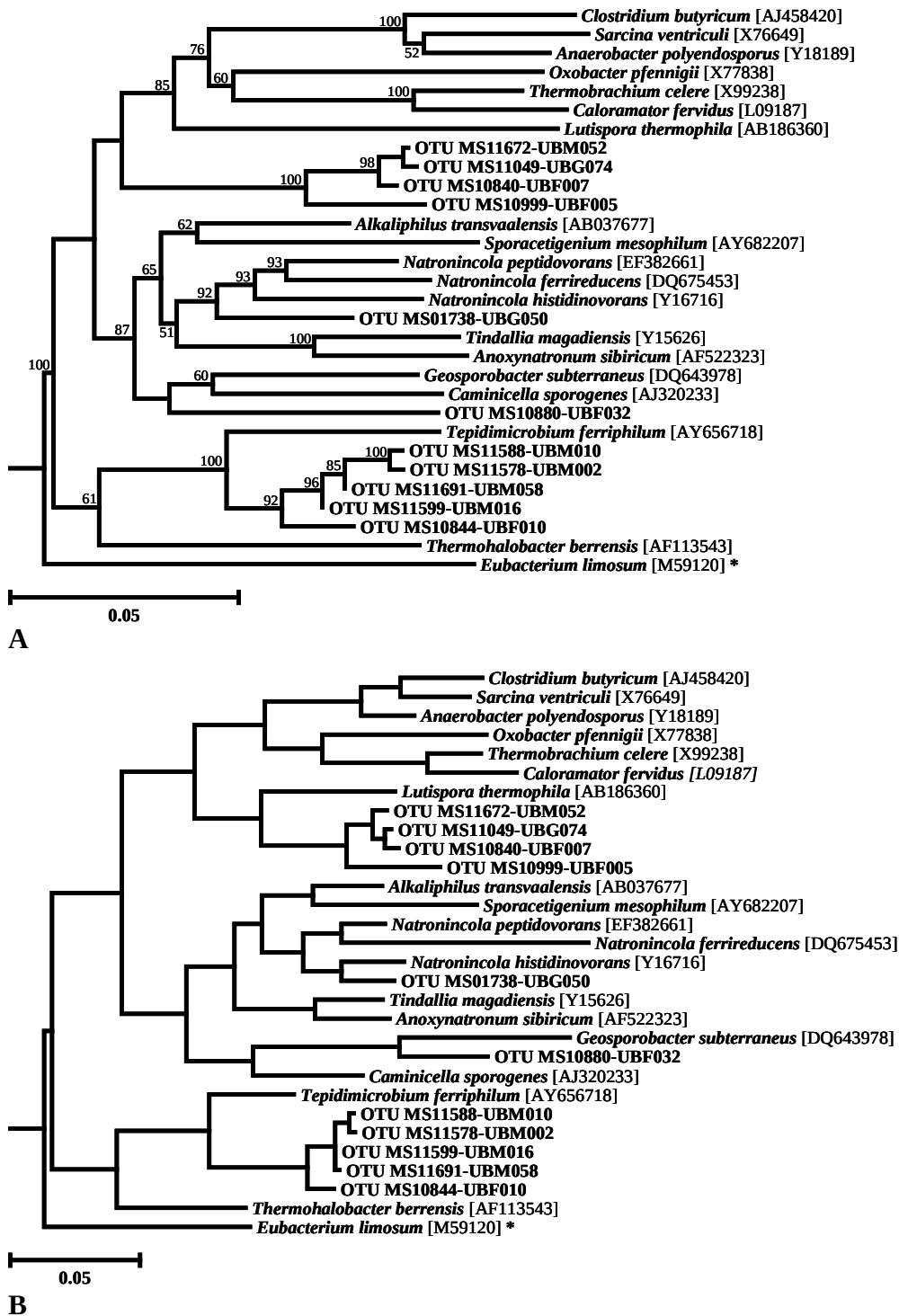


Abb. A-12: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Clostridiaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

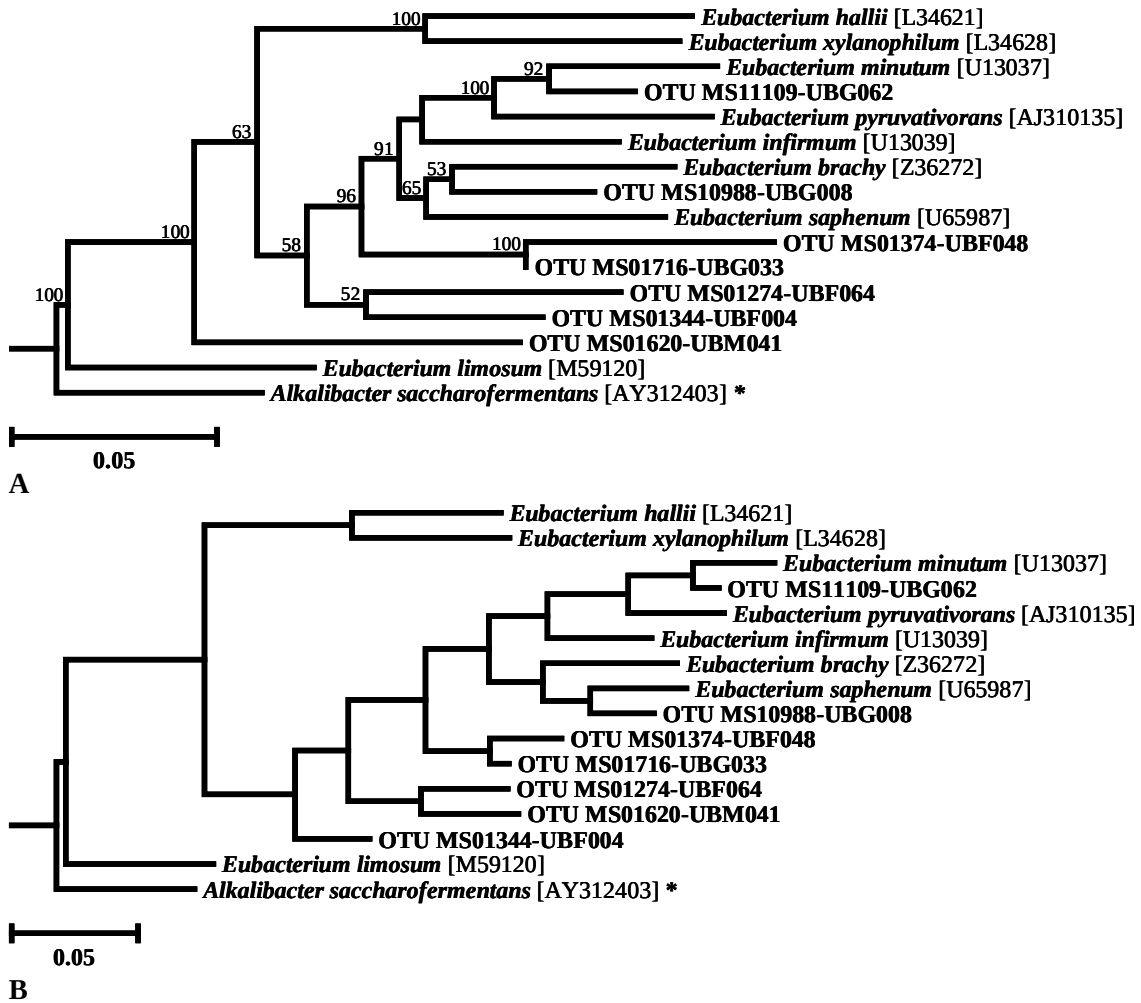
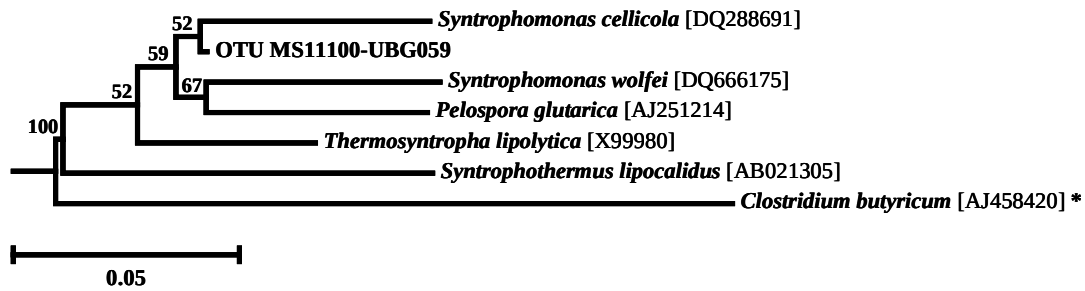


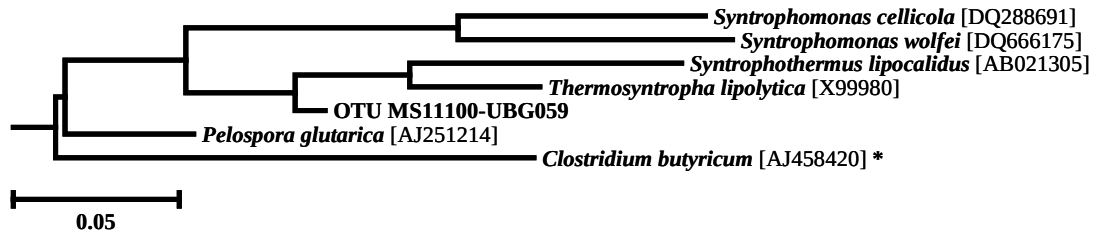
Abb. A-13: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Eubacteriaceae**, Gattung **Eubacterium**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



Abb. A-14: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Peptococcaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-15: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Syntrophomonadaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

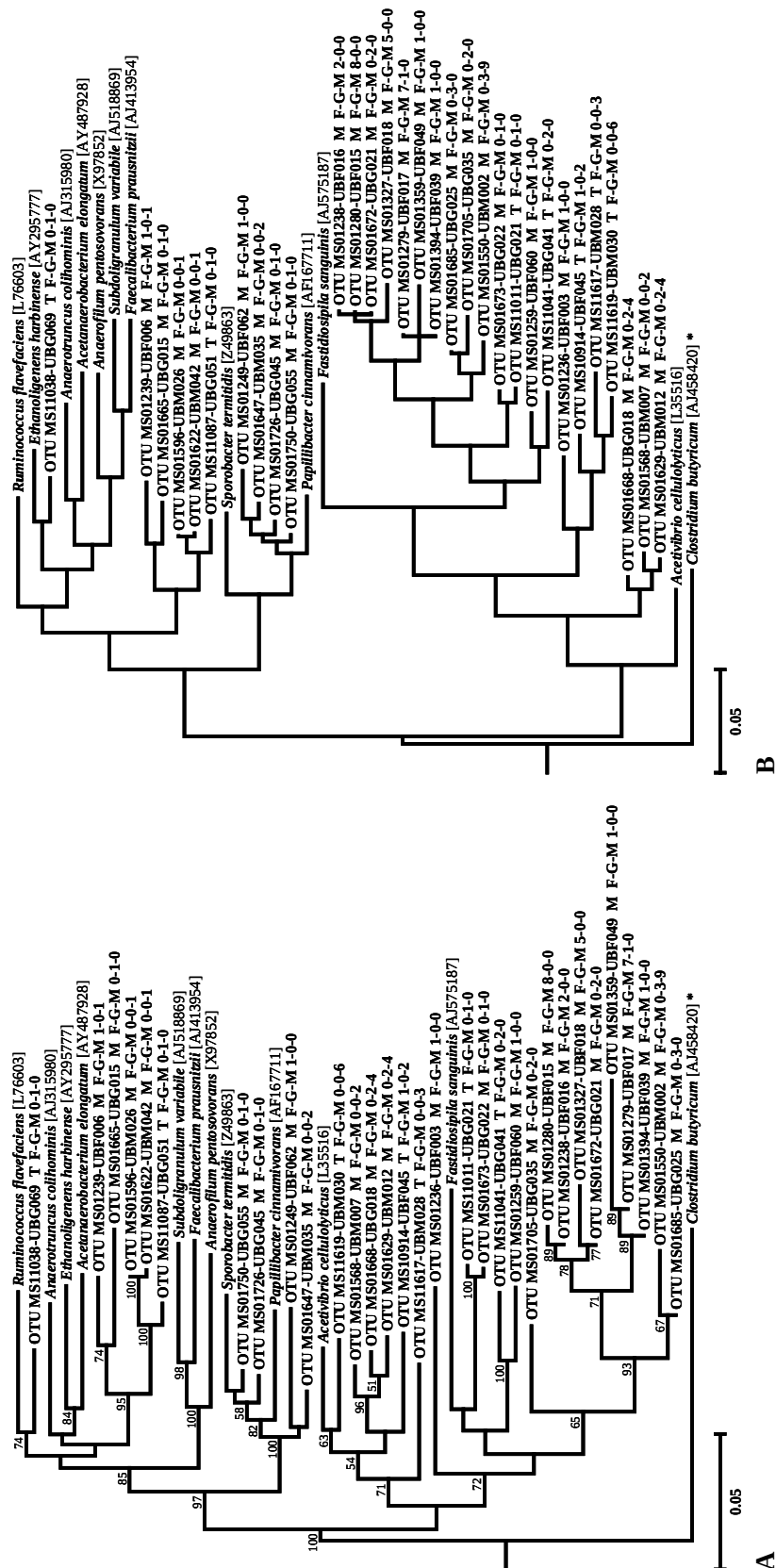


Abb. A-16: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Ruminococcaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

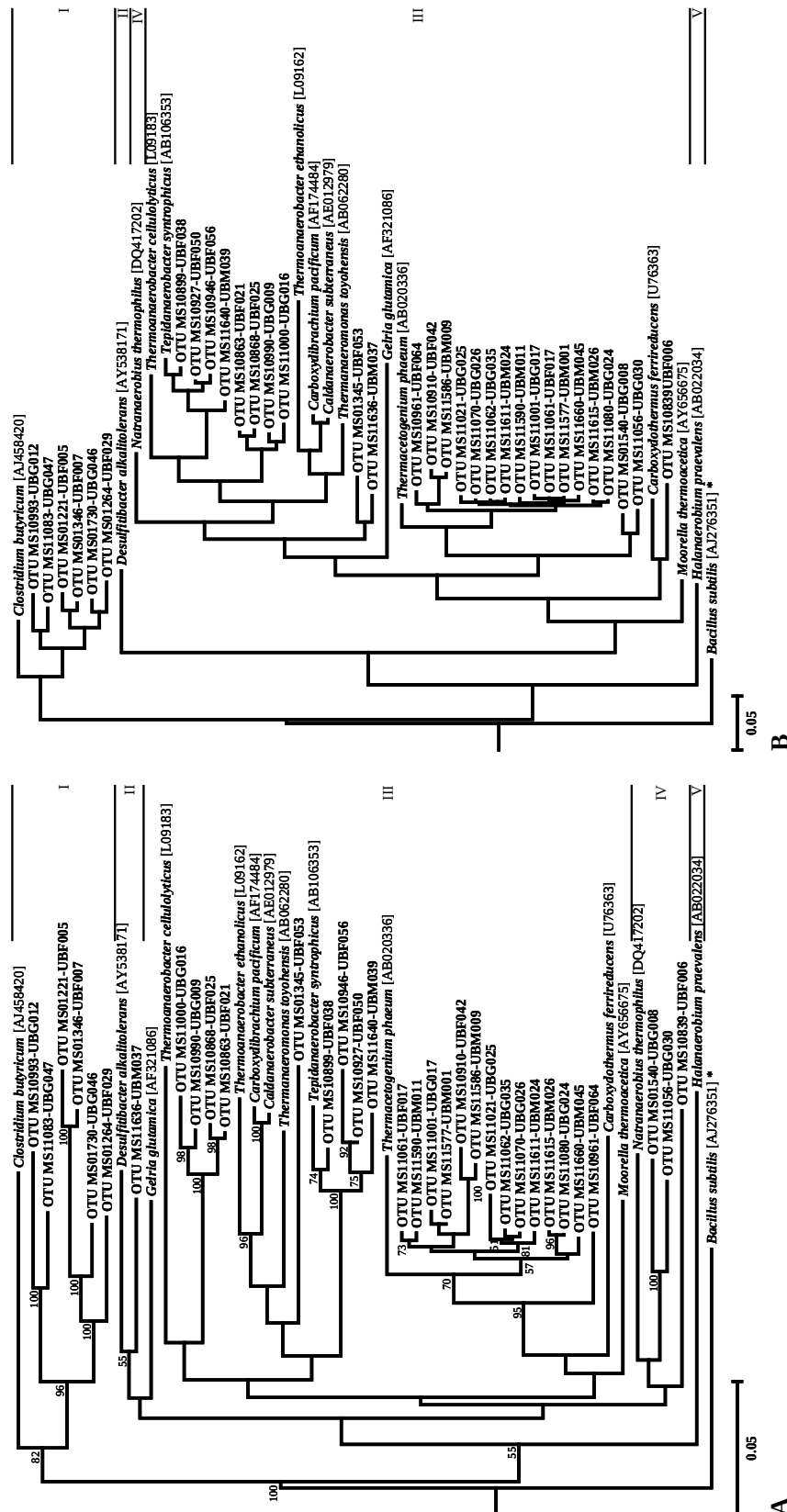


Abb. A-17: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**. I: Ordnung Clostridiales; II: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Clostridia; III: Ordnung Thermoanaerobacterales; IV: Ordnung Natranaerobiales; V: Ordnung Halanaerobiales. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

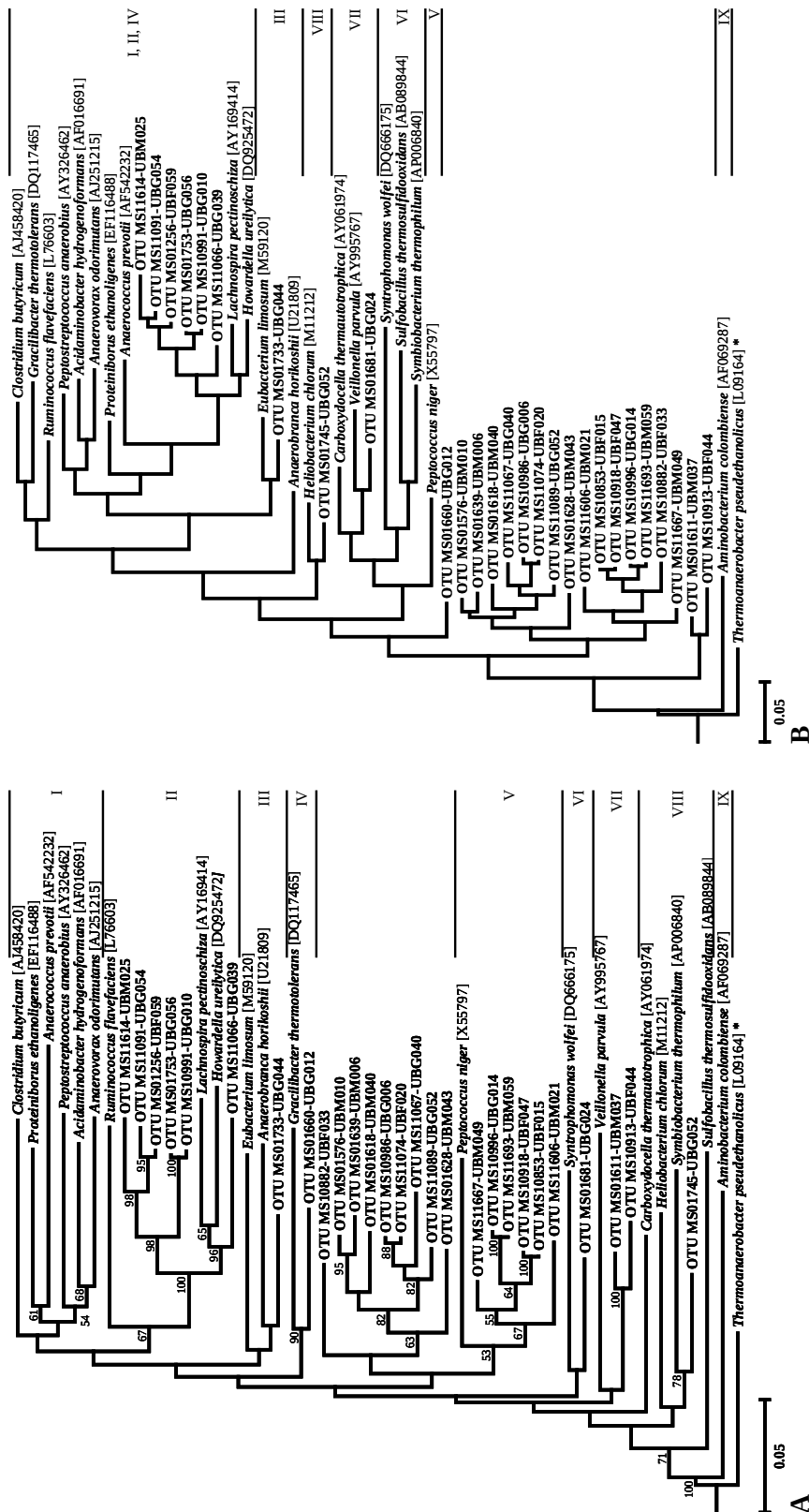
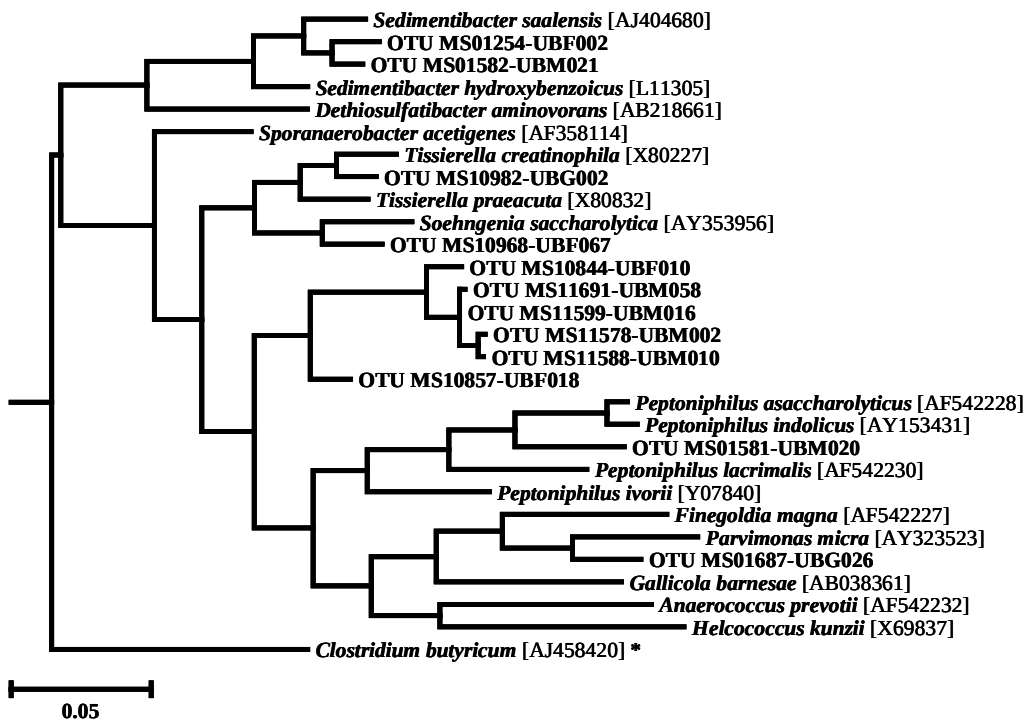
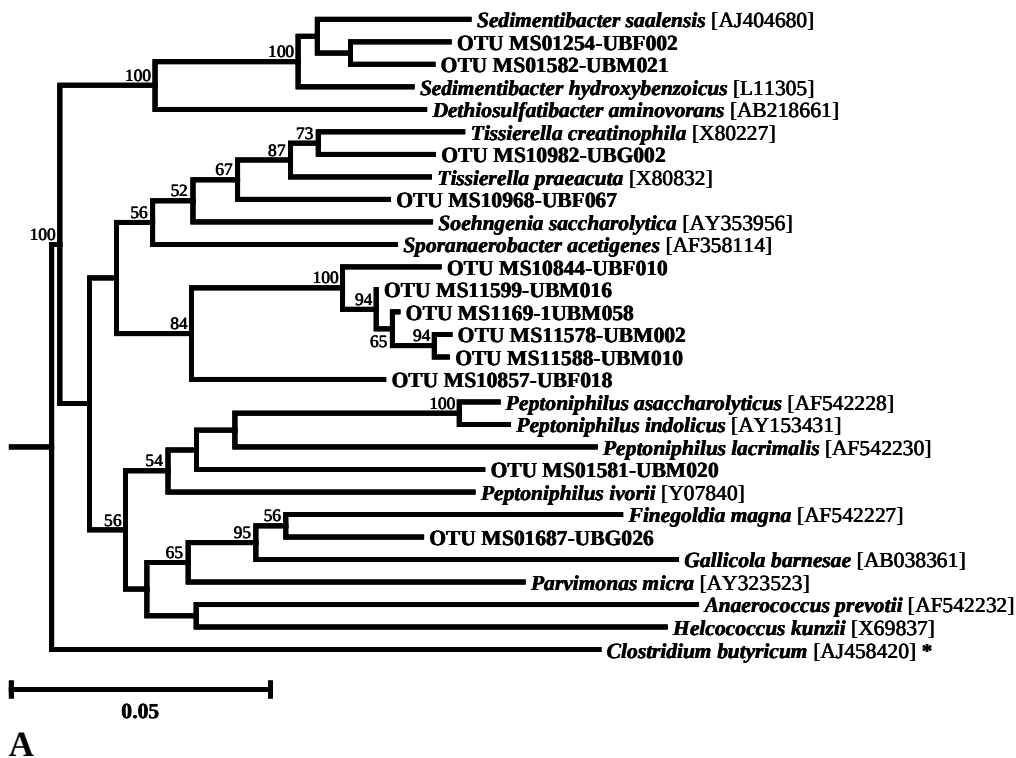
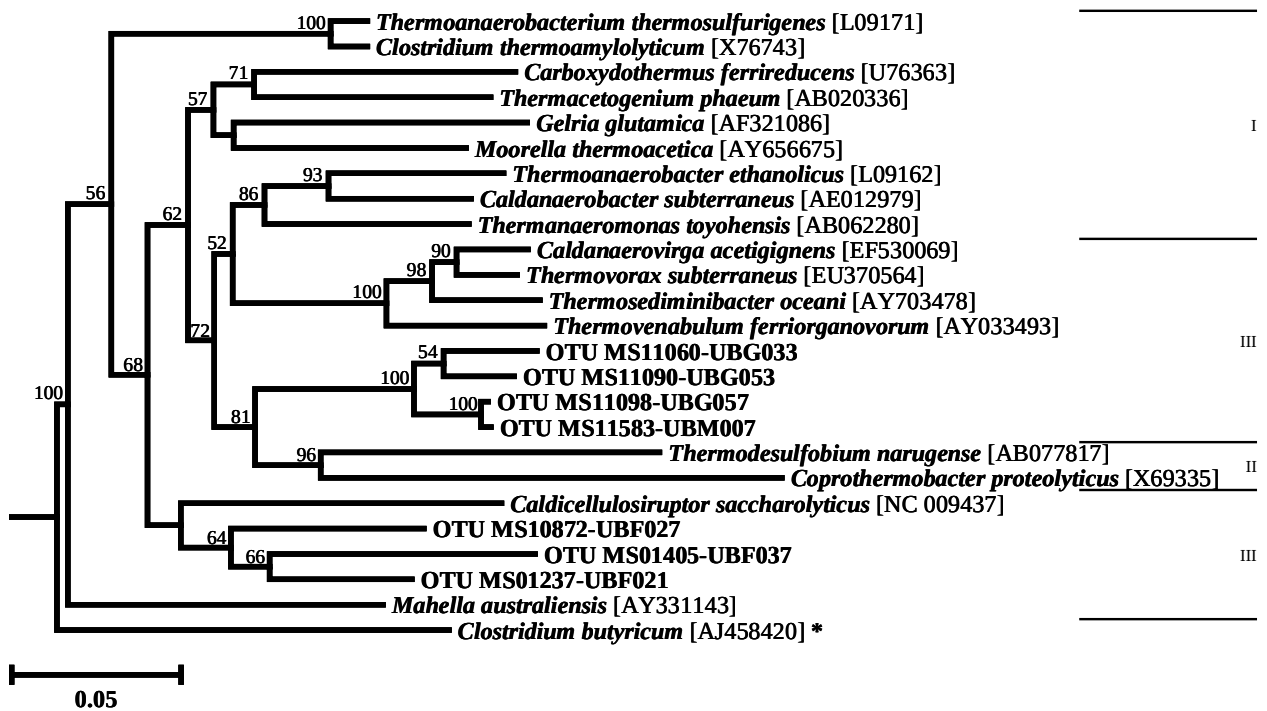


Abb. A-18: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales** (I-VIII). I: Familien Clostridiaceae und Peptostreptococcaceae; II: Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae; III: Familie Eubacteriaceae; IV: Familie Gracilbacteraceae; V: Familie Peptococcaceae; VI: Familie Syntrophomonadaceae; VII: Familie Veillonellaceae; VIII: Familie Hellobacteriaceae. Bei jeder Gruppe sind zusätzlich verschiedene, bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Clostridia aufgeführt. Zum Vergleich ist die Relation zu Stamm Synergistetes dargestellt (IX).

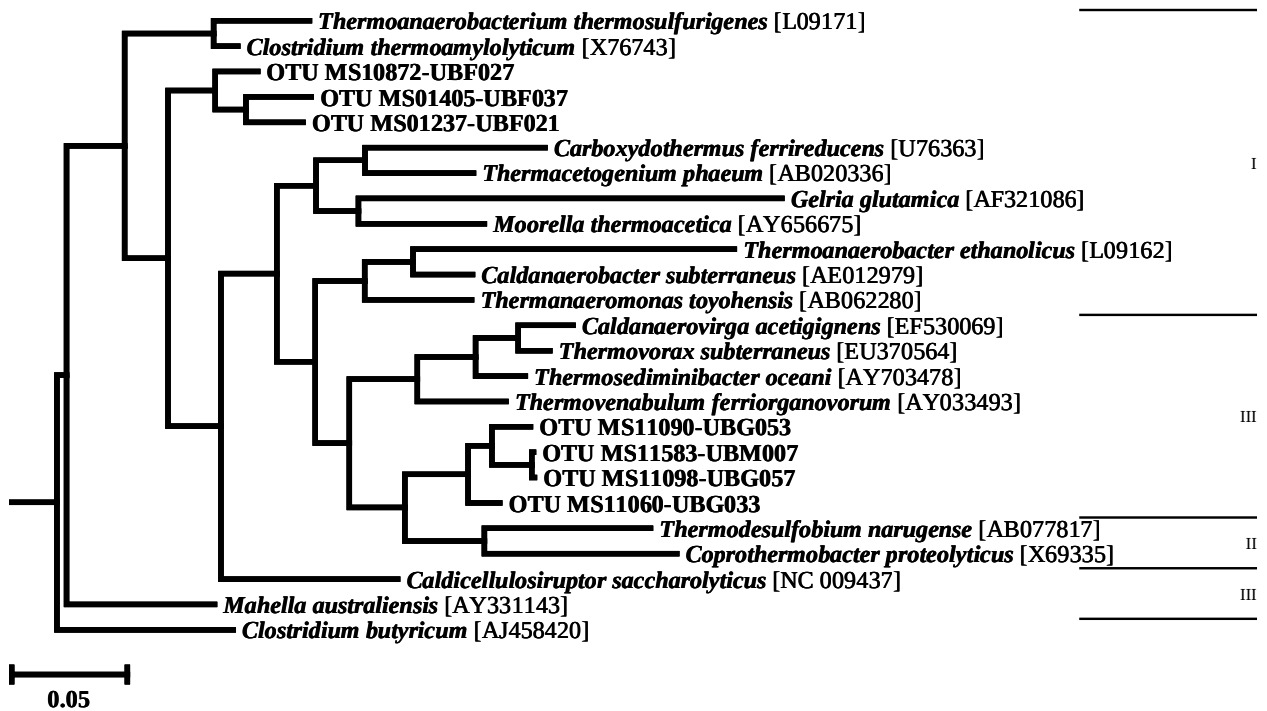


B

Abb. A-19: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, **Clostridiales incertae sedis**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-20: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**. I: Ordnung Thermoanaerobacterales; II: Ordnung Thermodesulfobiales; III: bislang nicht näher klassifizierte Angehörige der Klasse Clostridia. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

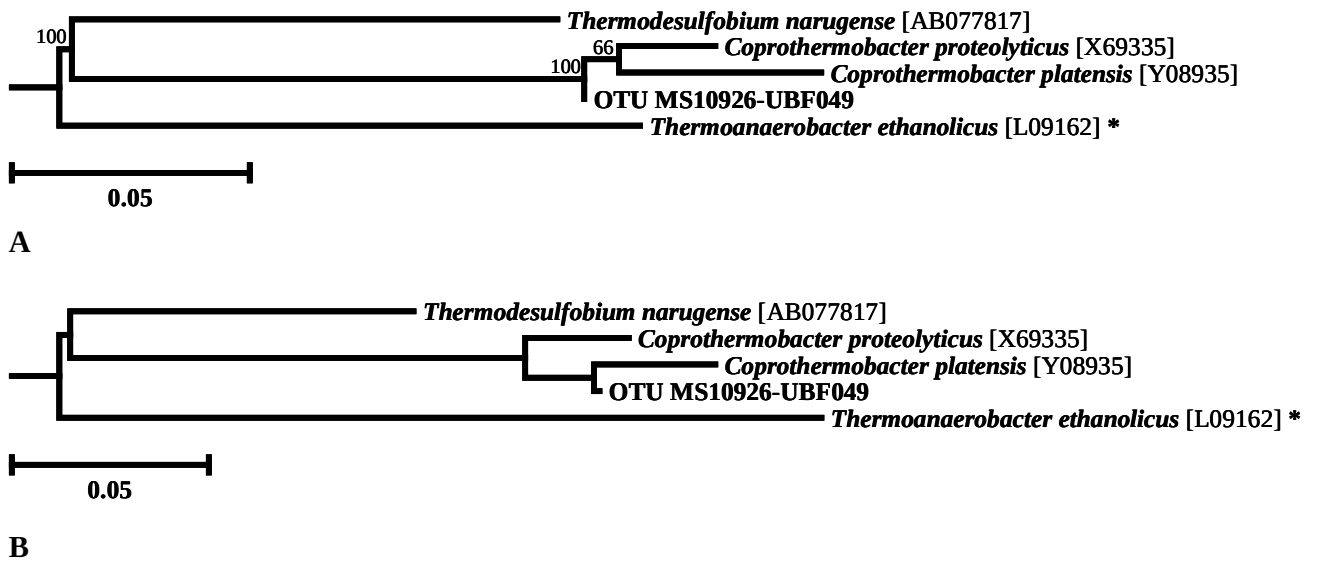
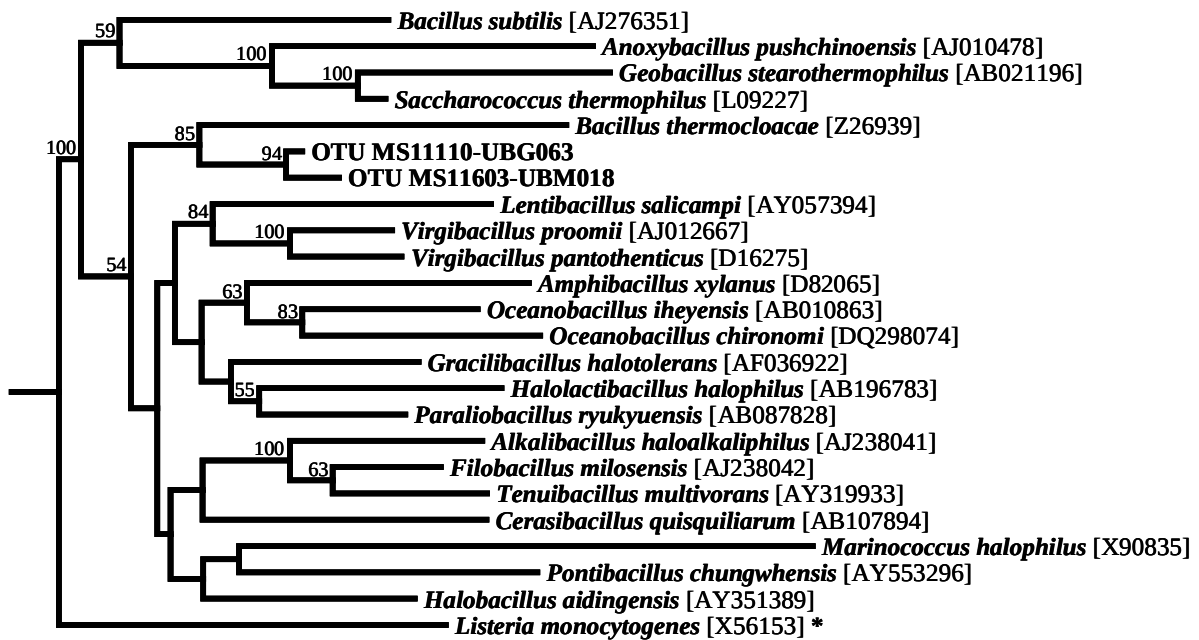
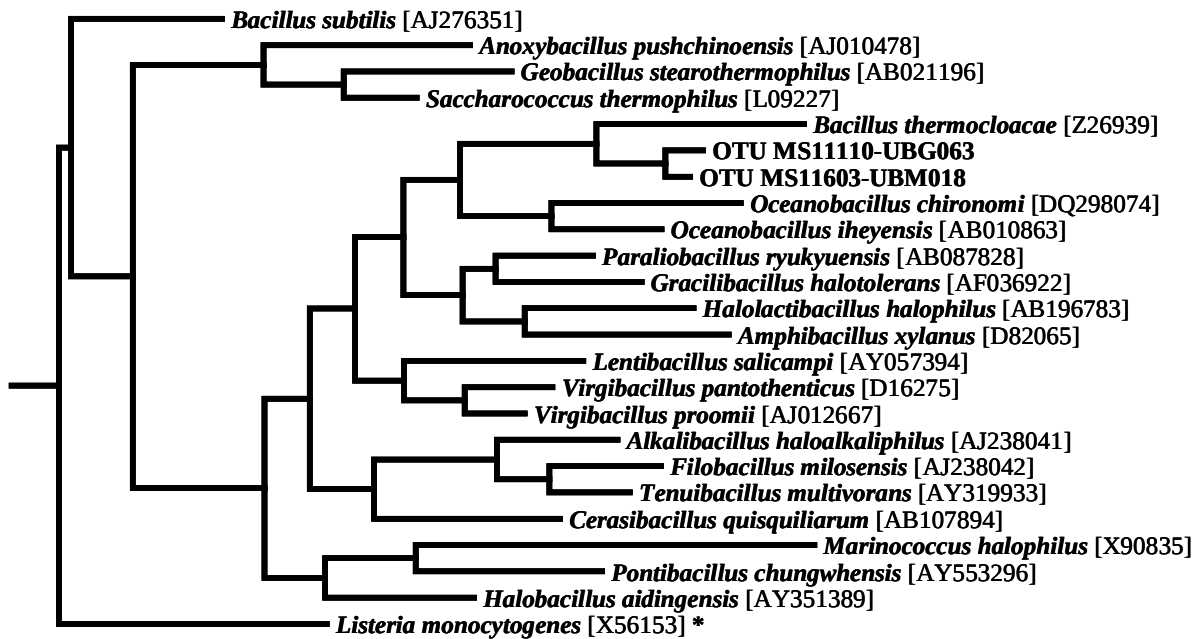


Abb. A-21: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacterales**, Familie **Thermodesulfobiaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-22: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Bacillales**, Familie **Bacillaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

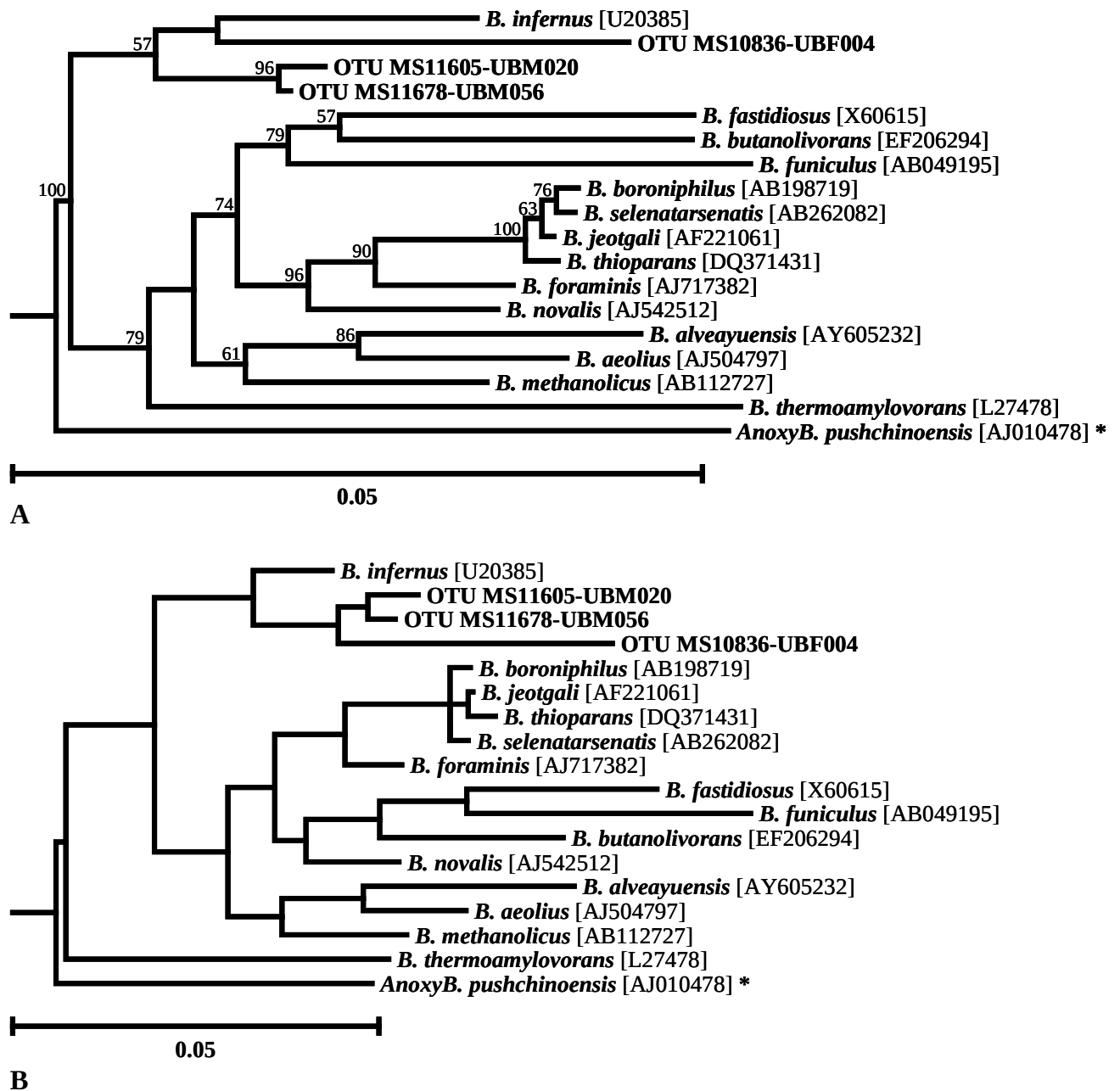
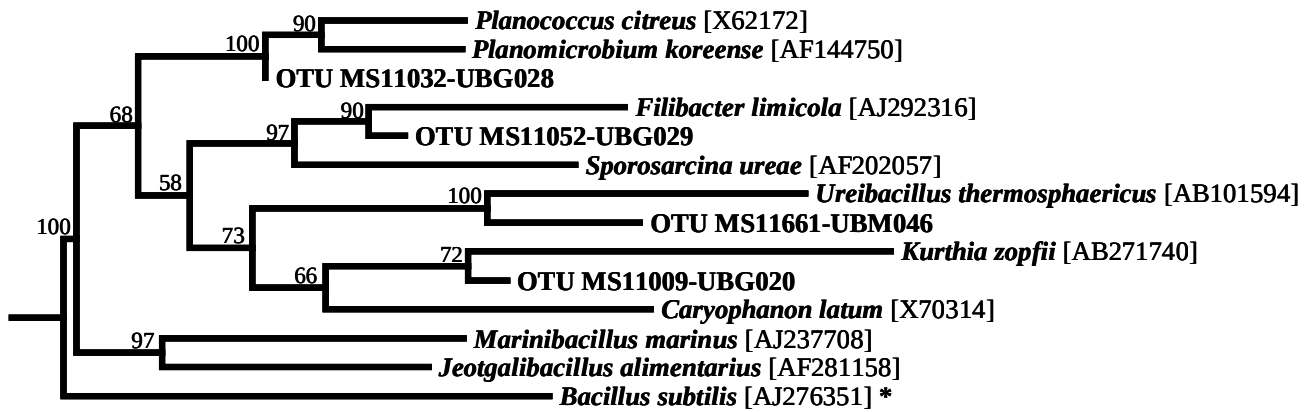
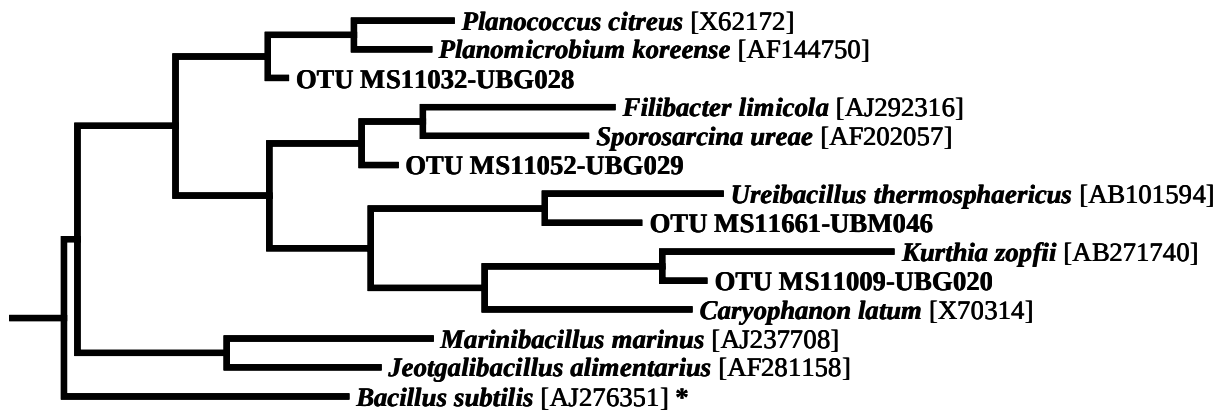


Abb. A-23: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Bacillales**, Familie **Bacillaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-24: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Bacillales**, Familie **Planococcaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

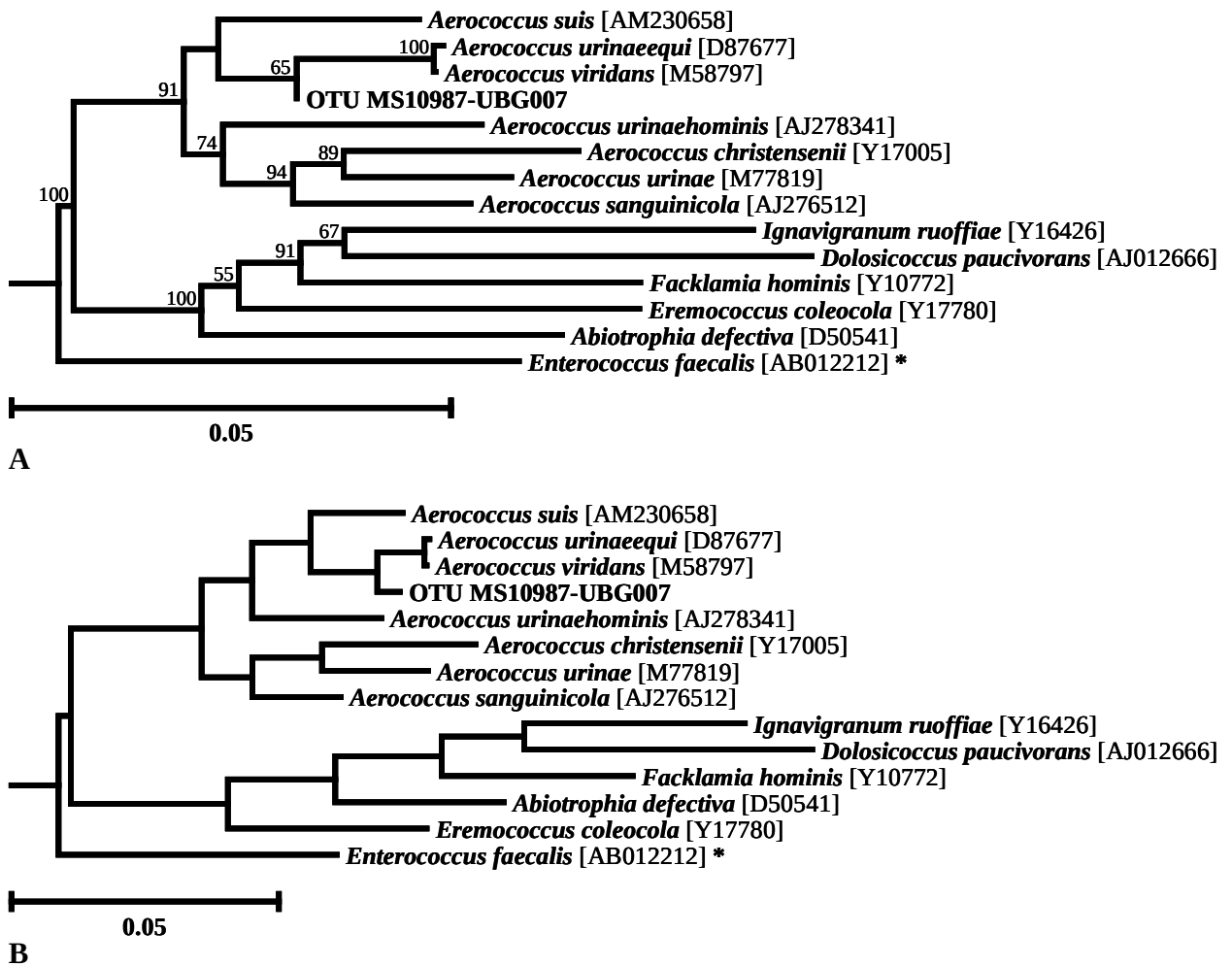


Abb. A-25: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Lactobacillales**, Familie **Aerococcaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

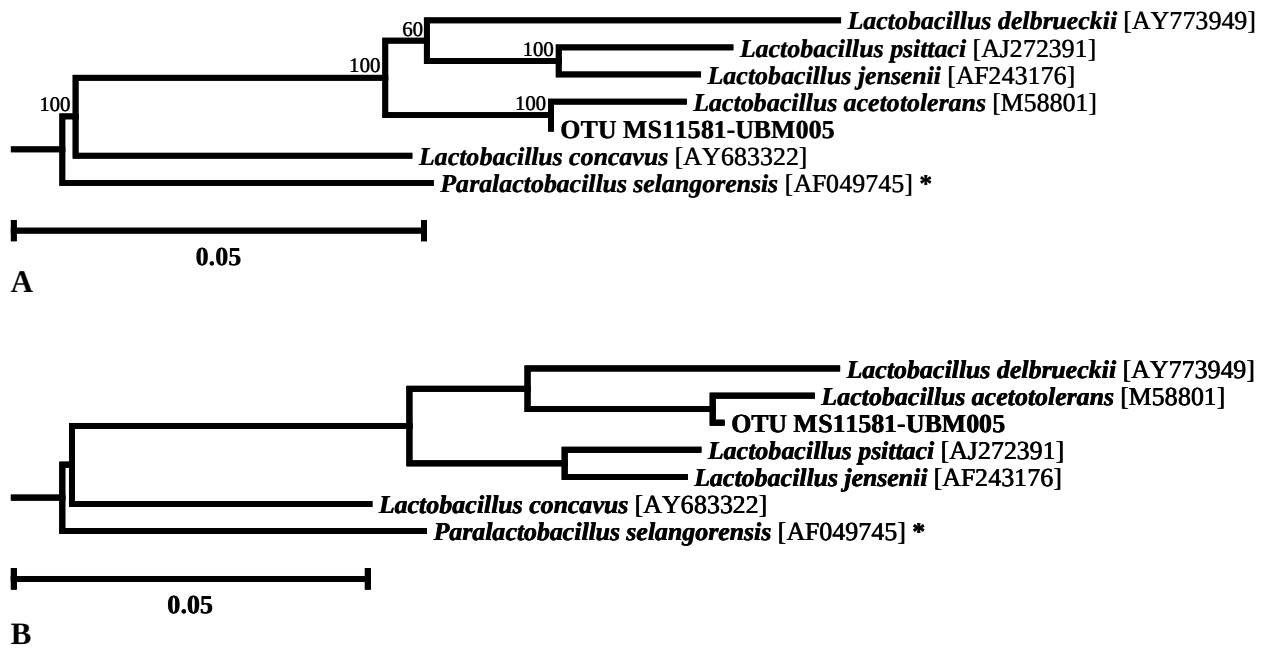


Abb. A-26: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Lactobacillales**, Familie **Lactobacillaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

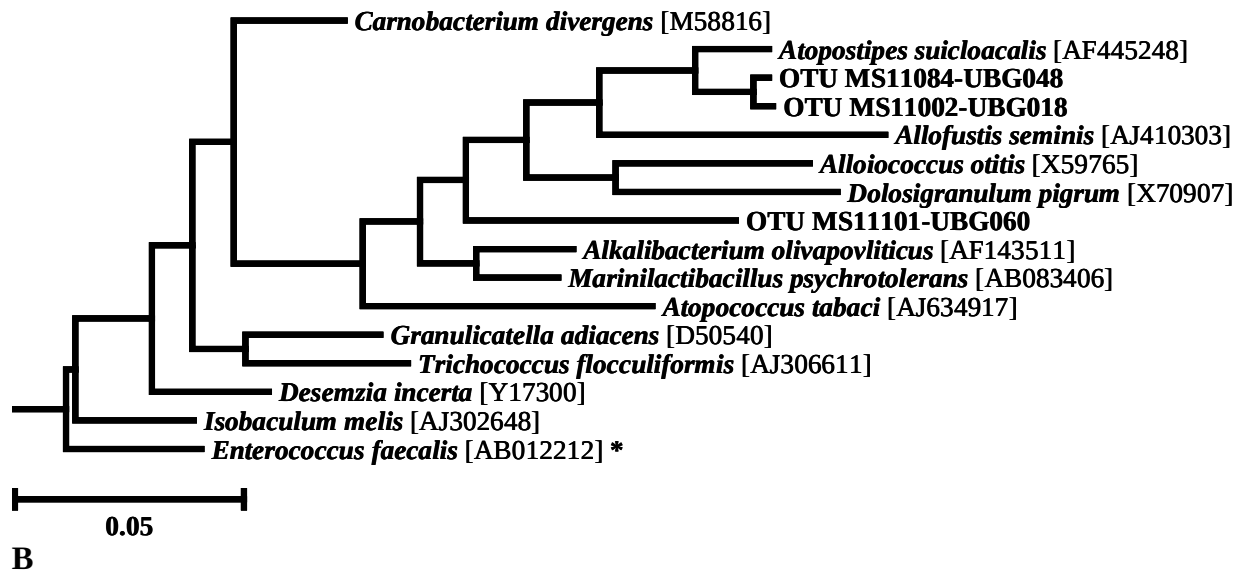
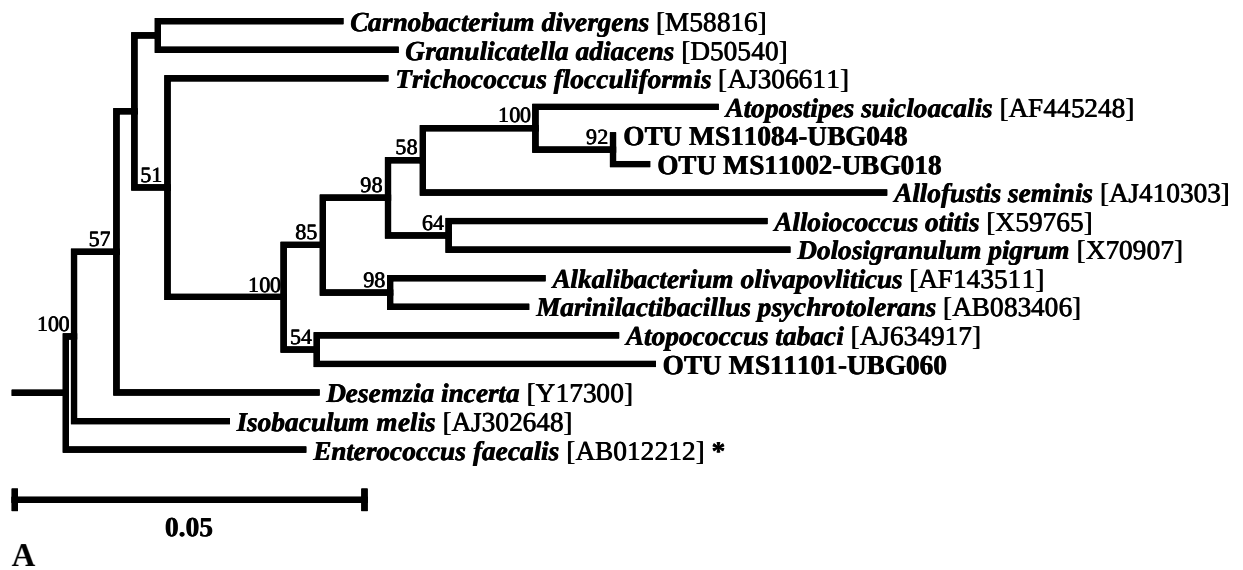


Abb. A-27: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Lactobacillales**, Familie **Carnobacteriaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

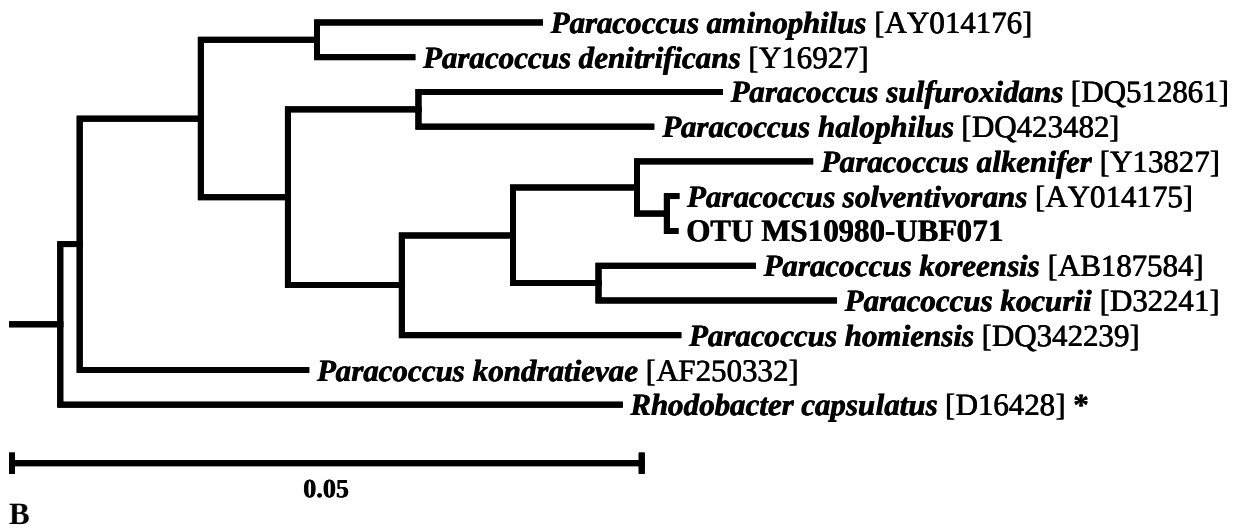
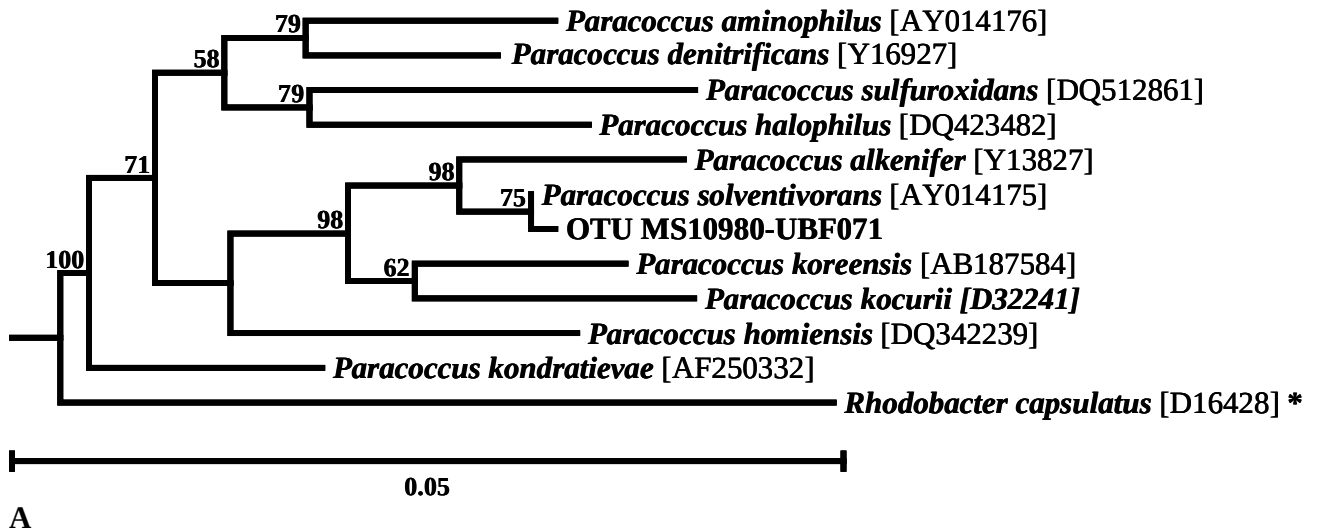


Abb. A-28: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Alphaproteobacteria**, Ordnung **Rhodobacterales**, Familie **Rhodobacteraceae**, Gattung **Paracoccus**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

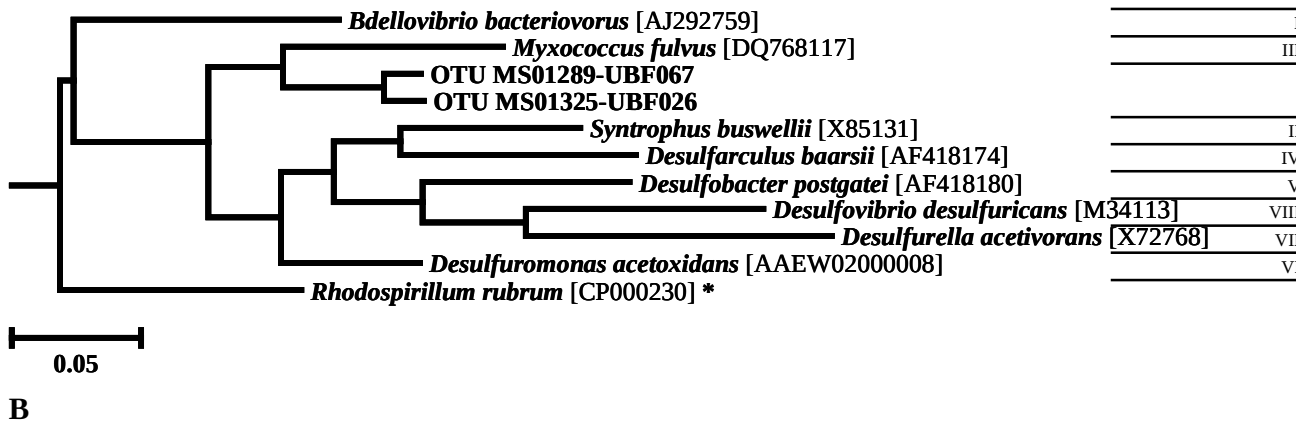
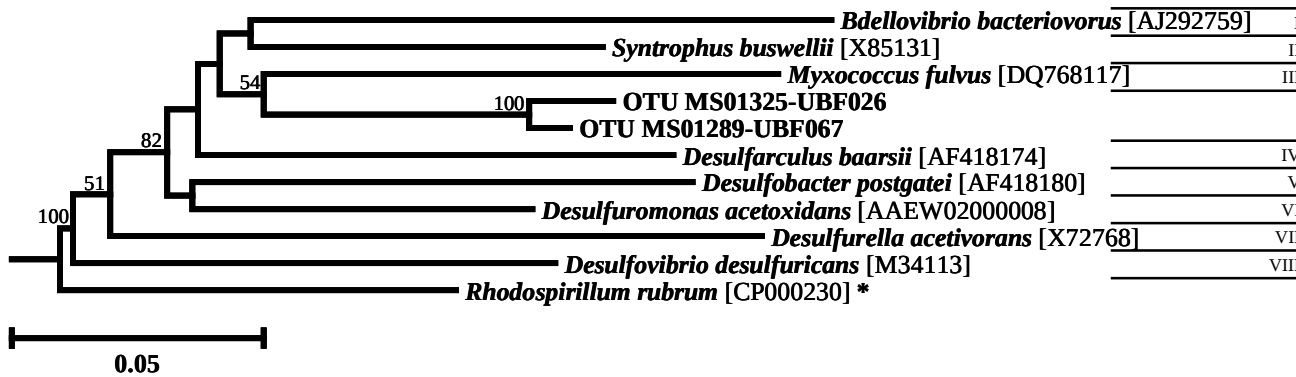


Abb. A-29: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Deltaproteobacteria**. I: Ordnung Bdellovibrionales; II: Ordnung Syntrophobacterales; III: Ordnung Myxococcales; IV: Ordnung Desulfarculales; V: Ordnung Desulfobacterales; VI: Ordnung Desulfuromonadales; VII: Ordnung Desulfurellales; VIII: Ordnung Desulfovibrionales. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

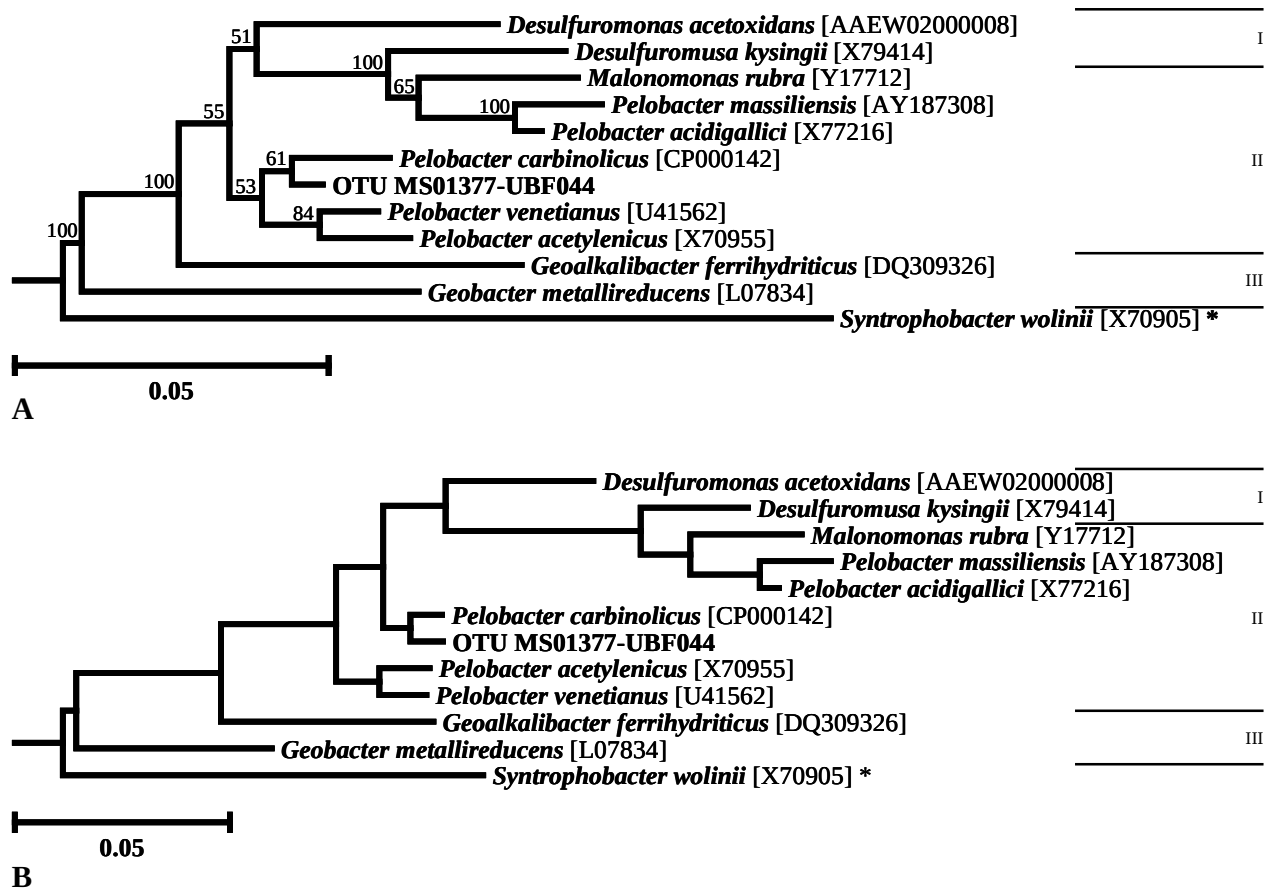
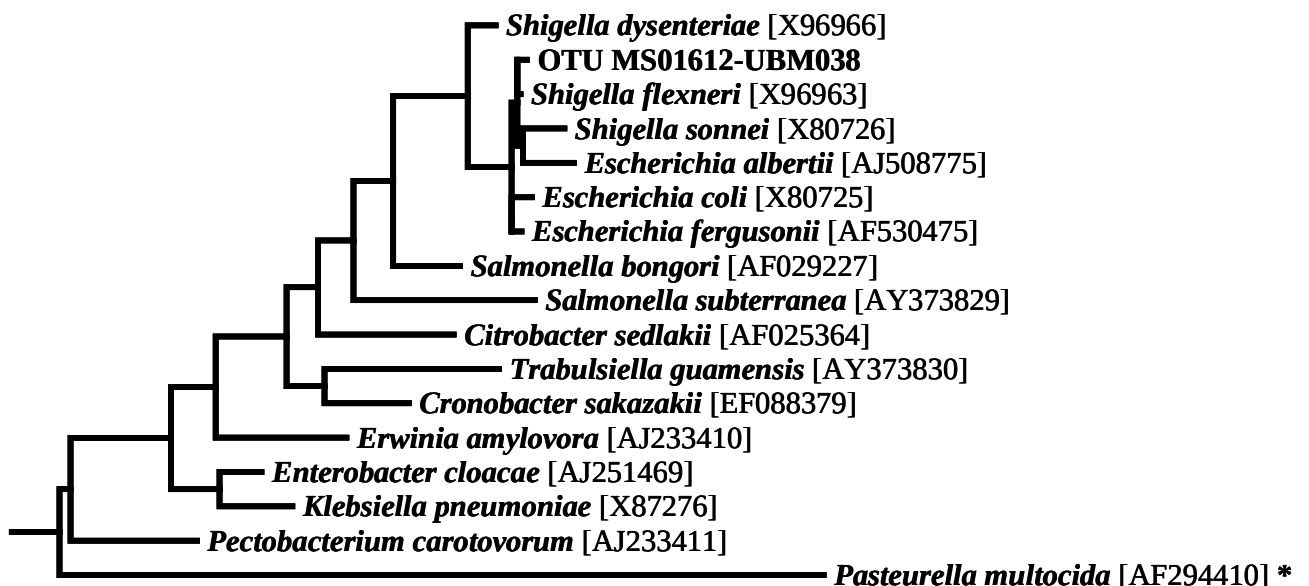


Abb. A-30: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Deltaproteobacteria**, Ordnung **Desulfuromonadales**. I: Familie Desulfuromonadaceae; II: Familie Pelobacteraceae; III: Familie Geobacteraceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A

0.05



B

0.05

Abb. A-31: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Gammaproteobacteria**, Ordnung **Enterobacteriales**, Familie **Enterobacteriaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

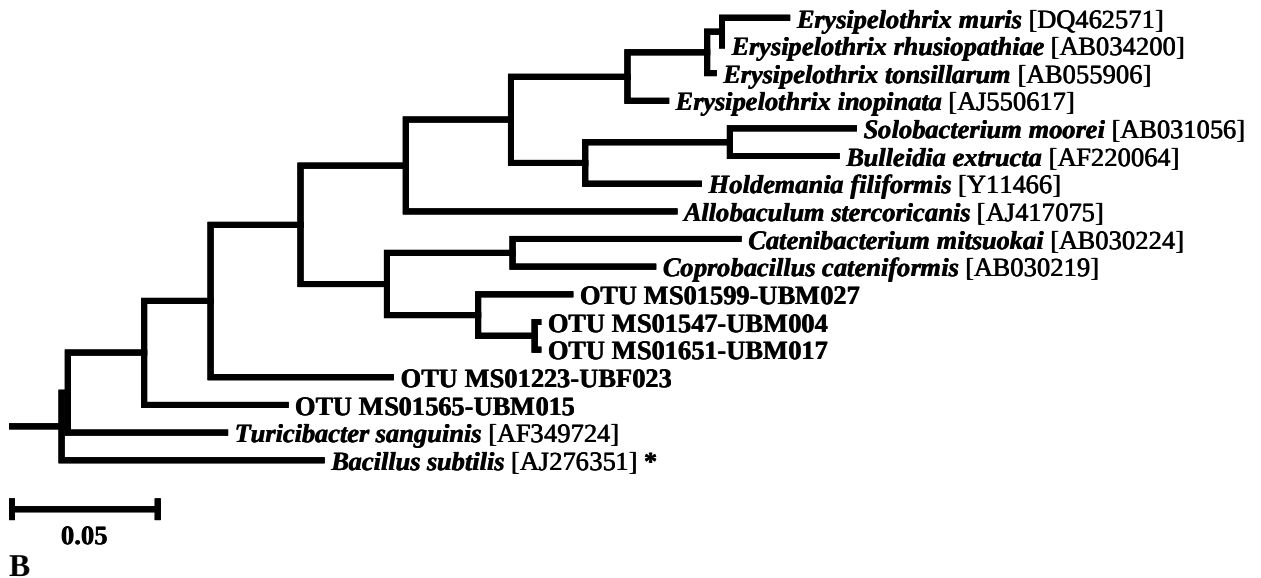
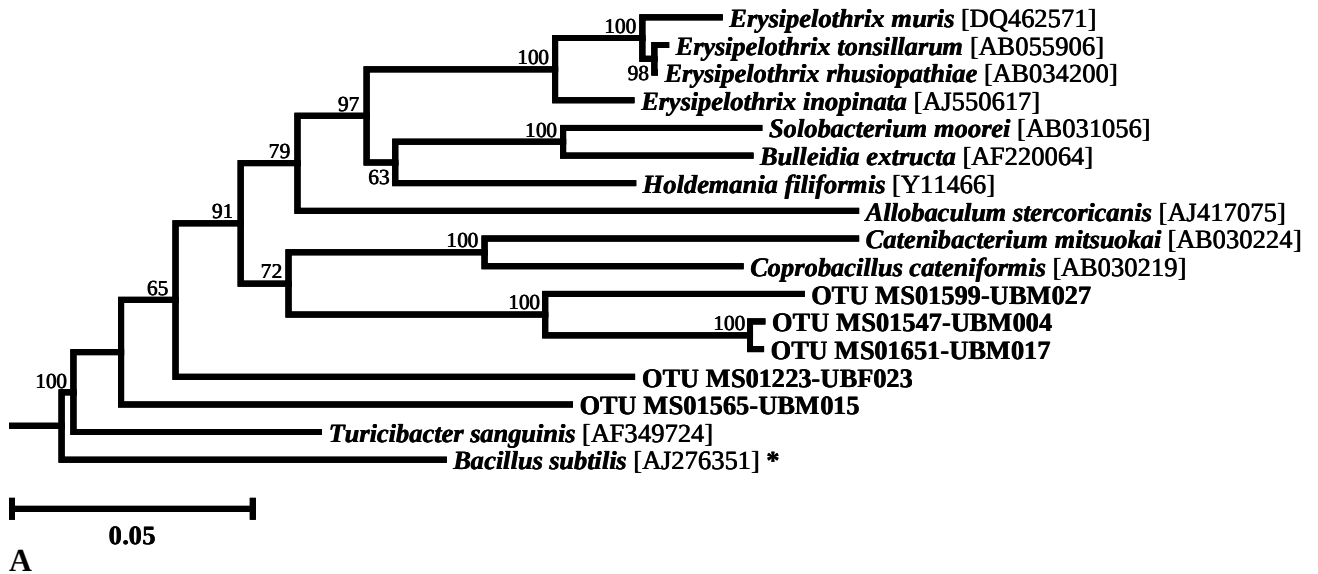


Abb. A-32: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Gammaproteobacteria**, Ordnung **Enterobacteriales**, Familie **Enterobacteriaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

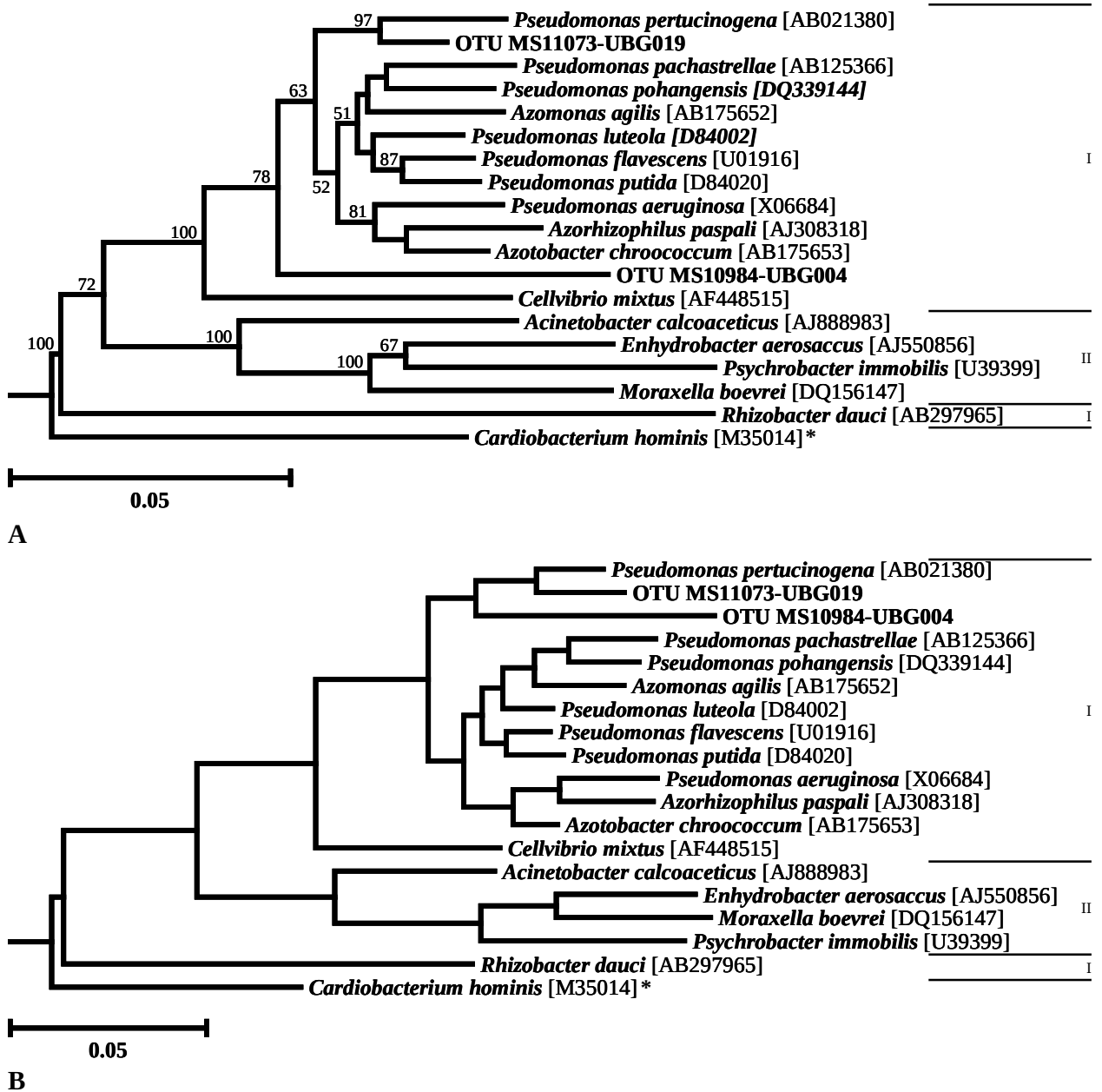


Abb. A-33: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Proteobacteria**, Klasse **Gammaproteobacteria**, Ordnung **Pseudomonadales**. I: Familie Pseudomonadaceae; II: Familie Moraxellaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

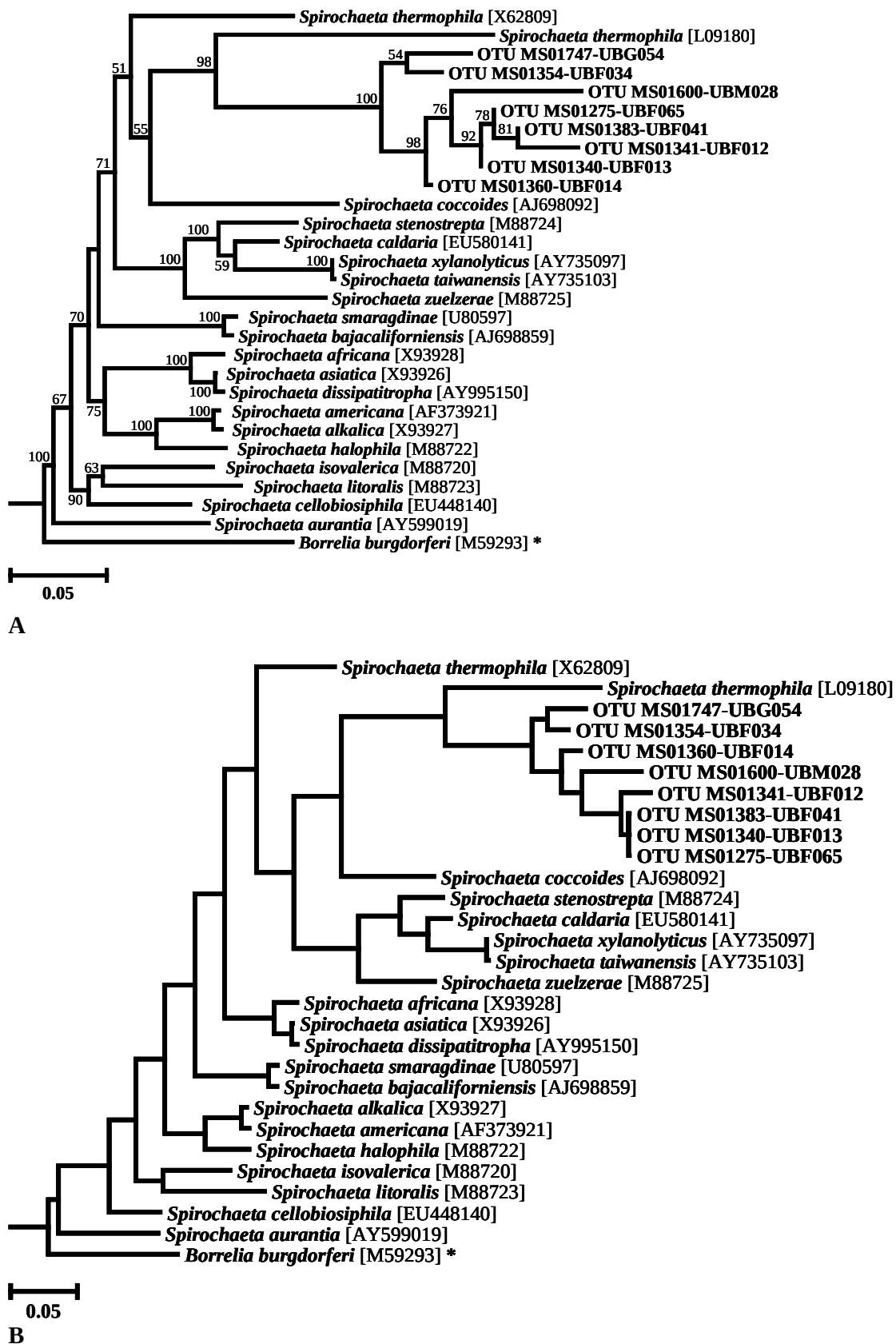
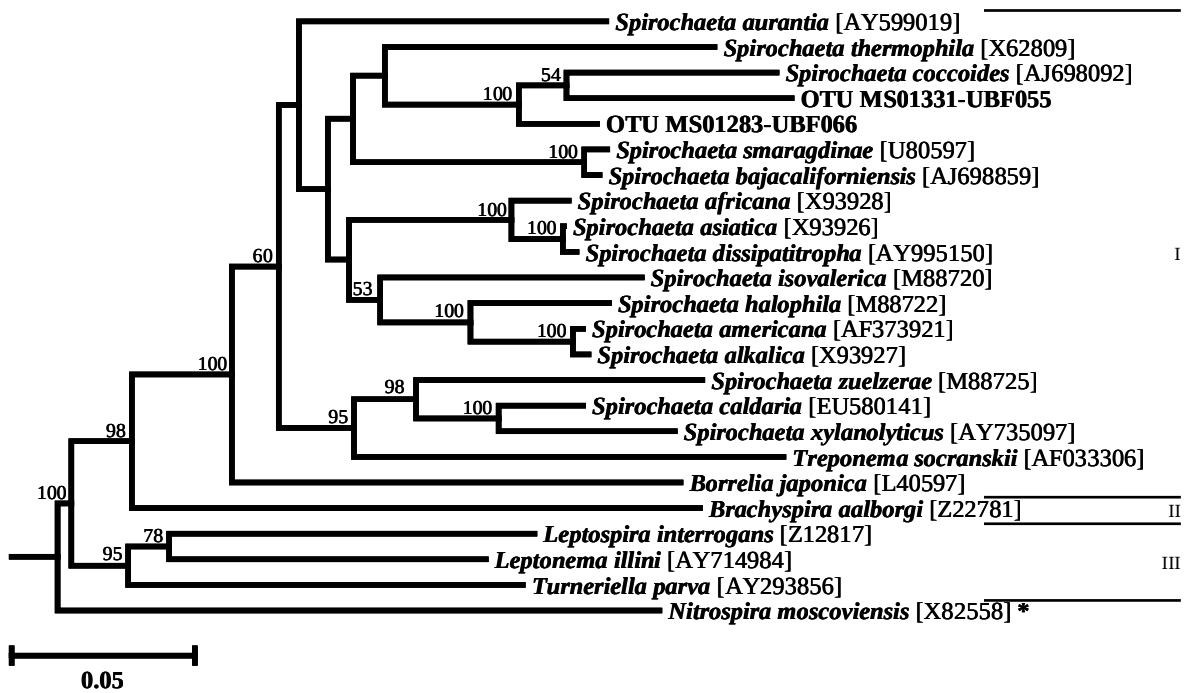
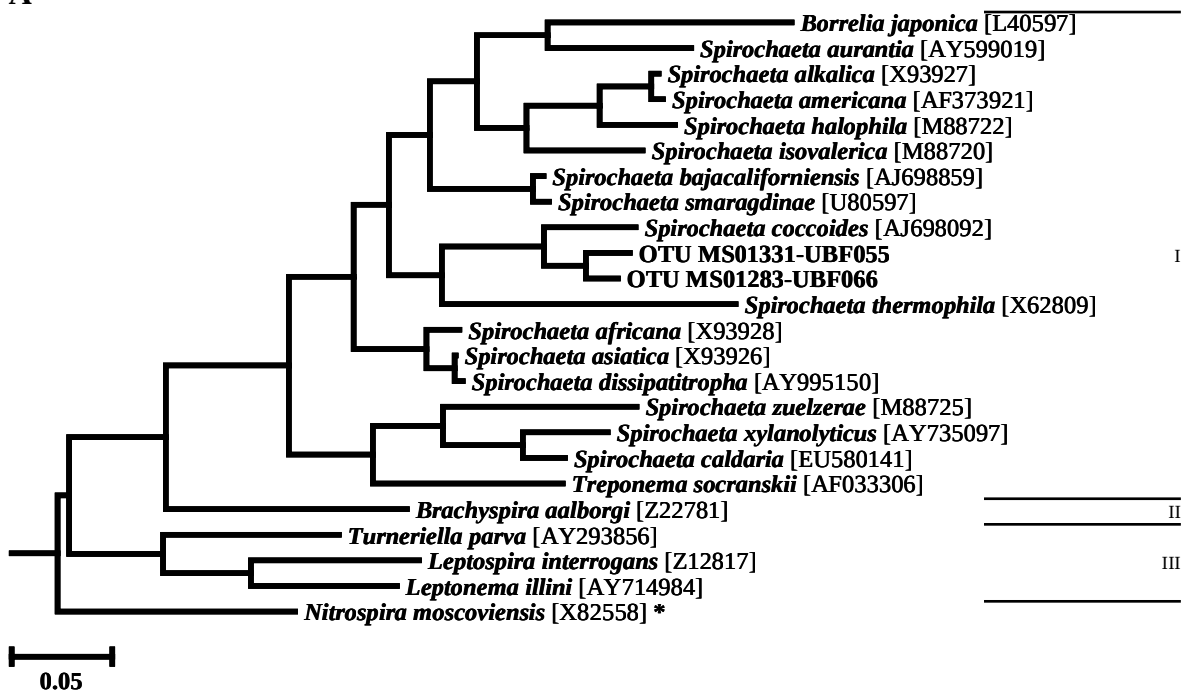


Abb. A-34: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm und Klasse **Spirochaetes**, Ordnung **Spirochaetales**, Familie **Spirochaetaceae**, Gattung **Spirochaeta**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

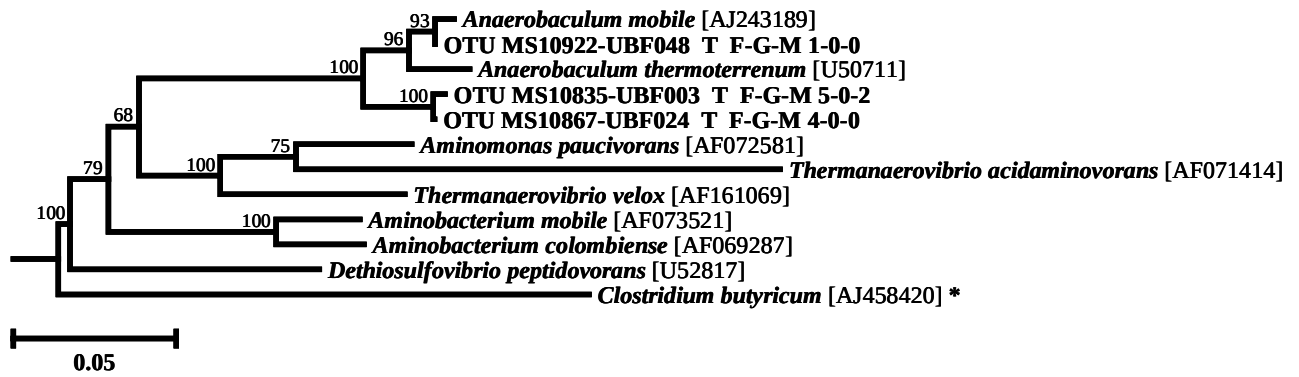


A

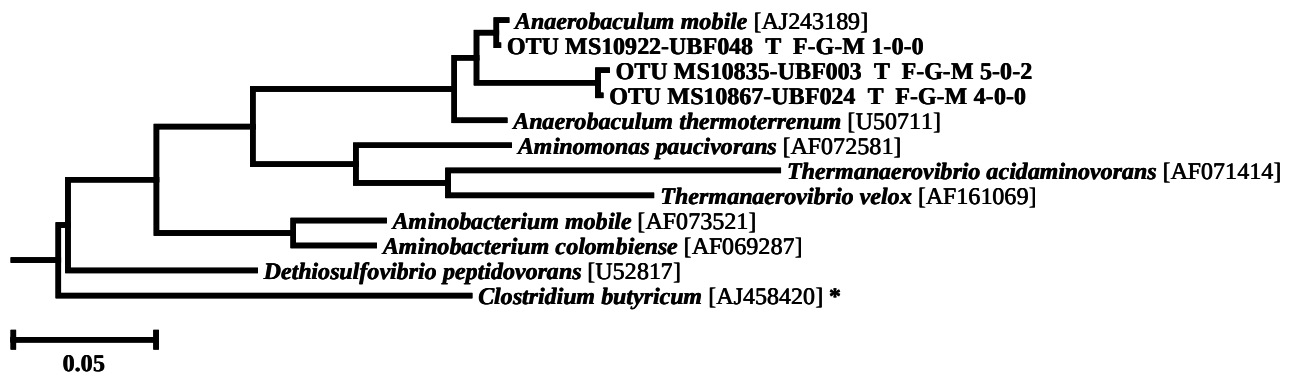


B

Abb. A-35: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm und Klasse **Spirochaetes**, Ordnung **Spirochaetales**. I: Familie Spirochaetaceae; II: Familie Brachyspiraceae; III: Leptospiraceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

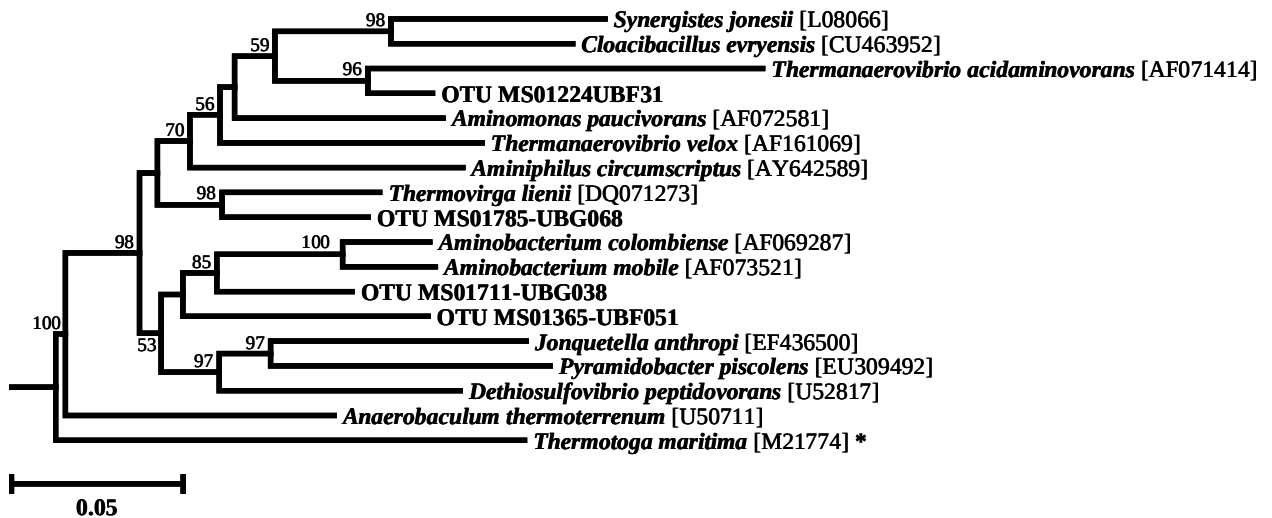


A

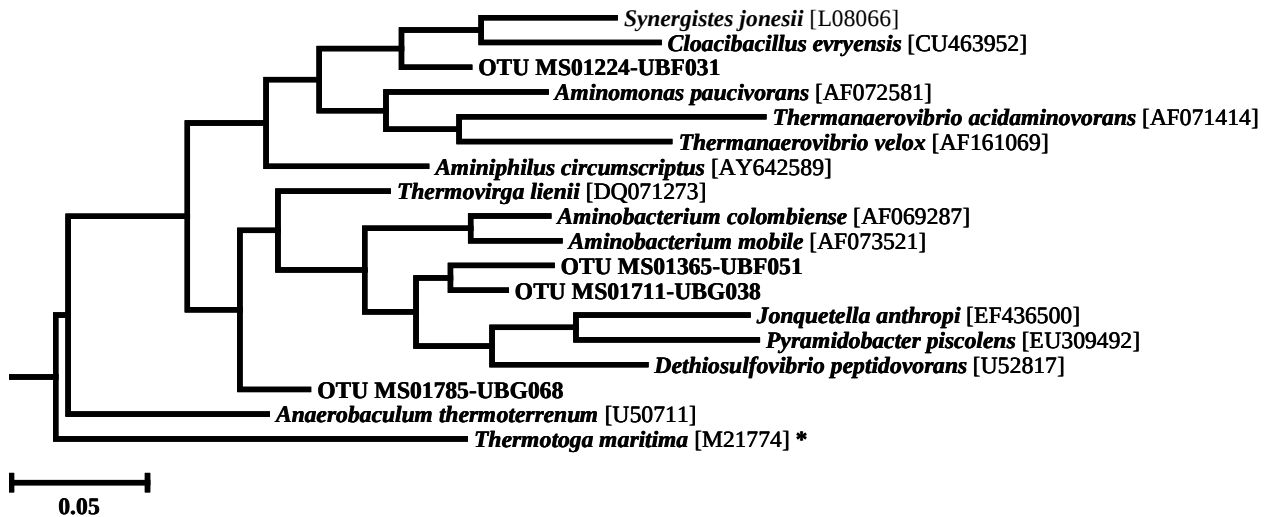


B

Abb. A-36: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Synergistetes, Klasse **Synergistia**, Ordnung **Synergistales**, Familie **Synergistaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

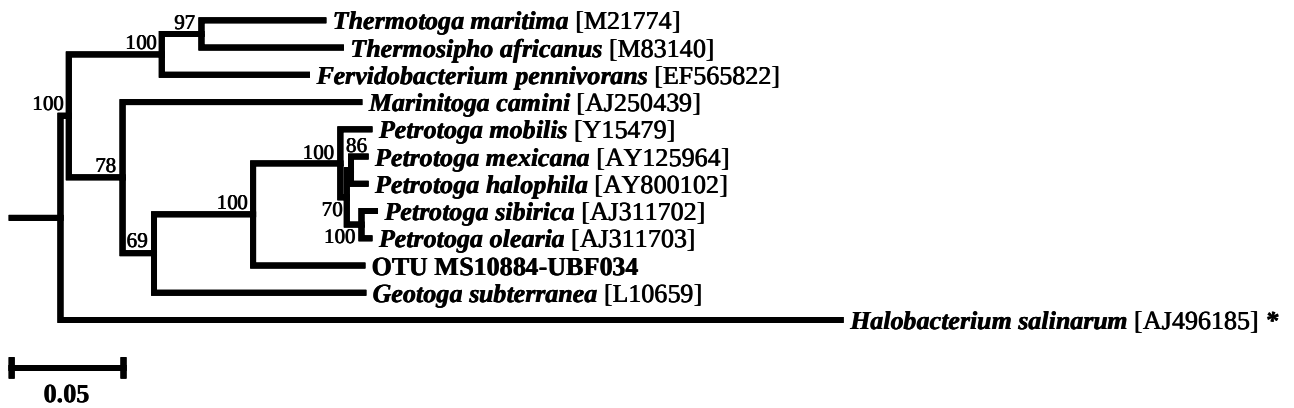


A

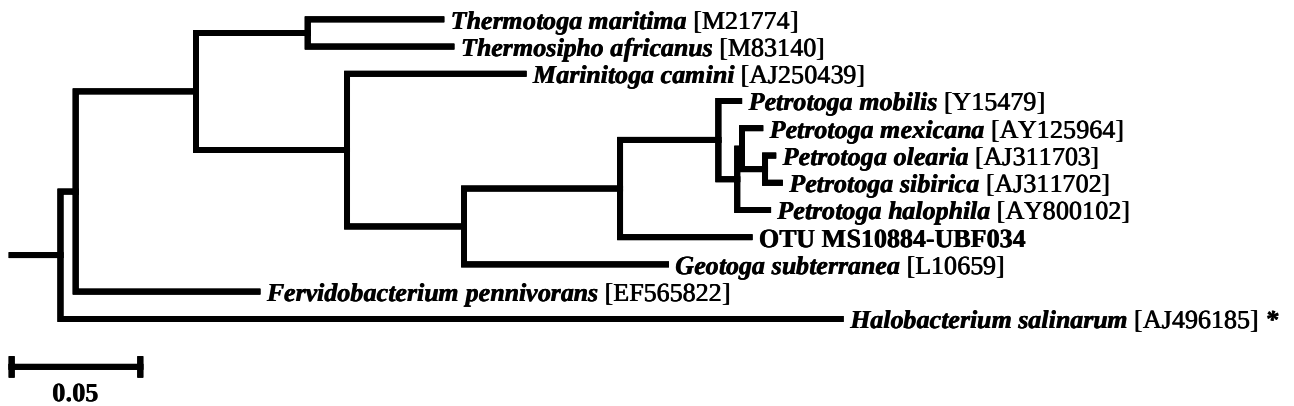


B

Abb. A-37: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Synergistetes, Klasse **Synergistia**, Ordnung **Synergistales**, Familie **Synergistaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

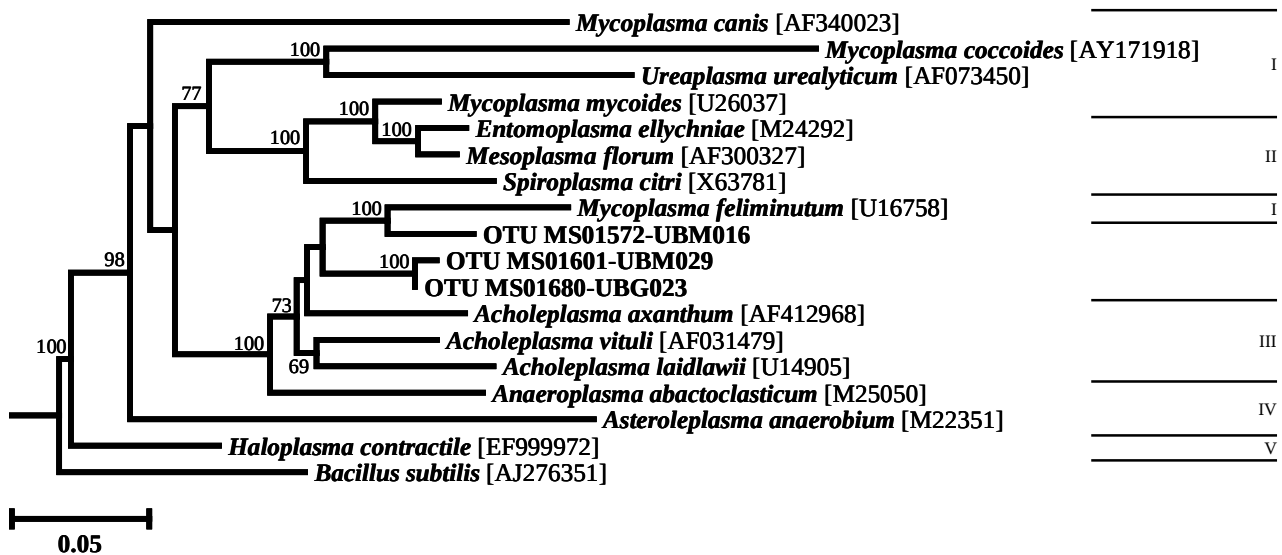


A

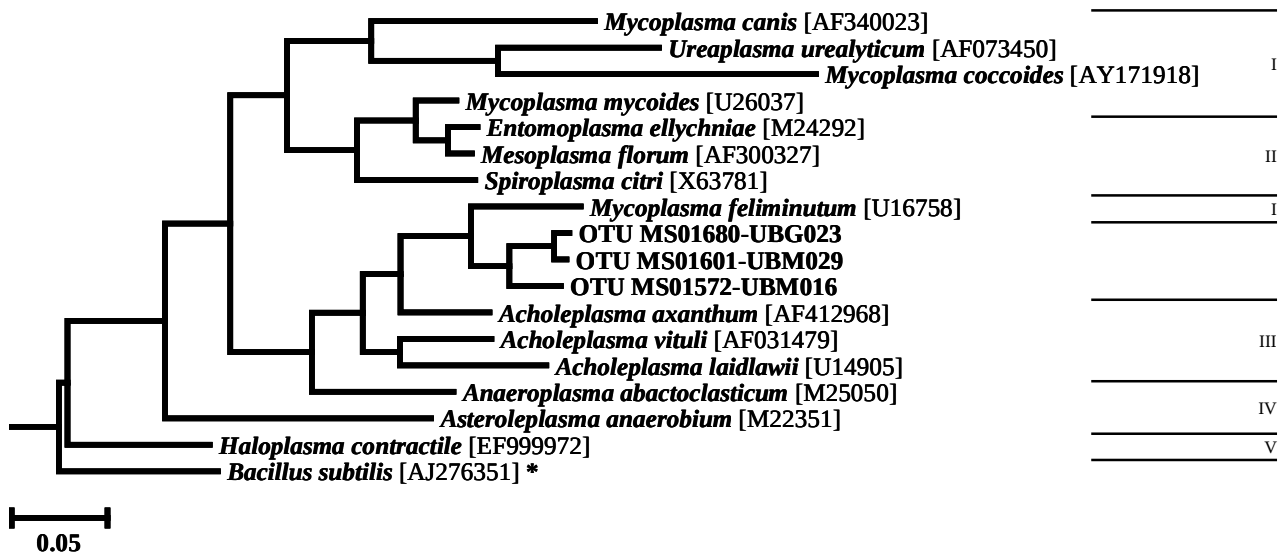


B

Abb. A-38: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm *Thermotogae*, Klasse **Thermotogae**, Ordnung **Thermotogales**, Familie **Thermotogaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-39: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Tenericutes, Klasse **Mollicutes**. I: Familie Mycoplasmatales; II: Familie Entomoplasmatales; III: Familie Acholeplasmatales; IV: Familie Anaeroplasmatales; V: Familie Haloplasmatales. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

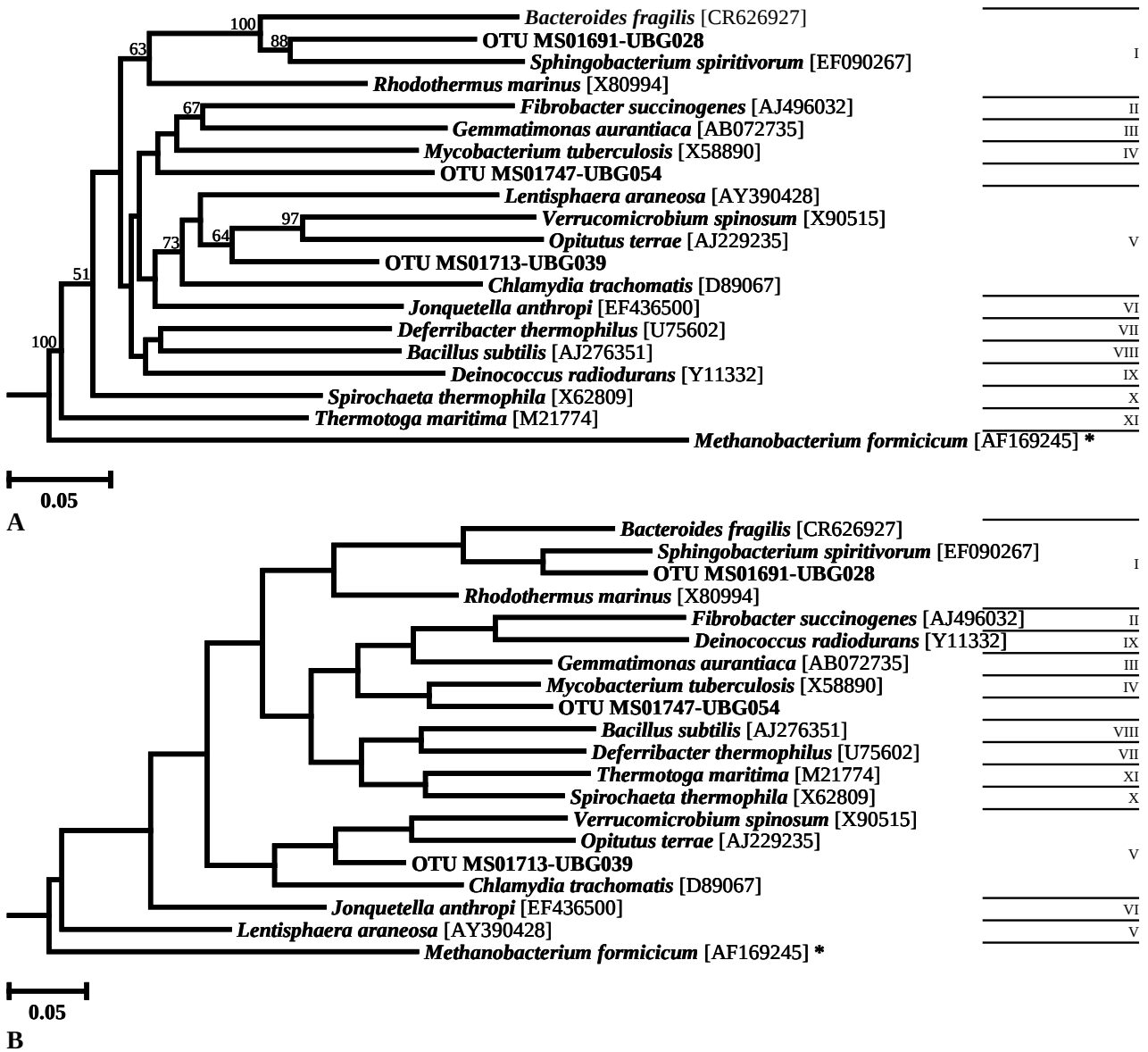


Abb. A-40: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Zuordnung. I: Bacteroidetes / Chlorobi Gruppe; II: Fibrobacteres / Acidobacteria Gruppe; III: Stamm Gemmatimonadetes; IV: Stamm Actinobacteria; V: Chlamydiae / Verrucomicrobia Gruppe; VI: Stamm Synergistetes; VII: Stamm Deferribacteres; VIII: Stamm Firmicutes; IX: Deinococcus / Thermus Gruppe; X: Stamm Spirochaetes; XI: Stamm Thermotogae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

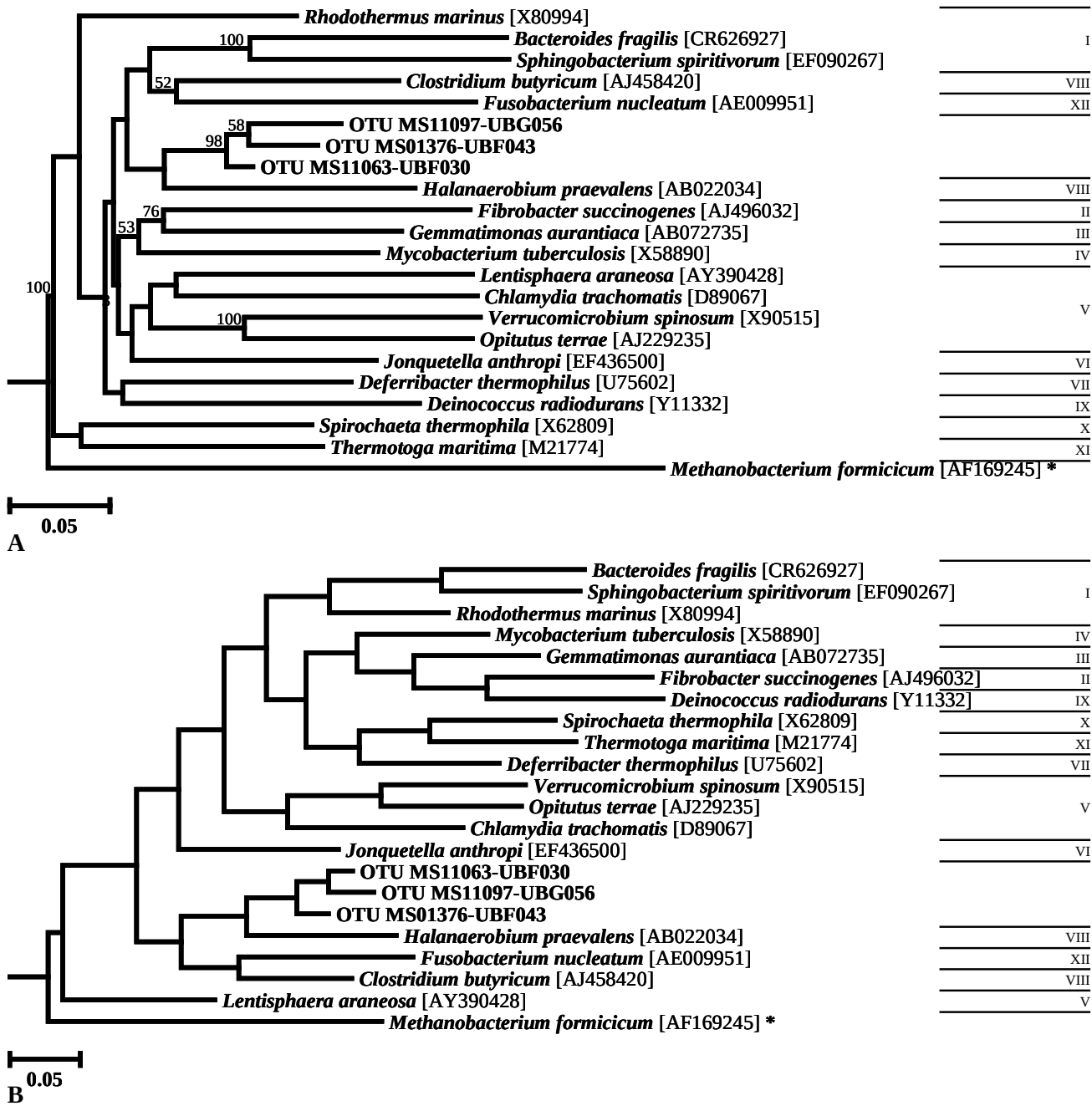


Abb. A-41: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Zuordnung. I: Bacteroidetes / Chlorobi Gruppe; II: Fibrobacteres / Acidobacteria Gruppe; III: Stamm Gemmatimonadetes; IV: Stamm Actinobacteria; V: Chlamydiae / Verrucomicrobia Gruppe; VI: Stamm Synergistetes; VII: Stamm Deferribacteres; VIII: Stamm Firmicutes; IX: Deinococcus / Thermus Gruppe; X: Stamm Spirochaetes; XI: Stamm Thermotogae; XII: Stamm Fusobacteria. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

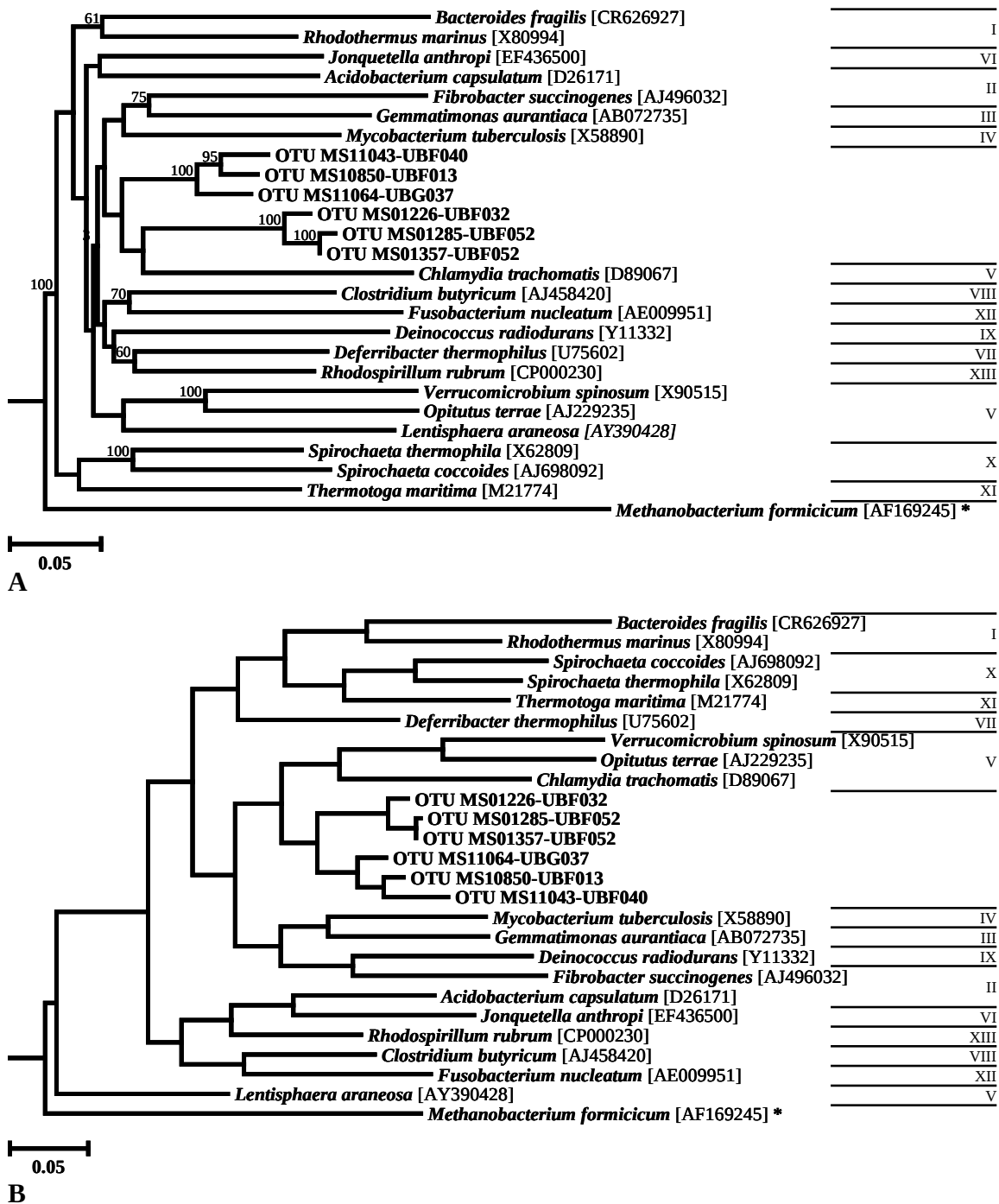


Abb. A-42: Versuchsteil A - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Zuordnung. I: Bacteroidetes / Chlorobi Gruppe; II: Fibrobacteres / Acidobacteria Gruppe; III: Stamm Gemmatimonadetes; IV: Stamm Actinobacteria; V: Chlamydiae / Verrucomicrobia Gruppe; VI: Stamm Synergistetes; VII: Stamm Deferribacteres; VIII: Stamm Firmicutes; IX: Deinococcus / Thermus Gruppe; X: Stamm Spirochaetes; XI: Stamm Thermotogae; XII: Stamm Fusobacteria; XIII: Stamm Proteobacteria. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

## Anhang 2

## Phylogenetische Einordnung der in Versuchsteil B ermittelten taxonomischen Einheiten

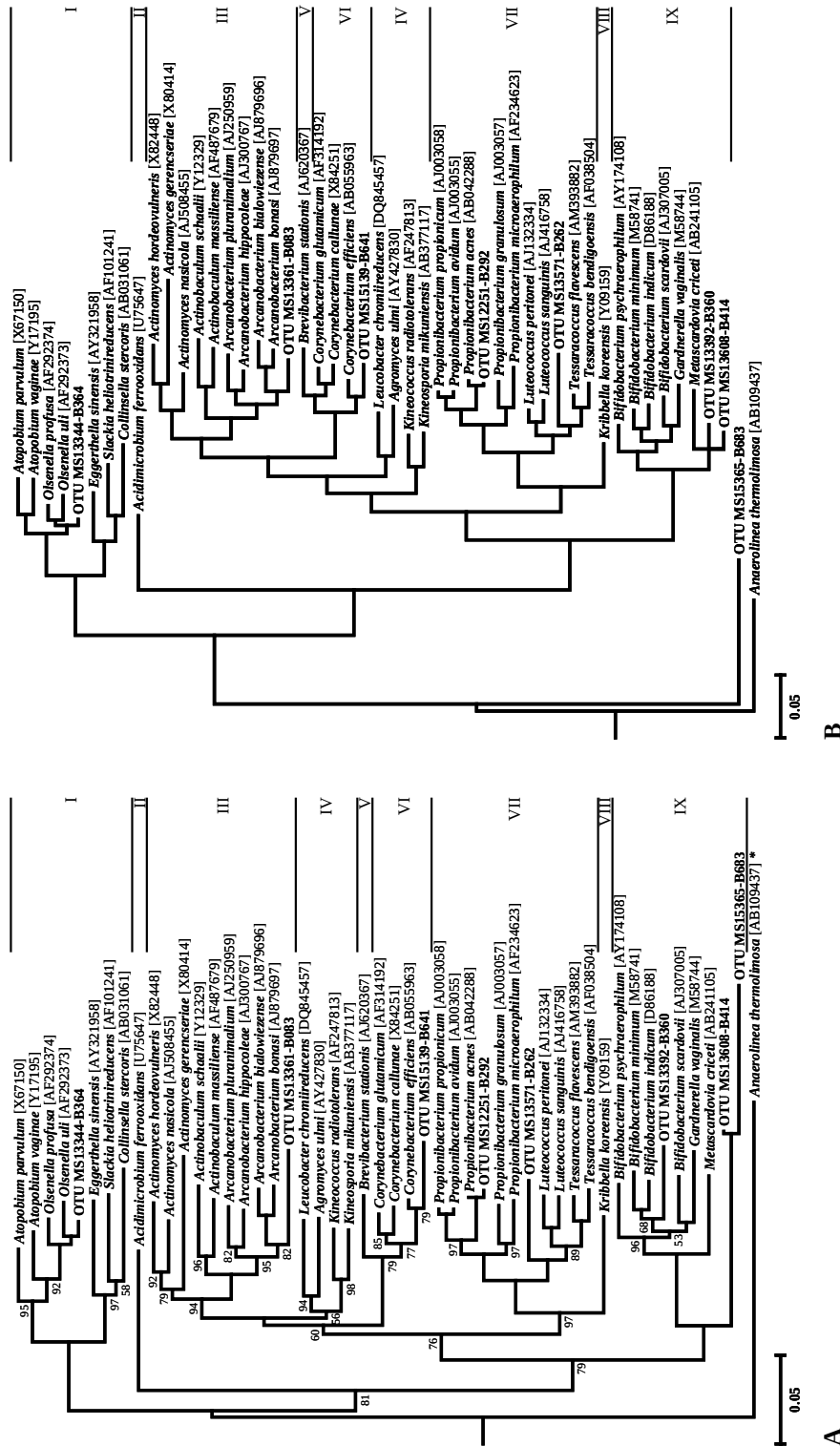
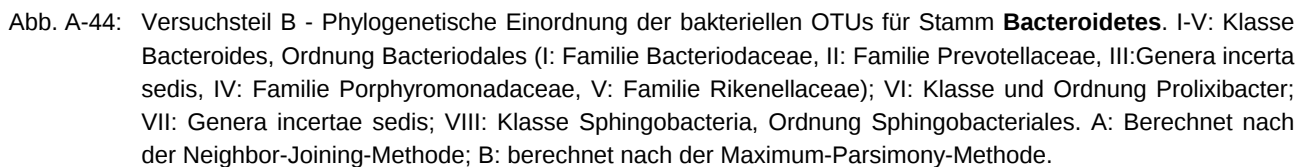
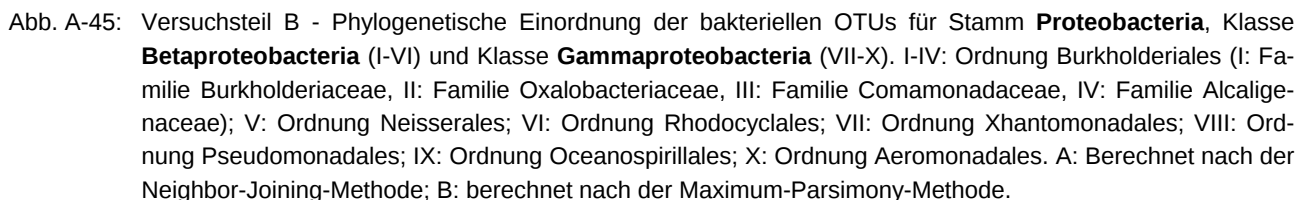


Abb. A-43: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm und Klasse **Actinobacteria**. I: Ordnung Coriobacteriales; II: Ordnung Acidimicrobiales; III-VIII: Ordnung Actinomycetales (III: Familie Actinomycetaceae, IV: Familie Kineosporiaceae, V: Familie Brevibacteriaceae, VI: Familie Corynebacteriaceae, VII: Familie Propionibacteriaceae, VIII: Familie Nocardioideae); X: Ordnung Bifidobacteriales. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.





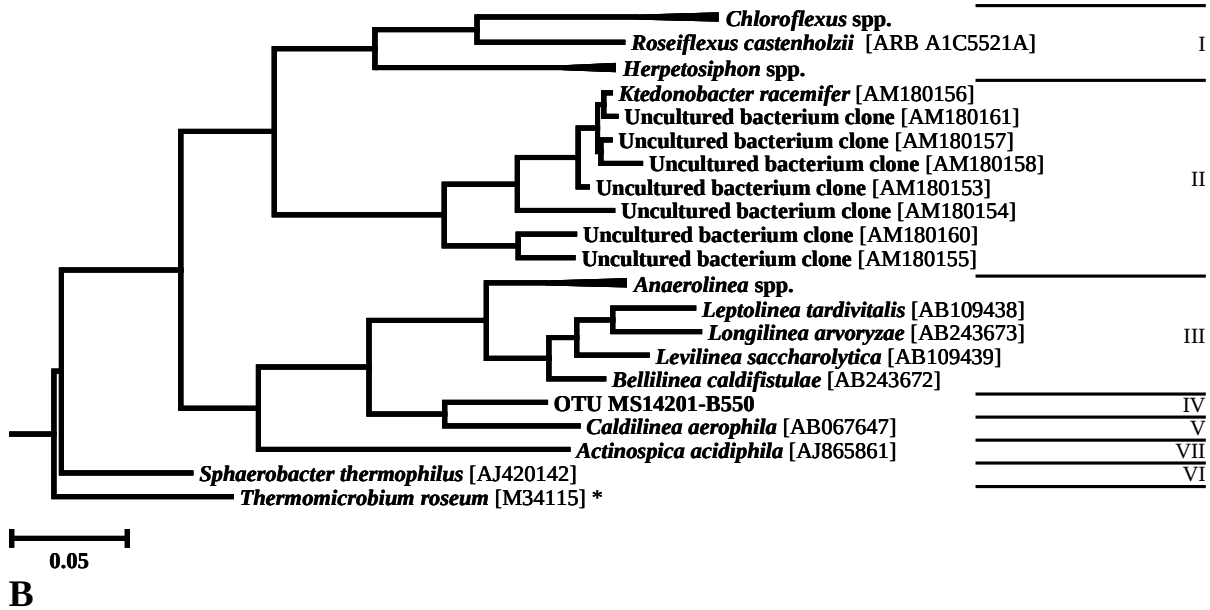
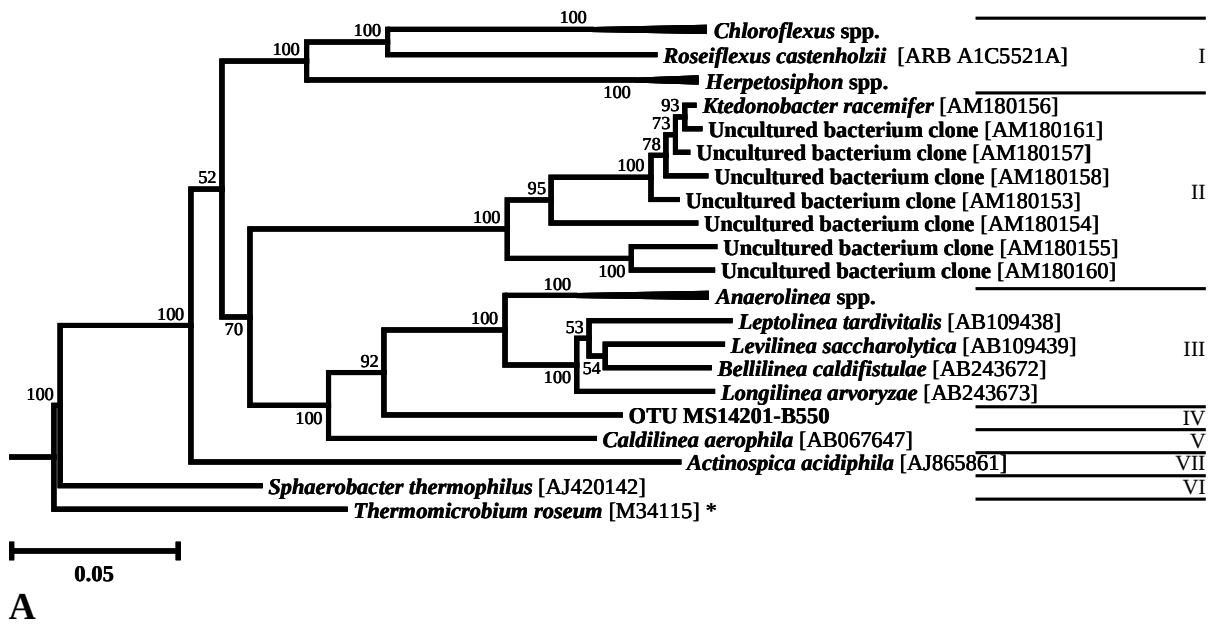
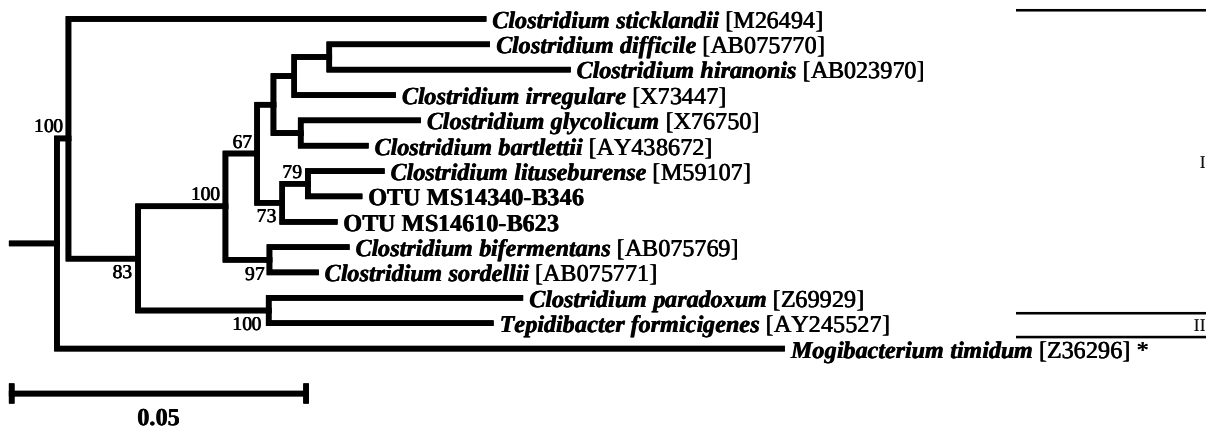
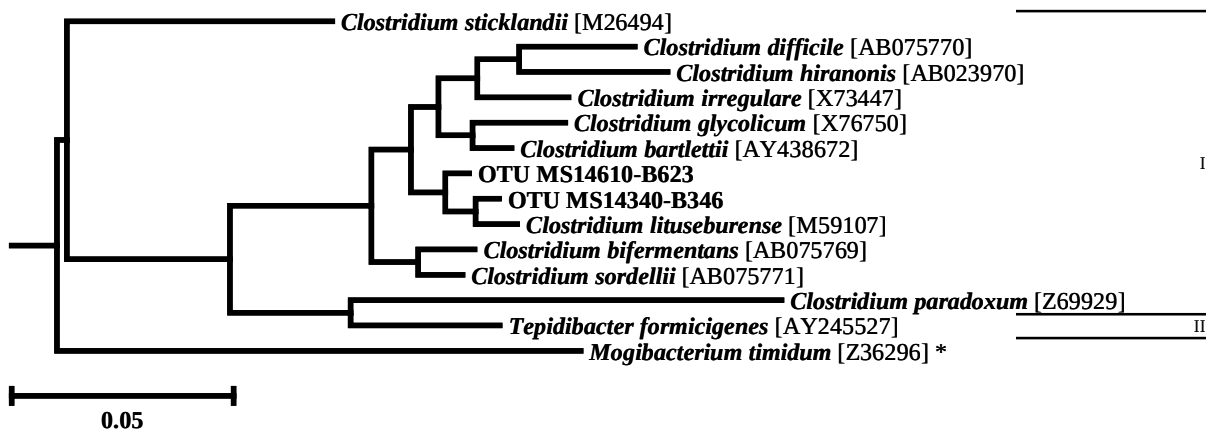


Abb. A-46: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Chloroflexi**. I: Klasse Chloroflexi; II: Klasse Ktedonobacter; III: Klasse Anaerolineae; IV: Genera incertae sedis; V: Klasse Caldilineae; VI: Klasse Sphaerobacteridae; VII: Stamm Actinobacteria, Klasse Actinobacteridea. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-47: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae, II: Familie Peptostreptococcaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

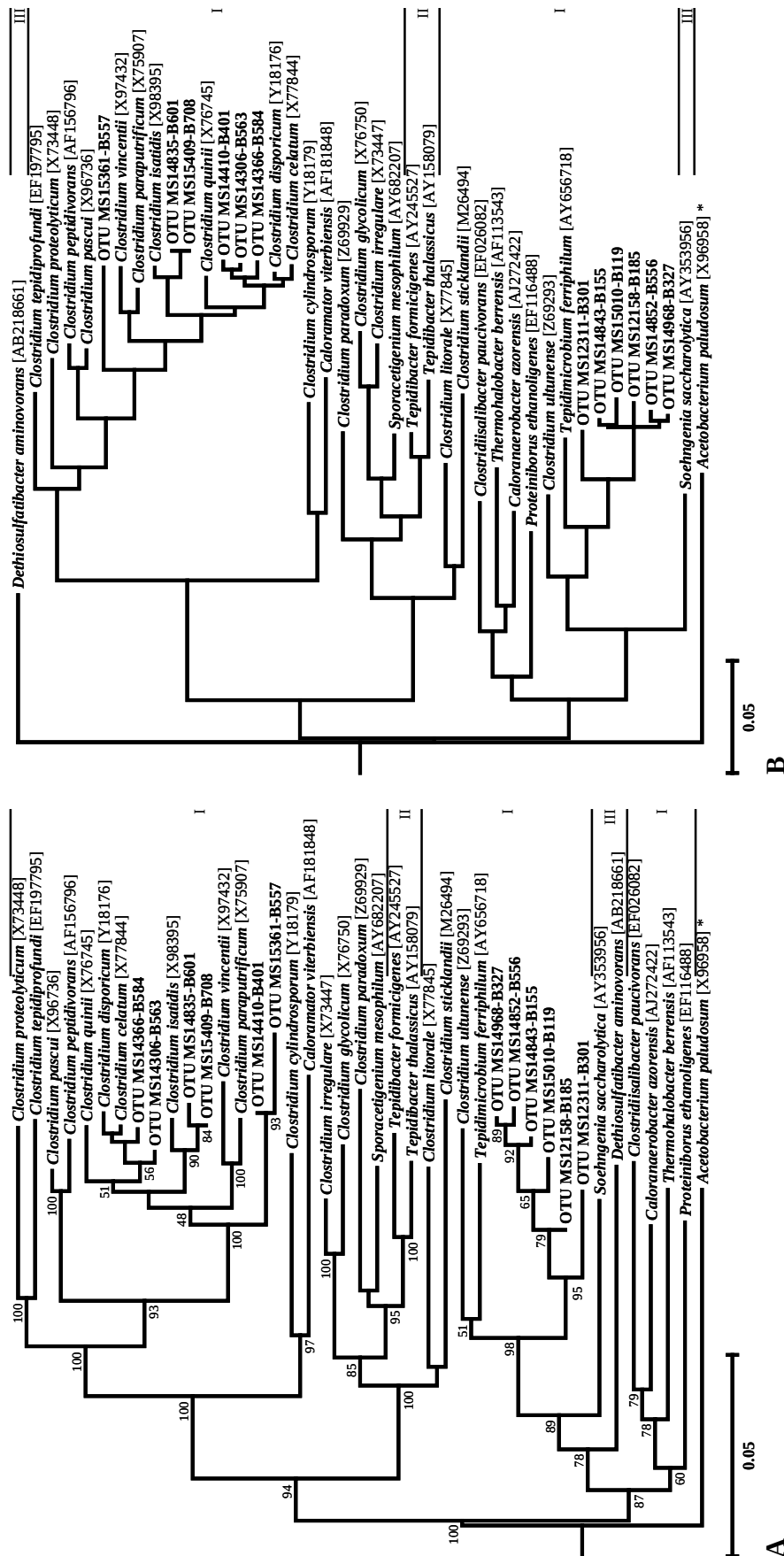


Abb. A-48: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Familie Peptostreptococcaceae; III: Genera incerta sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

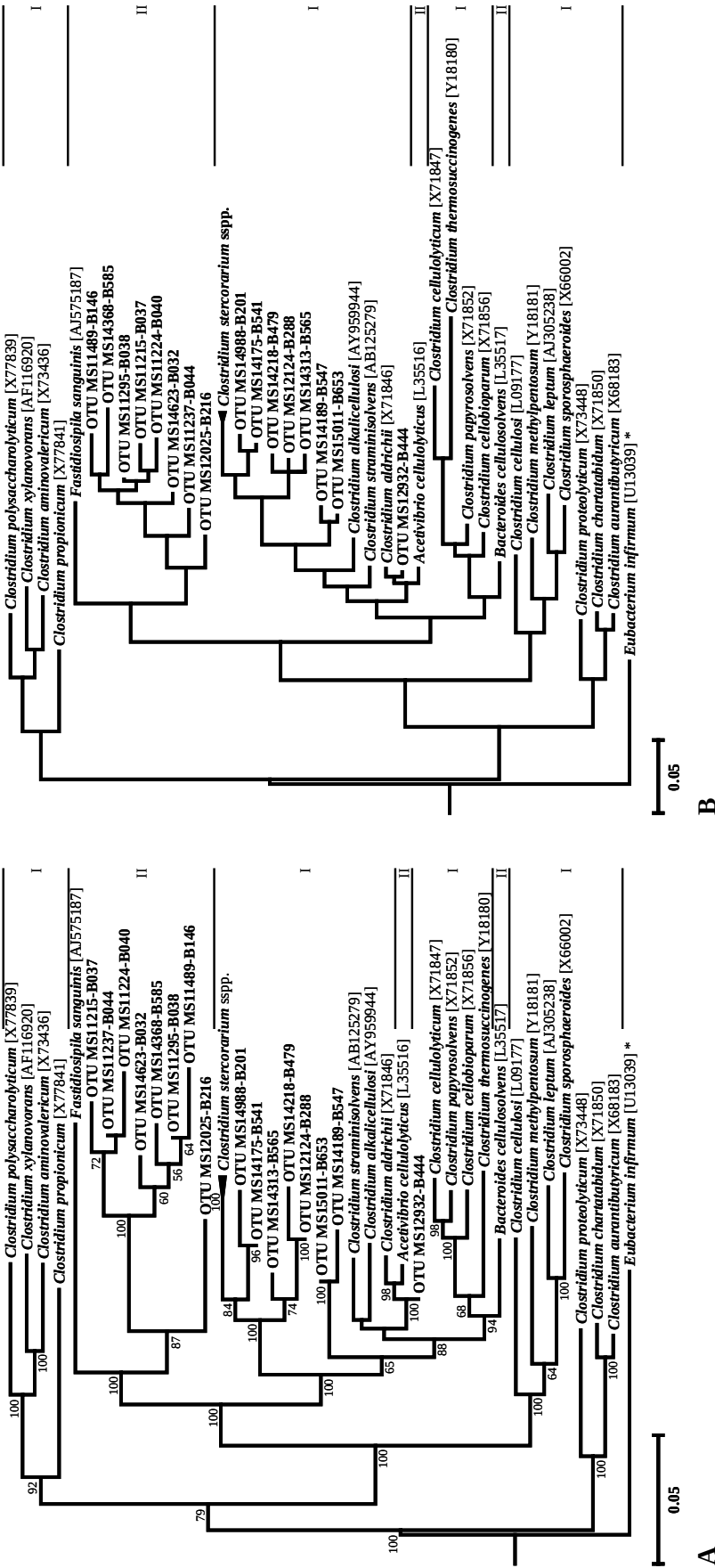
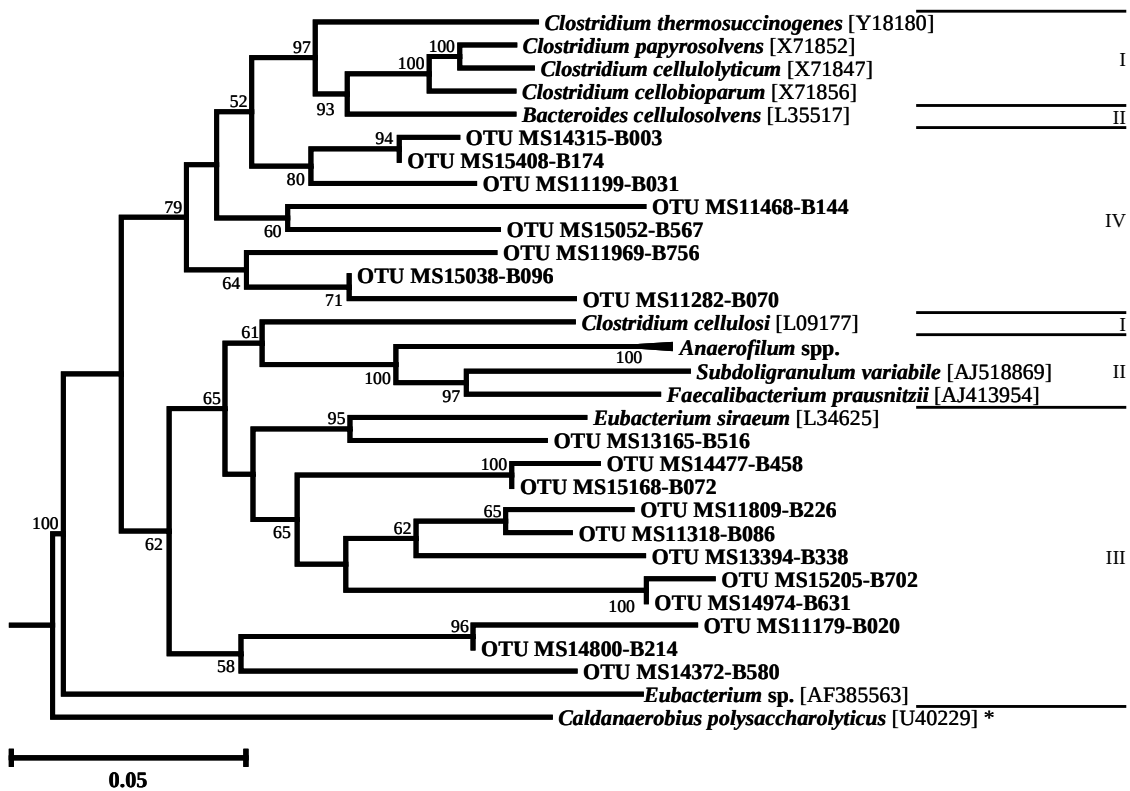
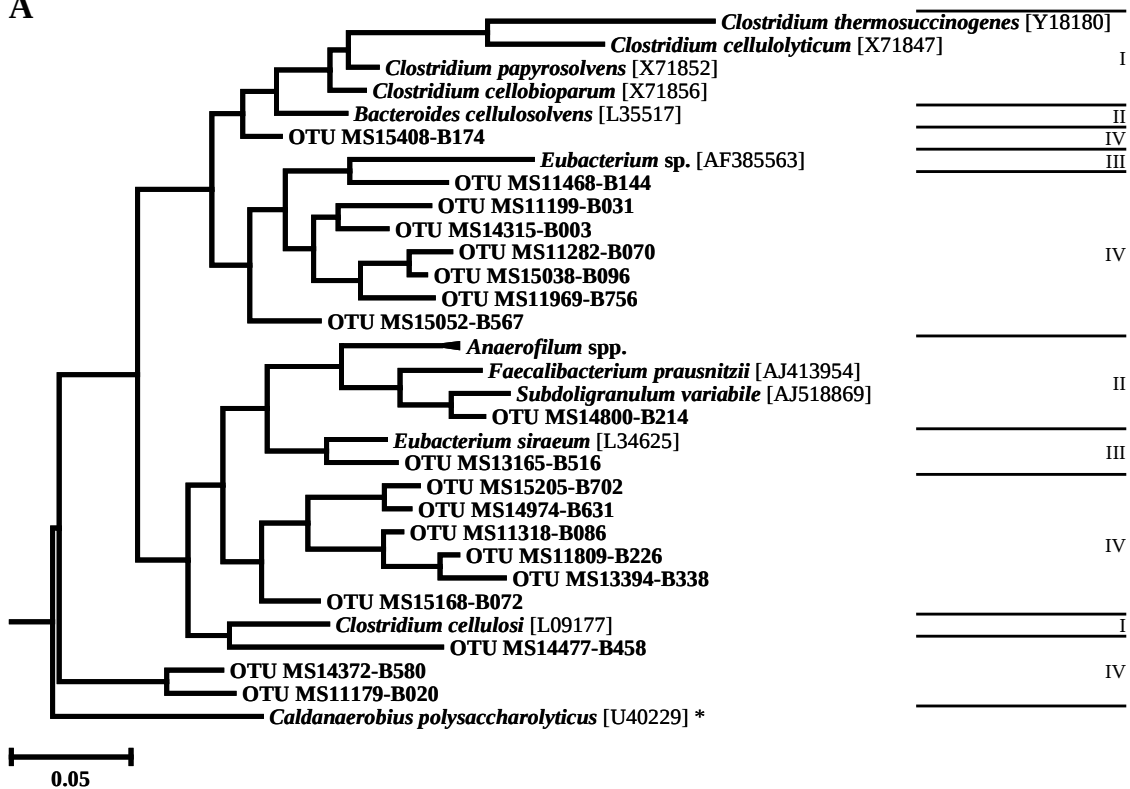


Abb. A-49: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Famlie Ruminococcaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

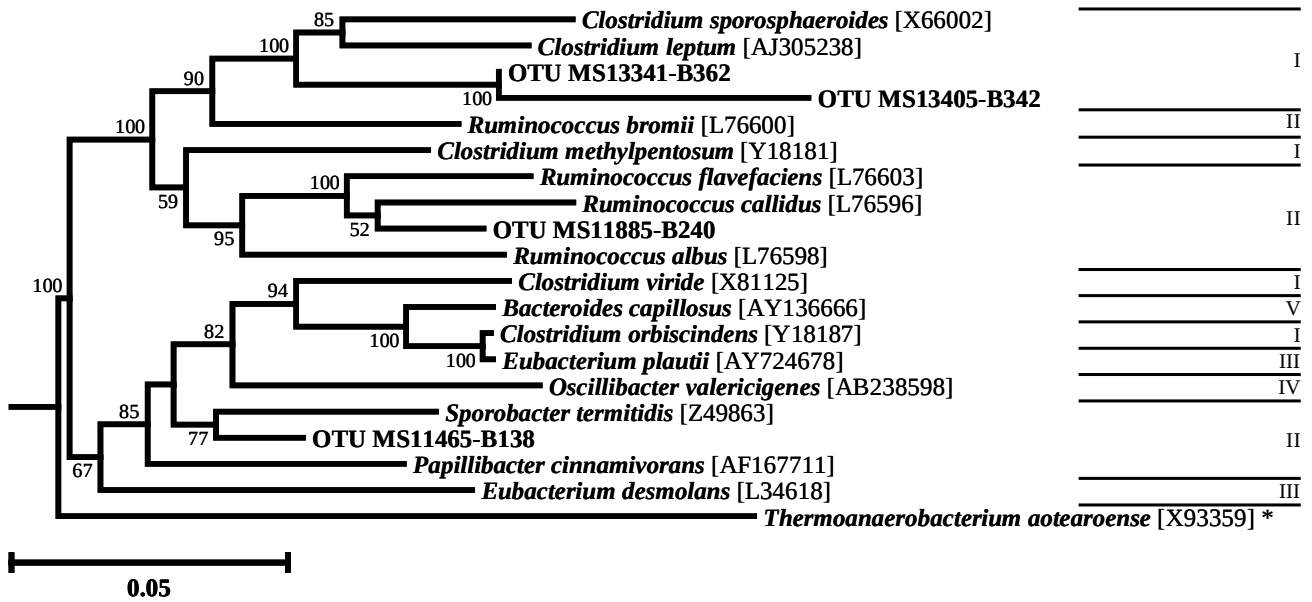


A

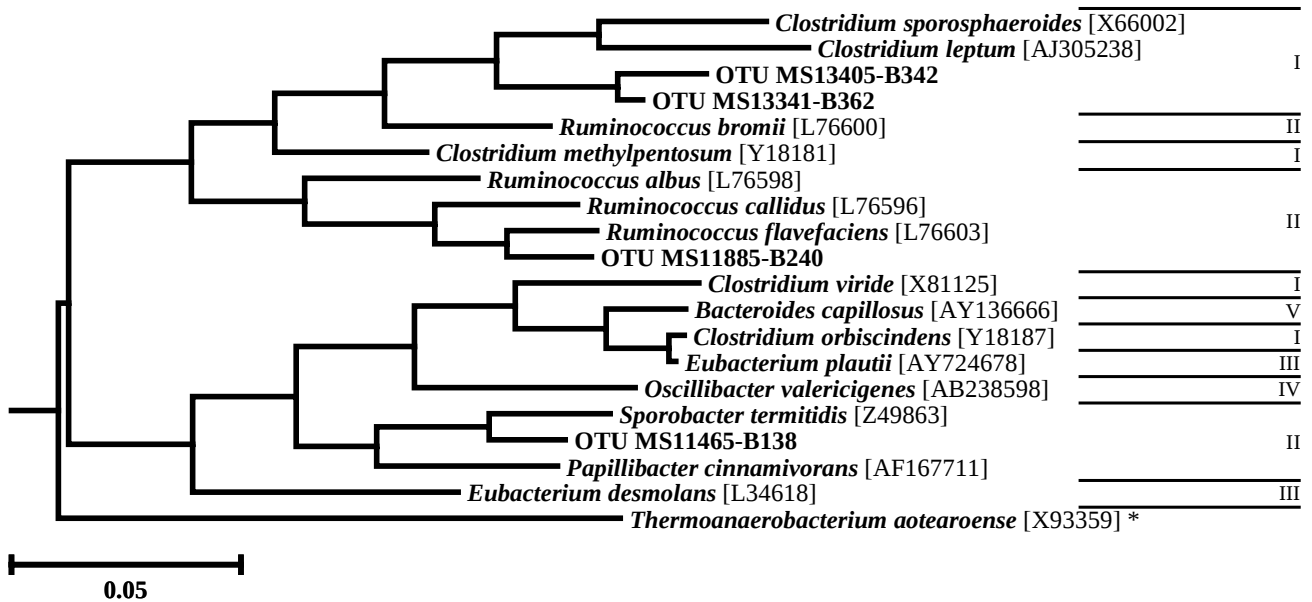


B

Abb. A-50: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Familie Ruminococcaceae; III: Familie Eubacteriaceae; IV: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

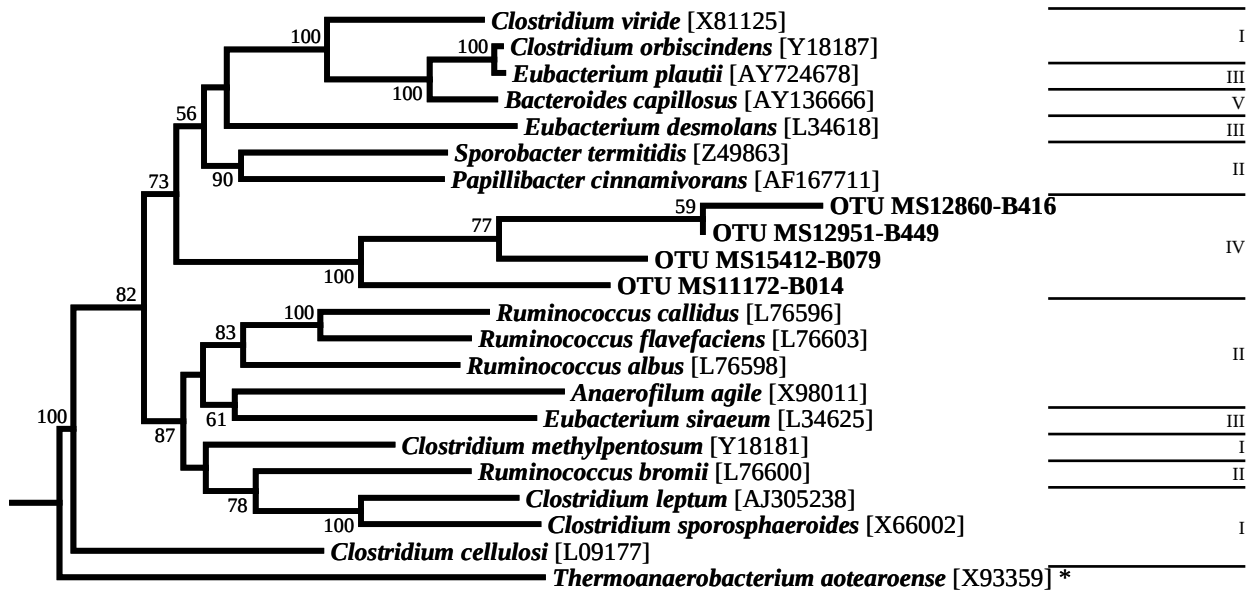


A

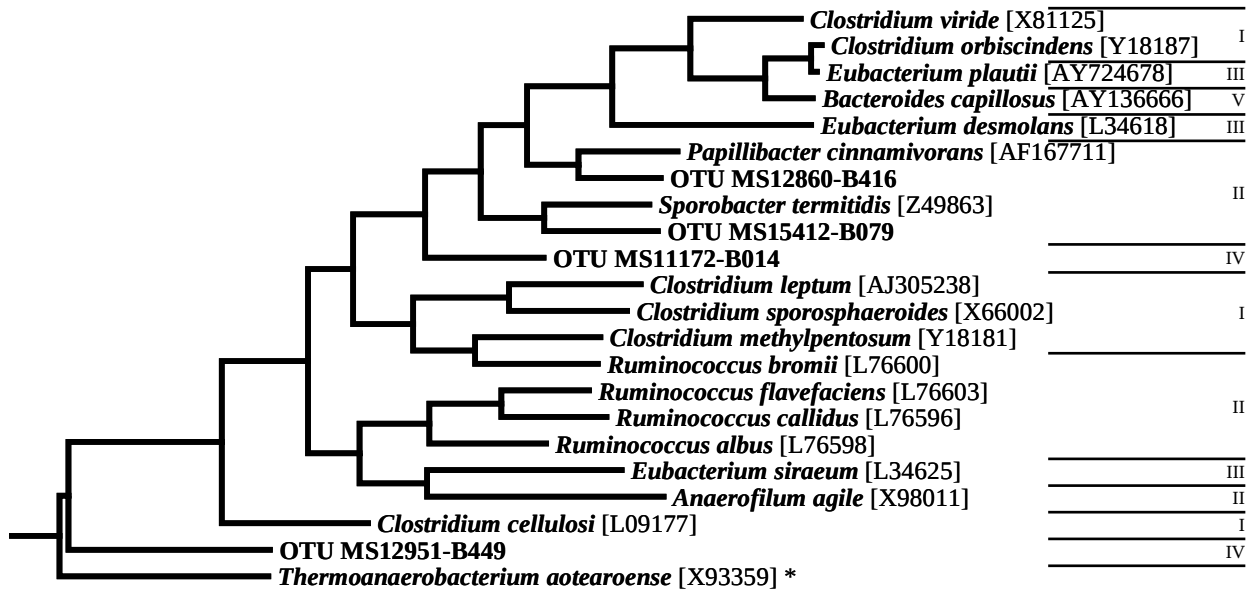


B

Abb. A-51: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Familie Ruminococcaceae; III: Familie Eubacteriaceae; IV: Familie Oscillospiraceae; V: Stamm Bacteroides. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-52: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Familie Ruminococcaceae; III: Familie Eubacteriaceae; IV: Genera incertae sedis; V: Stamm Bacteroides. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

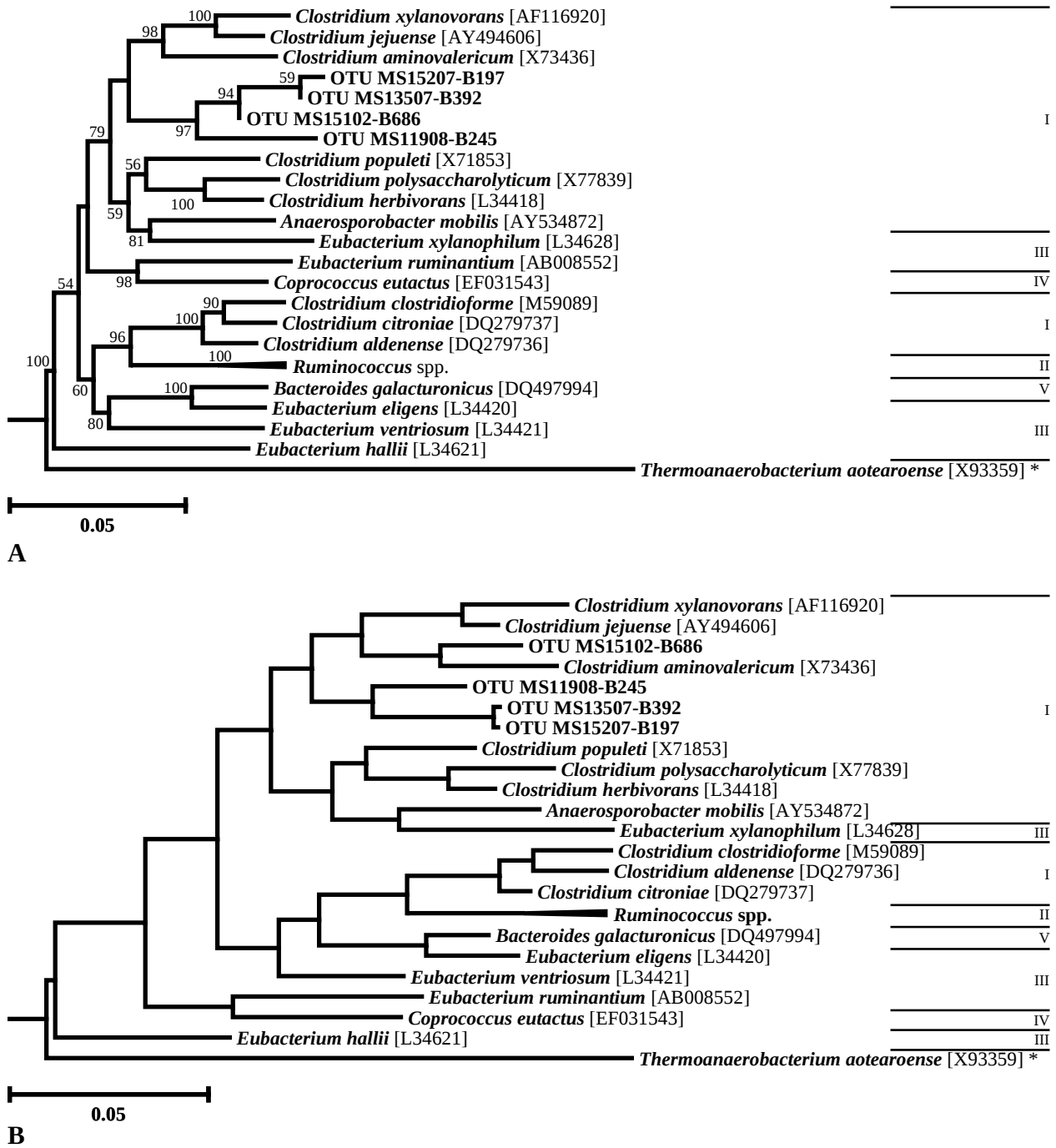


Abb. A-53: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Clostridiaceae; II: Familie Ruminococcaceae; III: Familie Eubacteriaceae; IV: Familie Lachnospiraceae; V: Stamm Bacteroides. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

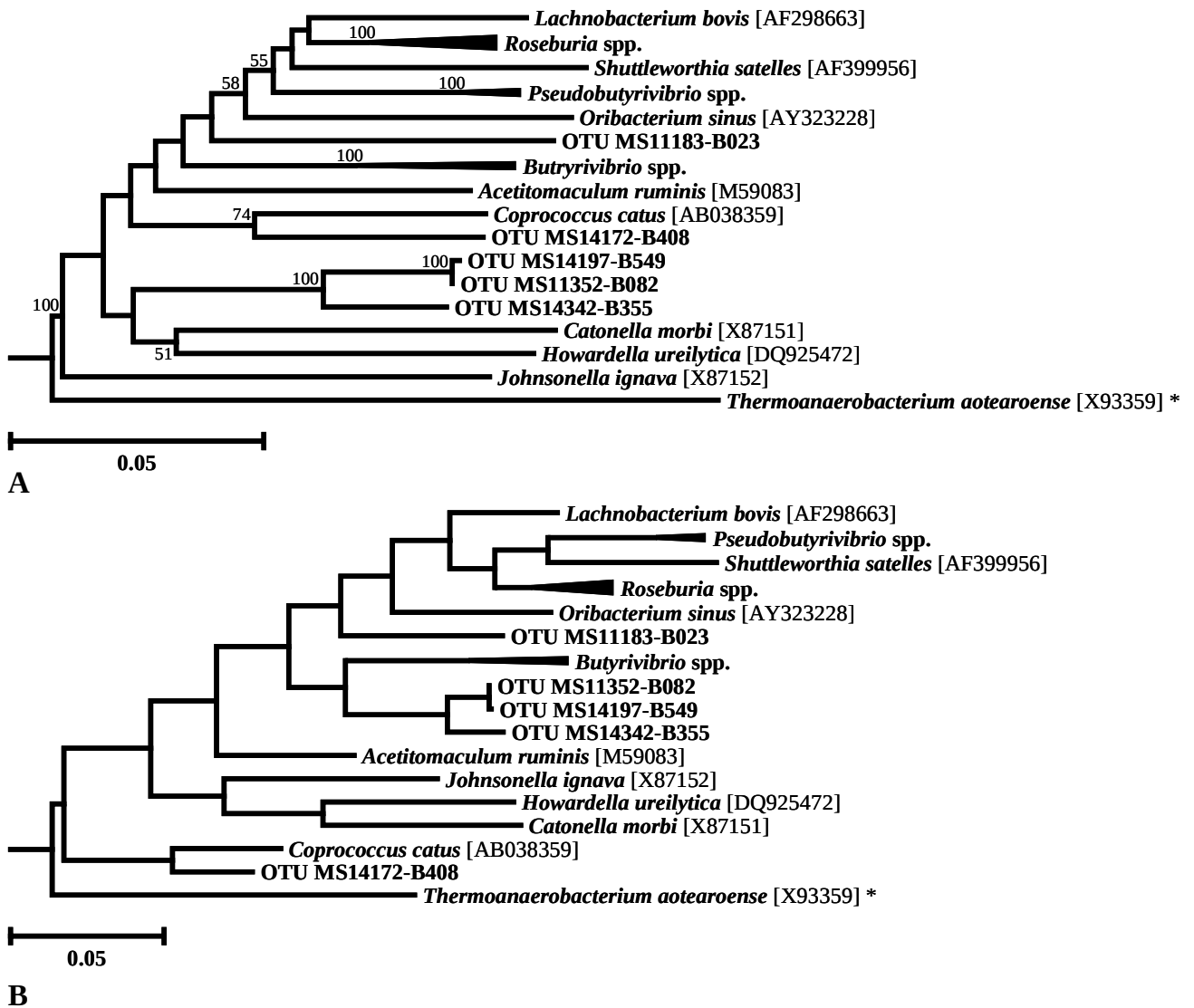


Abb. A-54: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**, Familie **Lachnospiraceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

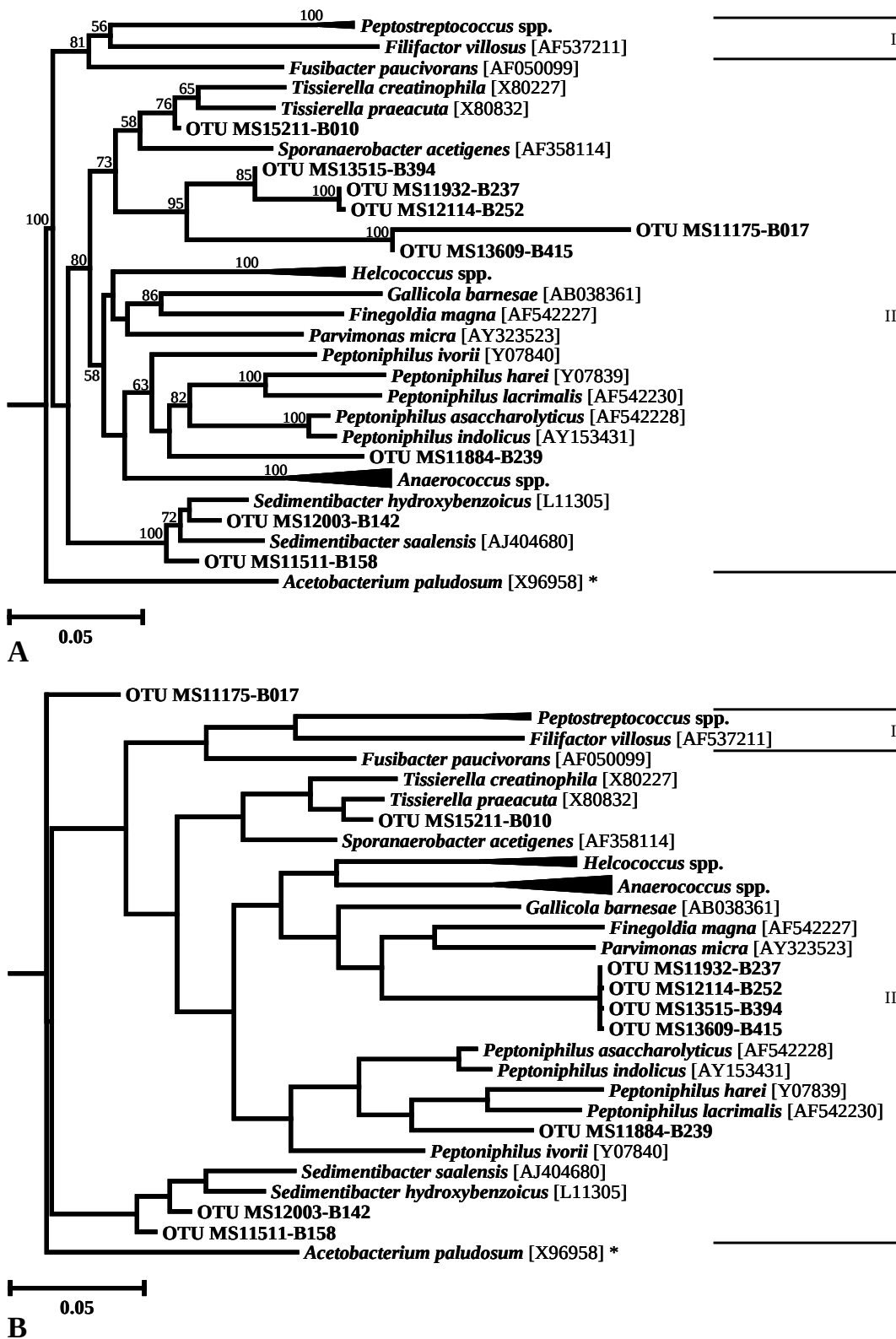
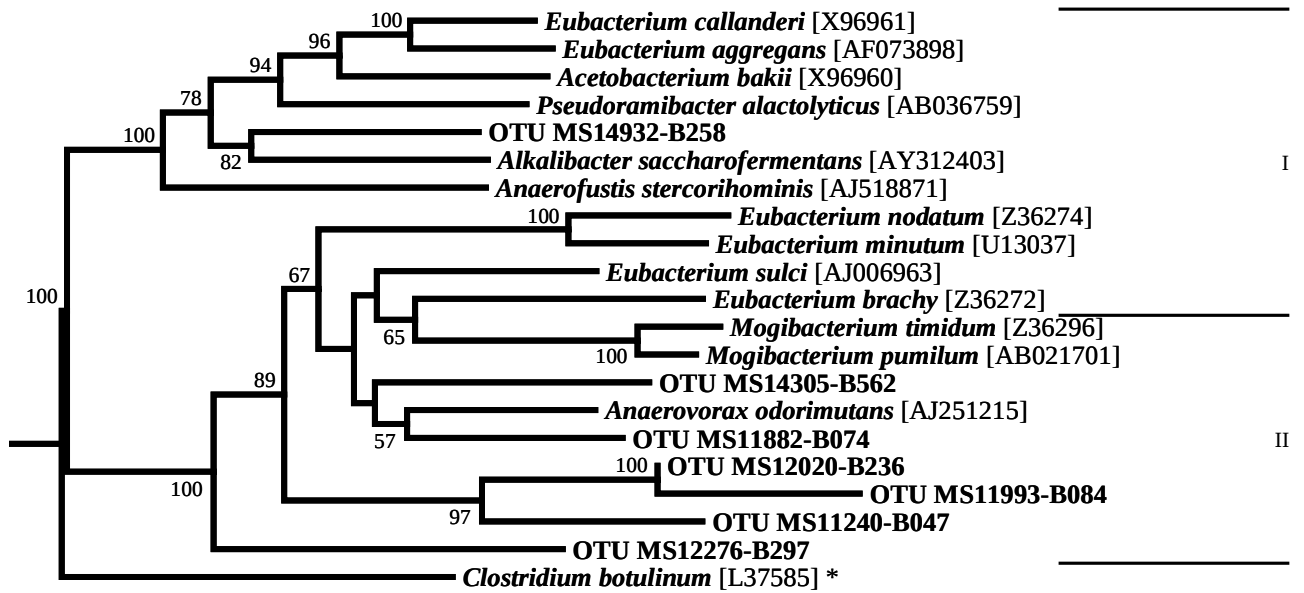
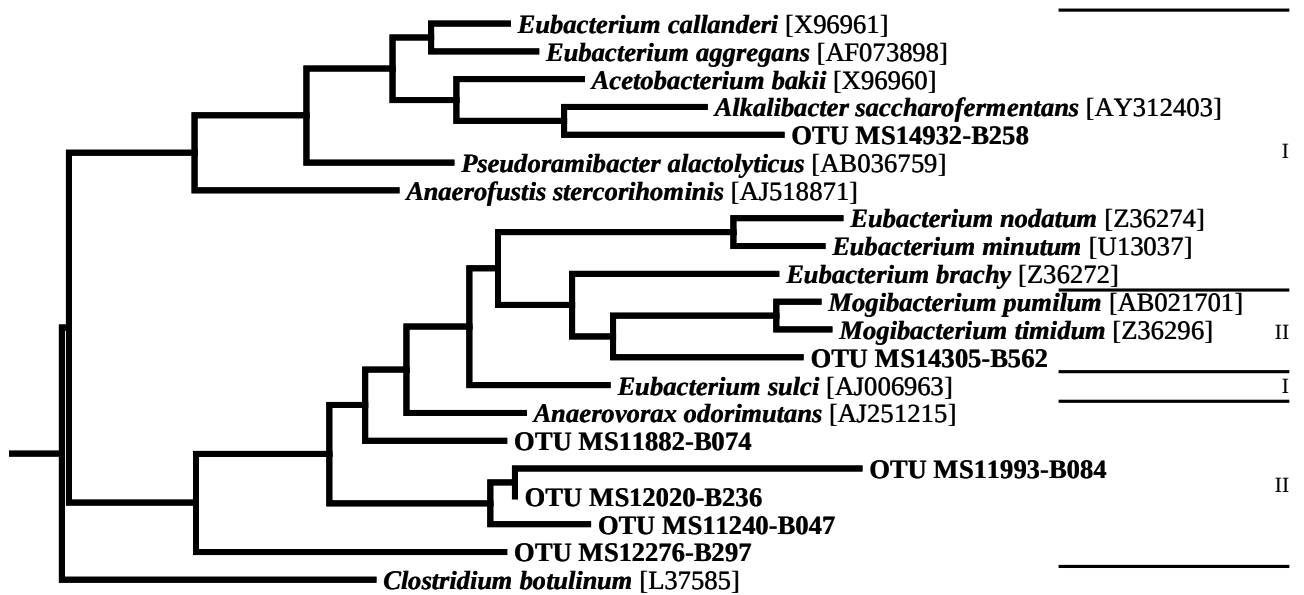


Abb. A-55: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Peptostreptococcaceae; II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

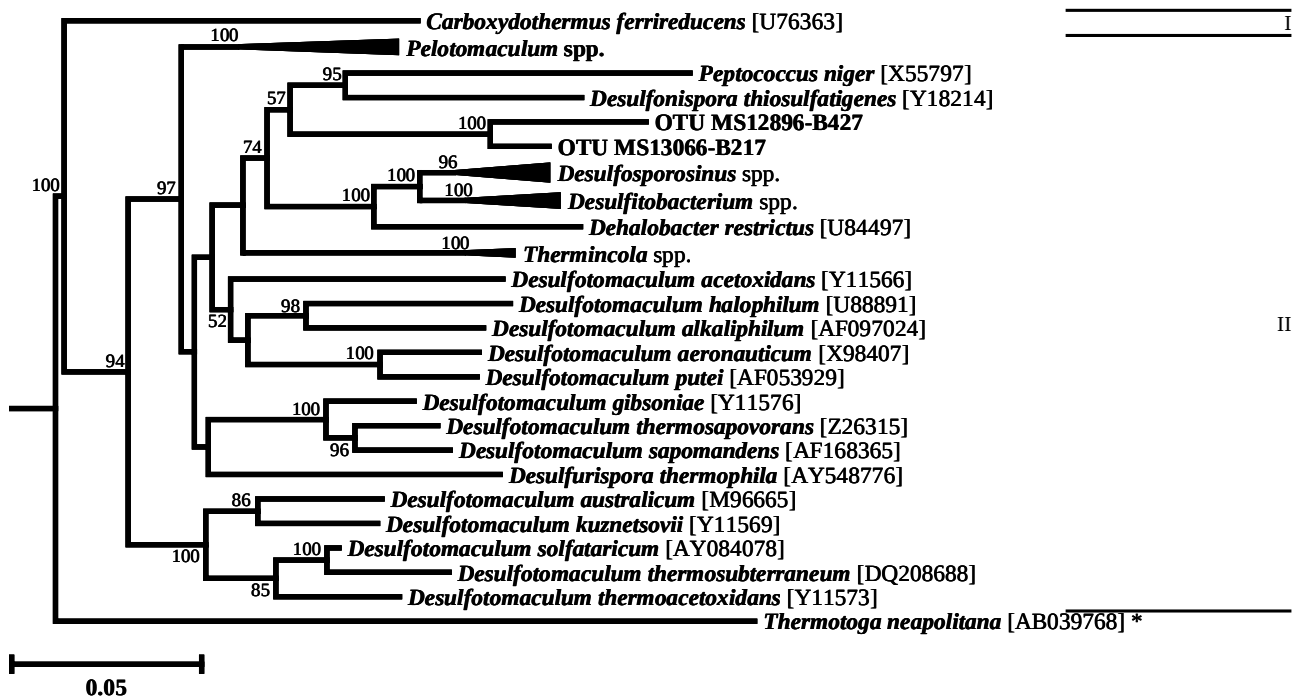


A

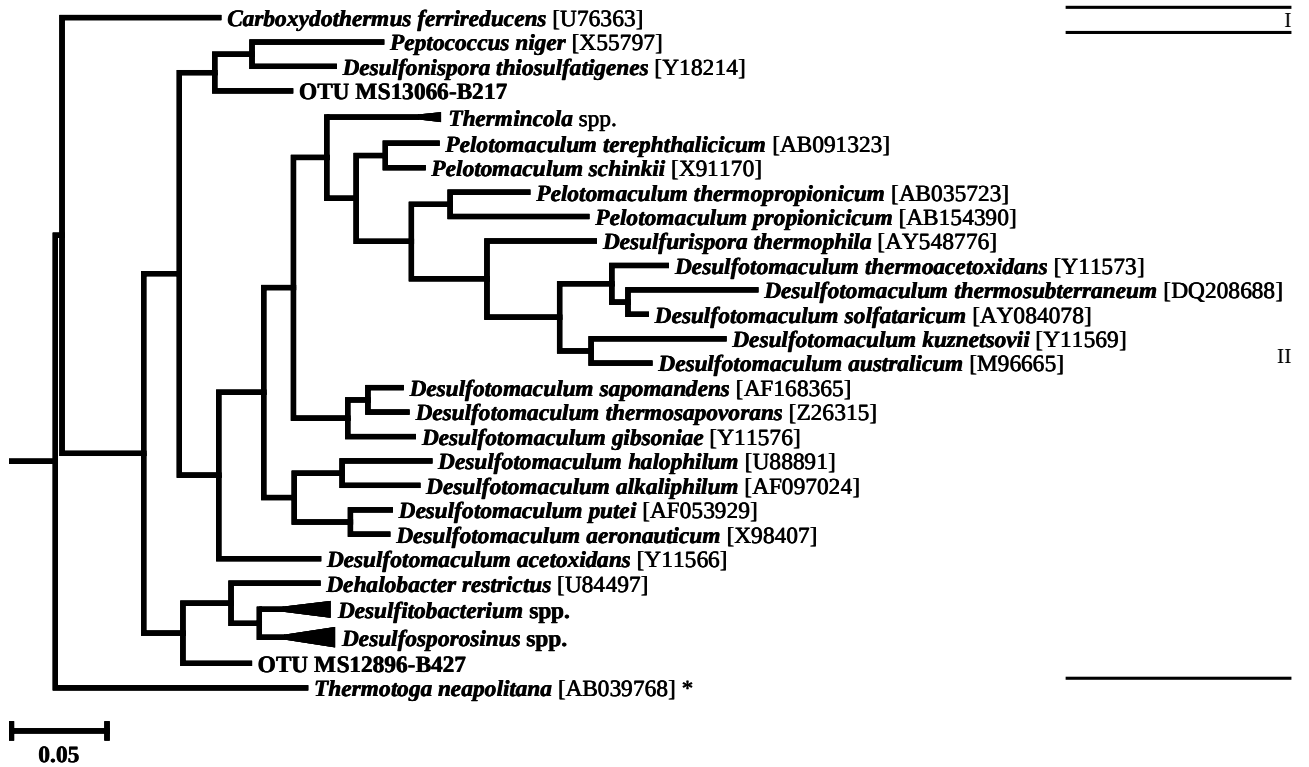


B

Abb. A-56: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm Firmicutes, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Clostridiales**. I: Familie Eubacteriaceae, II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-57: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**. I: Ordnung Thermoanaerobacterales; II: Ordnung Clostridiales (Familie Peptococcaceae). A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

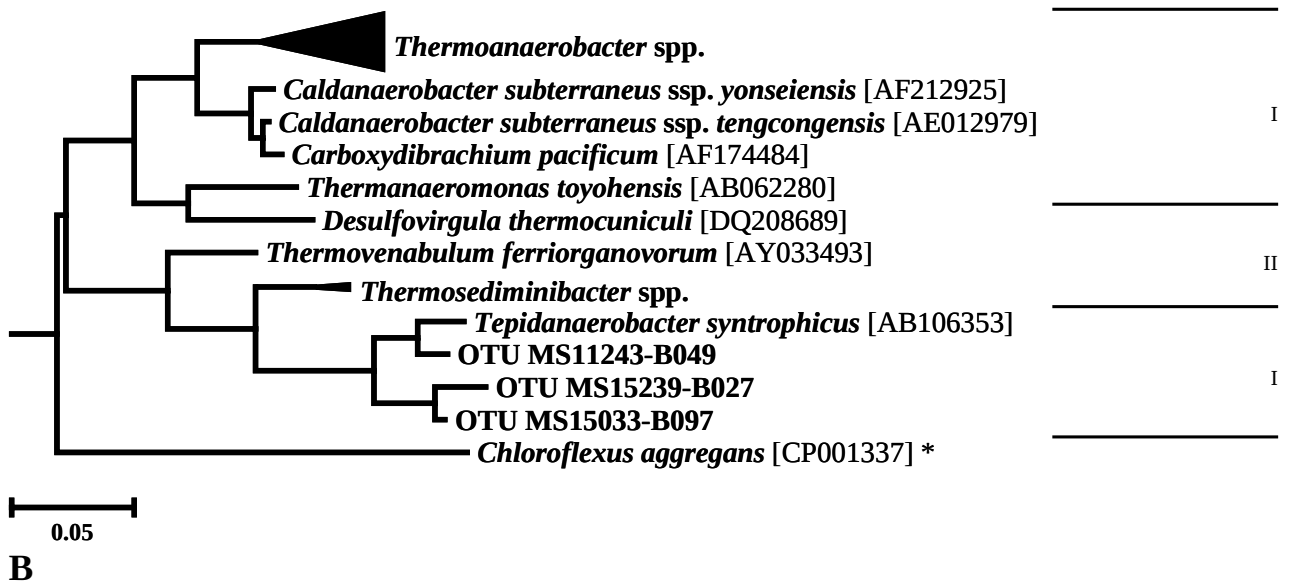
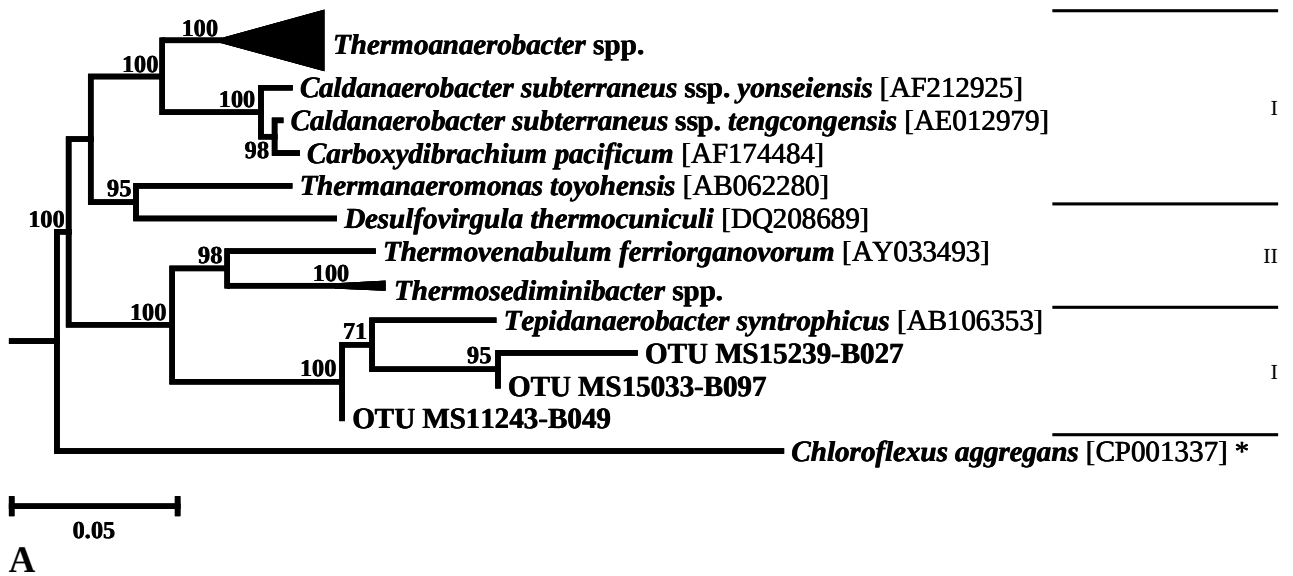


Abb. A-58: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacteriales**. I: Familie Thermoanaerobacteriaceae; II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

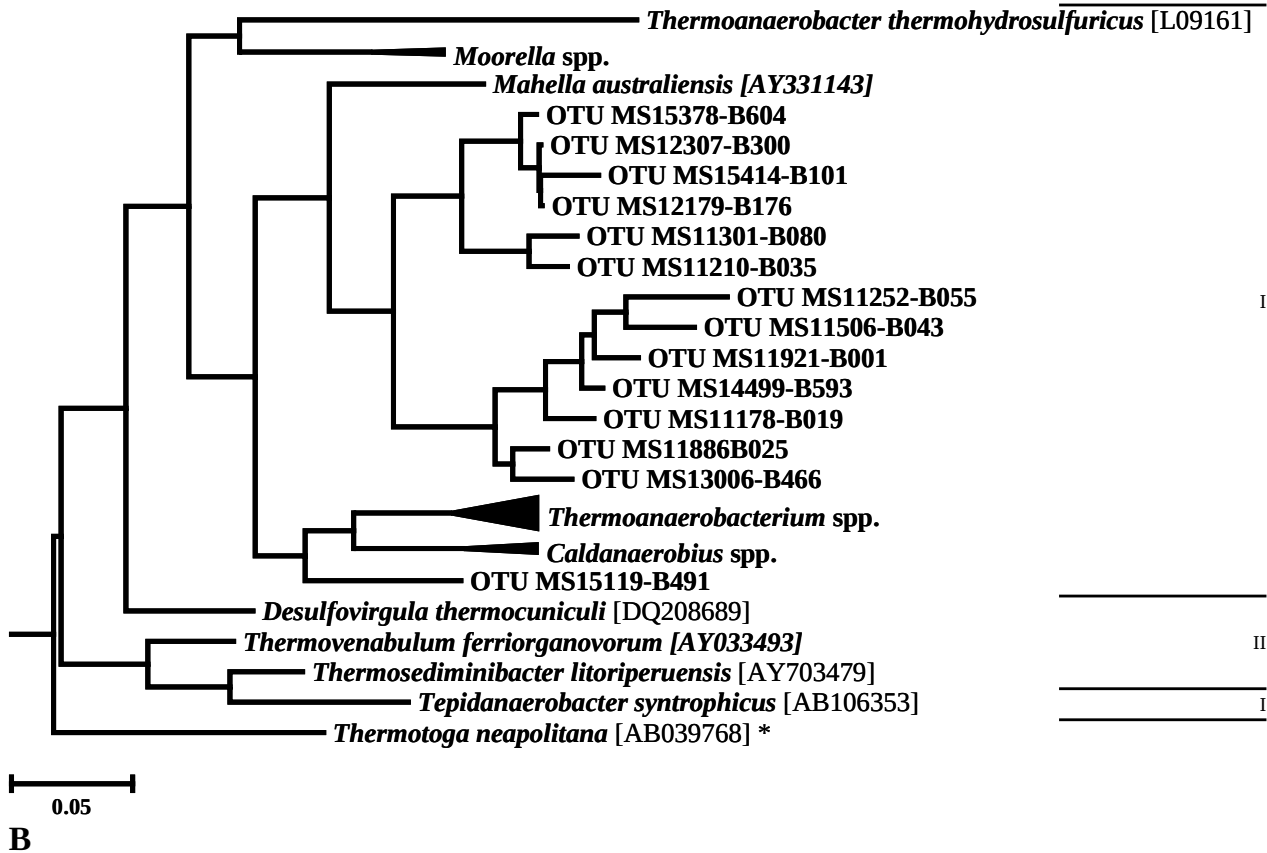
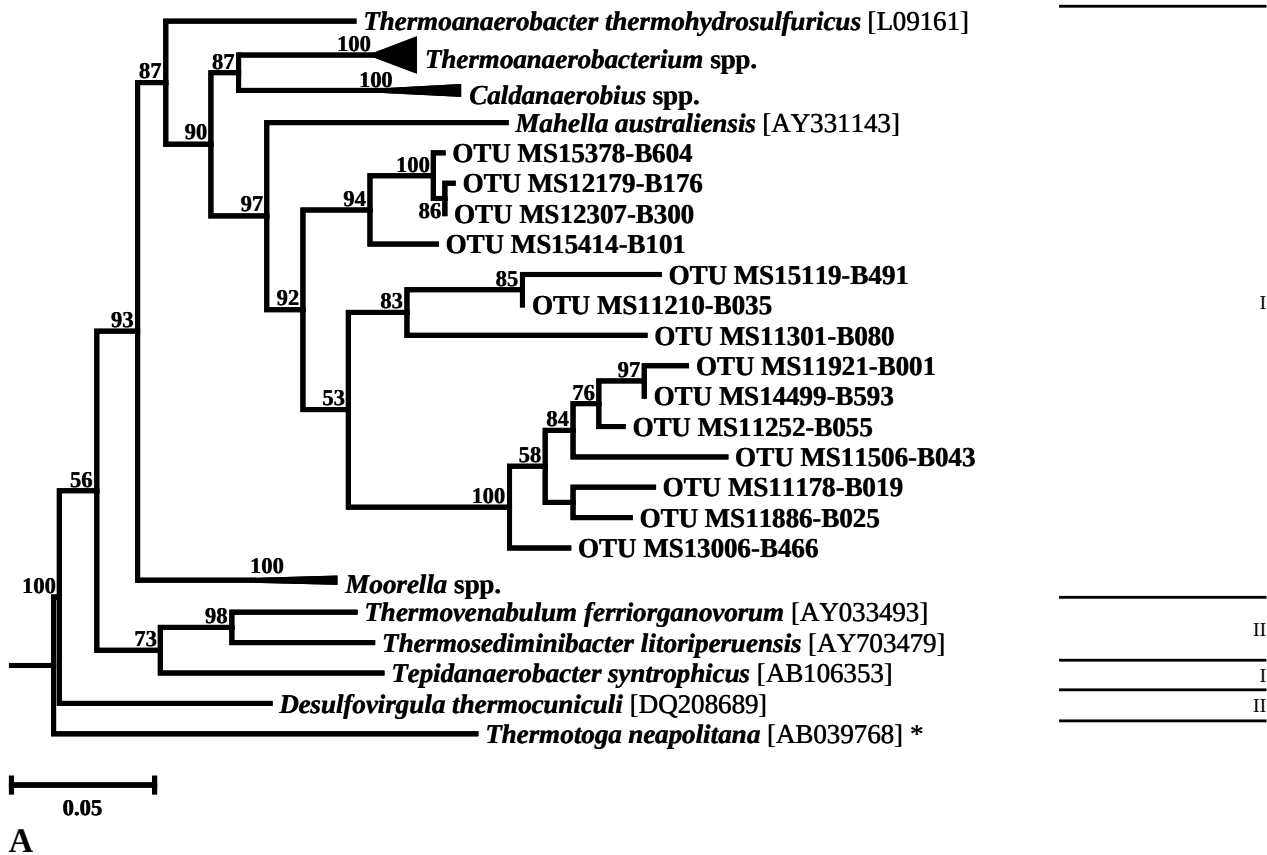
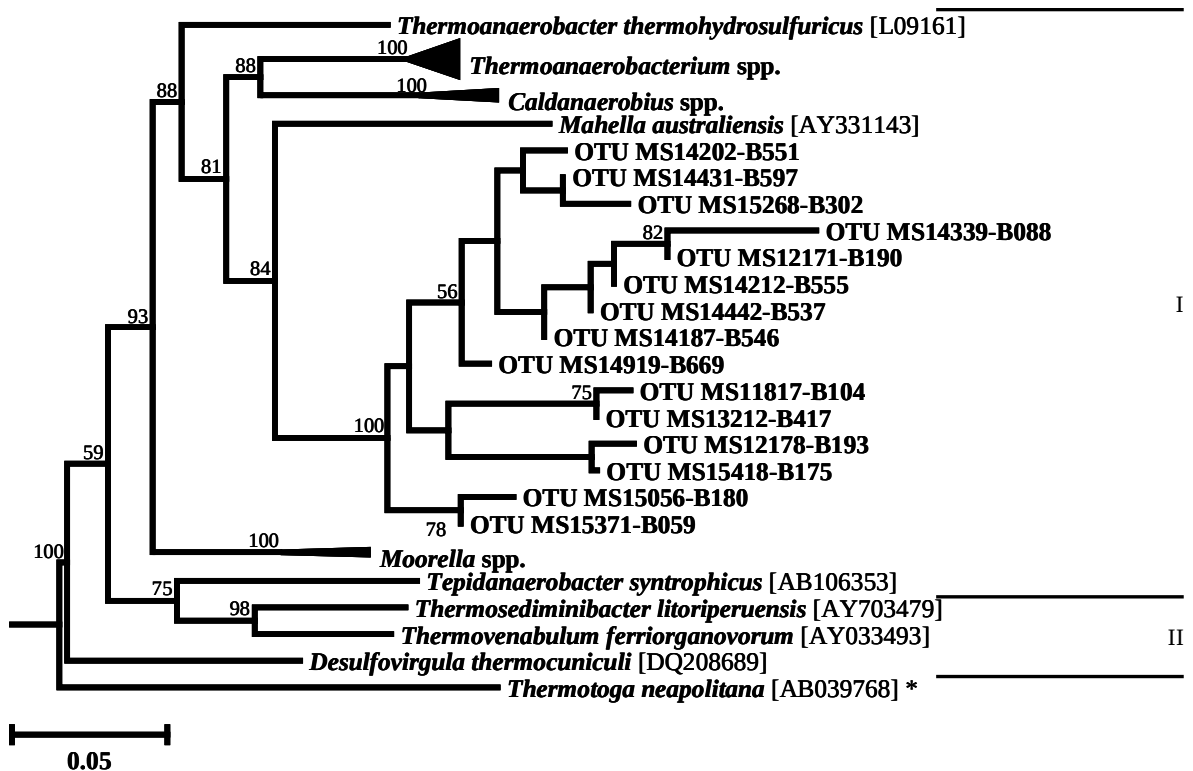
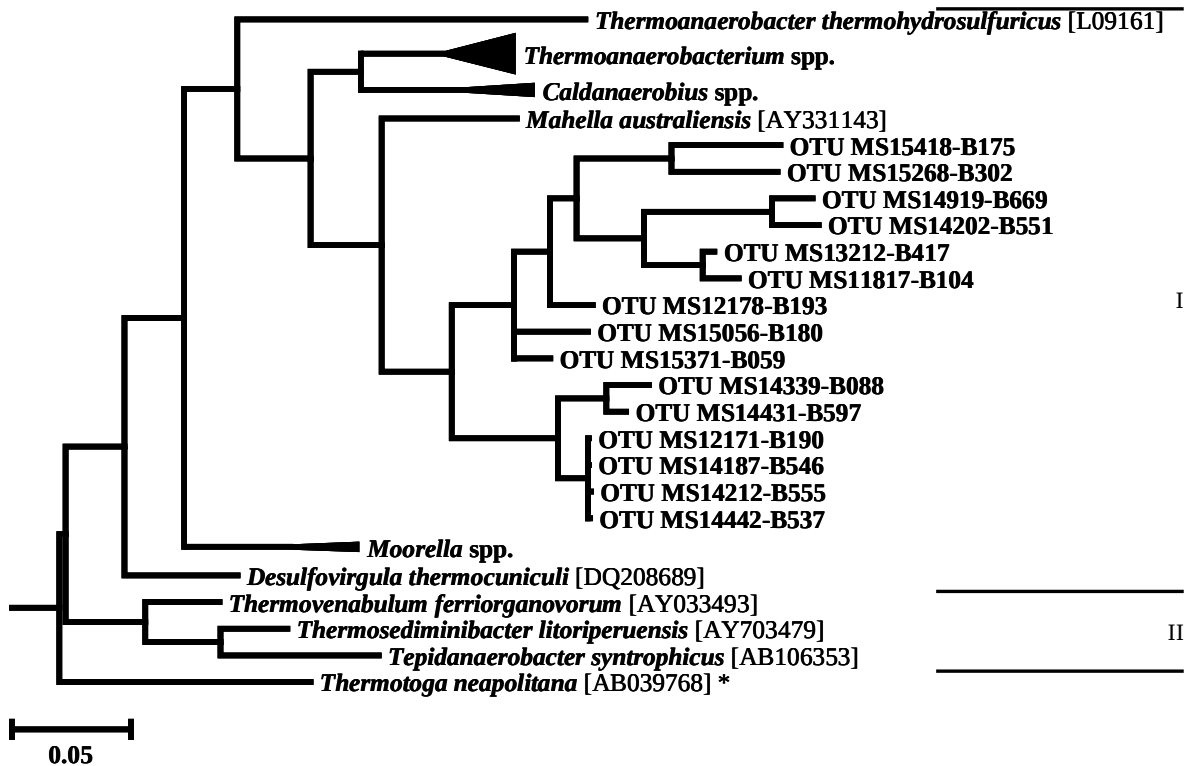


Abb. A-59: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacterales**. I: Familie Thermoanaerobacteriaceae; II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-60: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacteriales**. I: Familie Thermoanaerobacteriaceae; II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

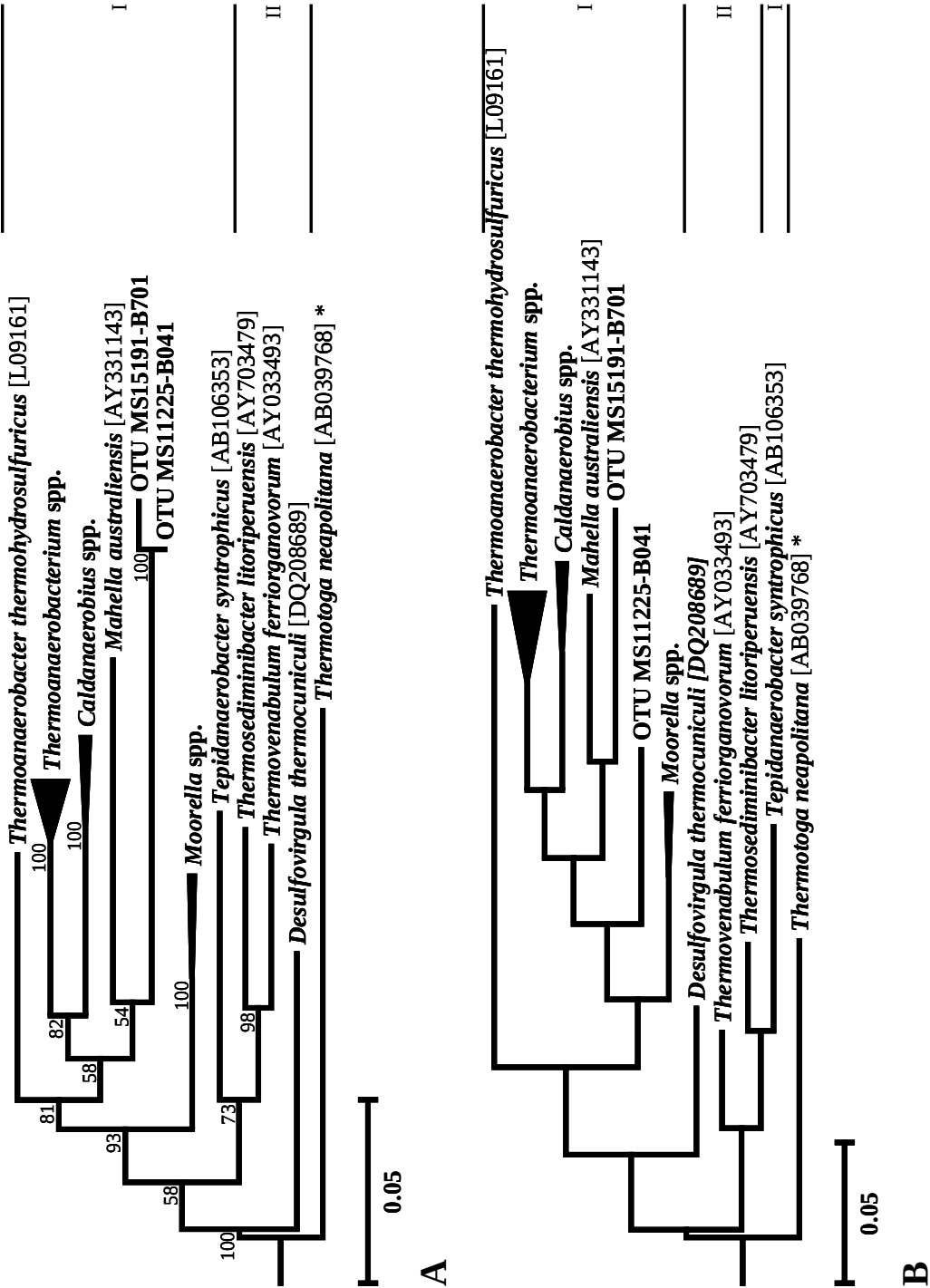
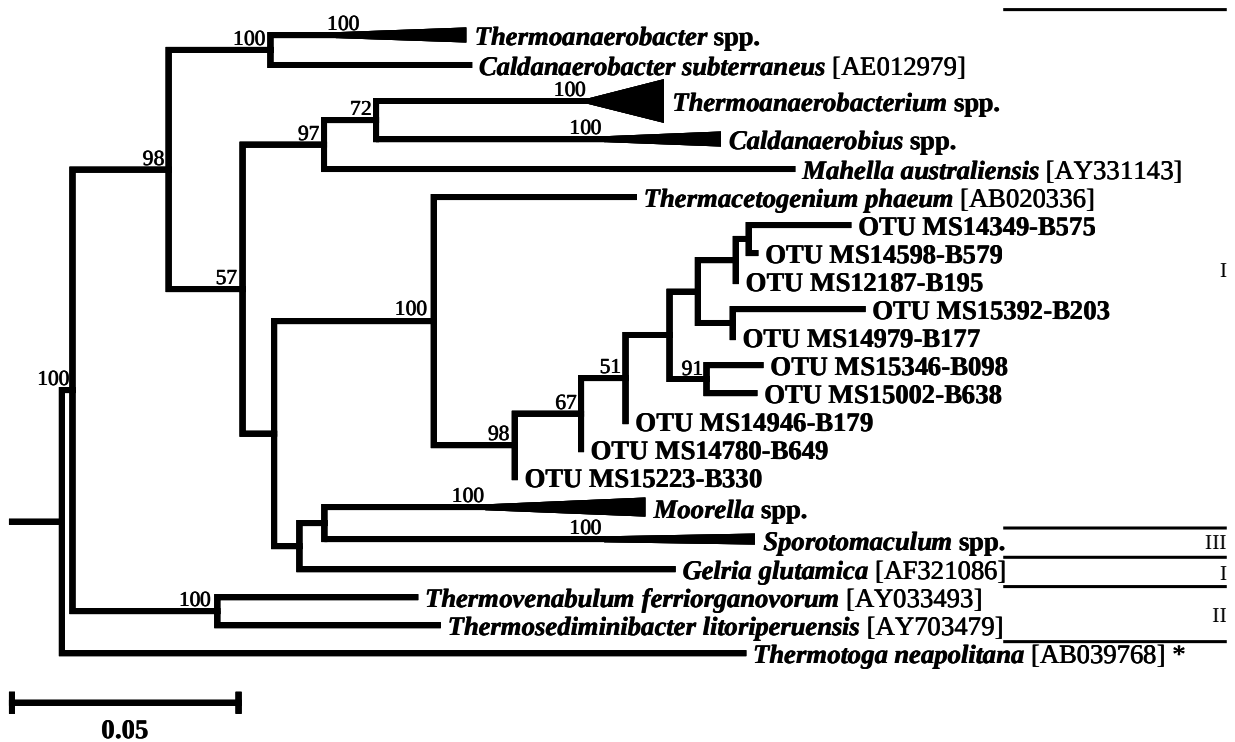
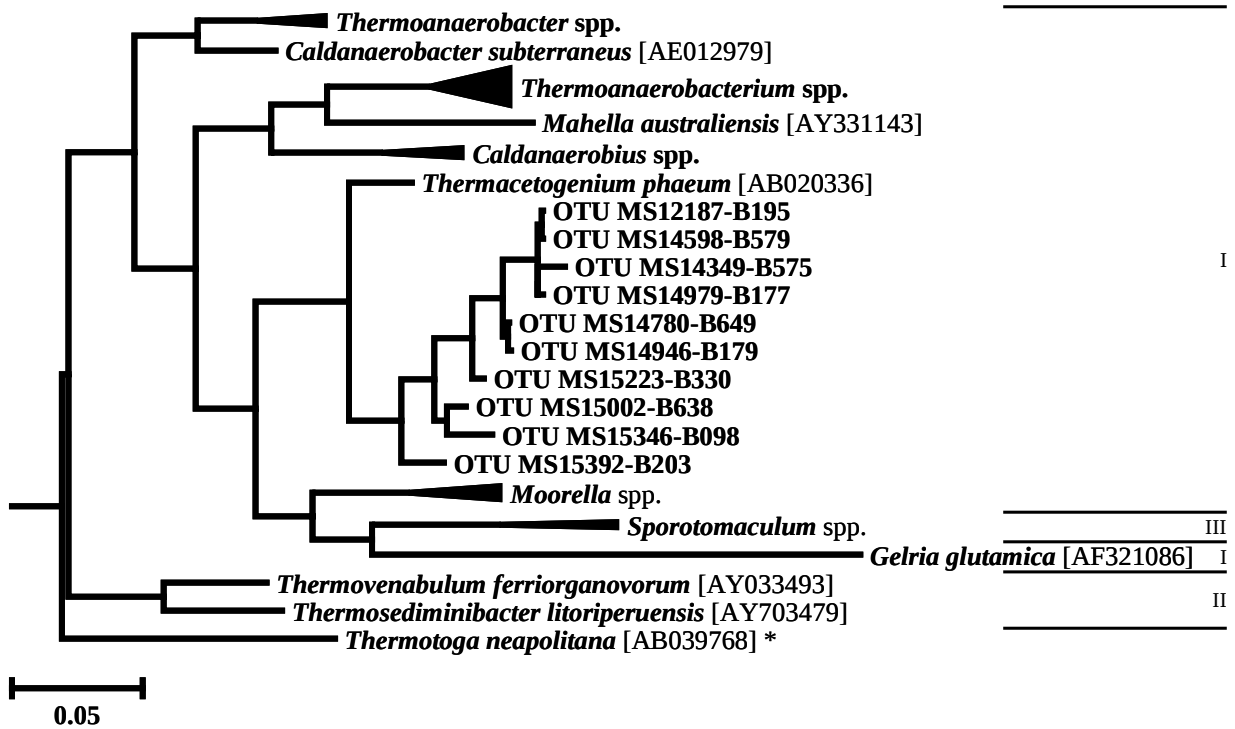


Abb. A-61: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacterales**. I: Familie Thermoanaerobacteriaceae; II: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-62: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**, Ordnung **Thermoanaerobacteriales** (I-II) und Ordnung **Clostridiales** (III). I: Familie Thermoanaerobacteriaceae; II: Genera incertae sedis; III: Peptococcaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

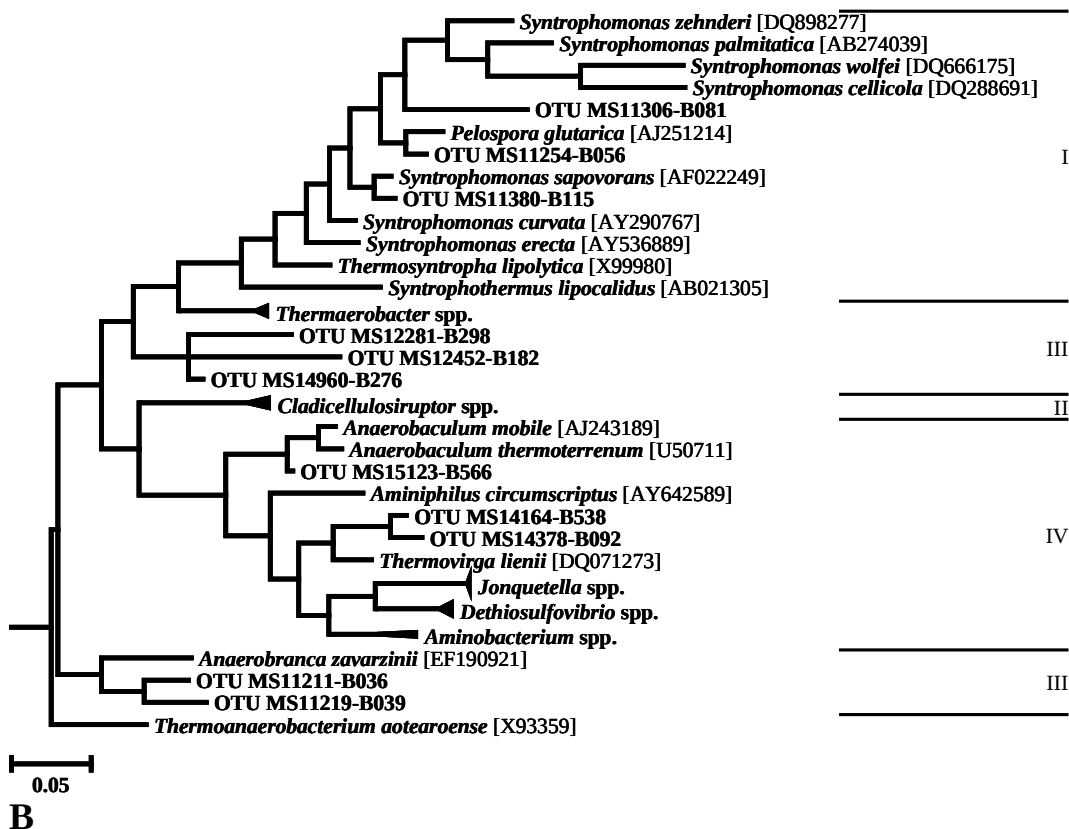
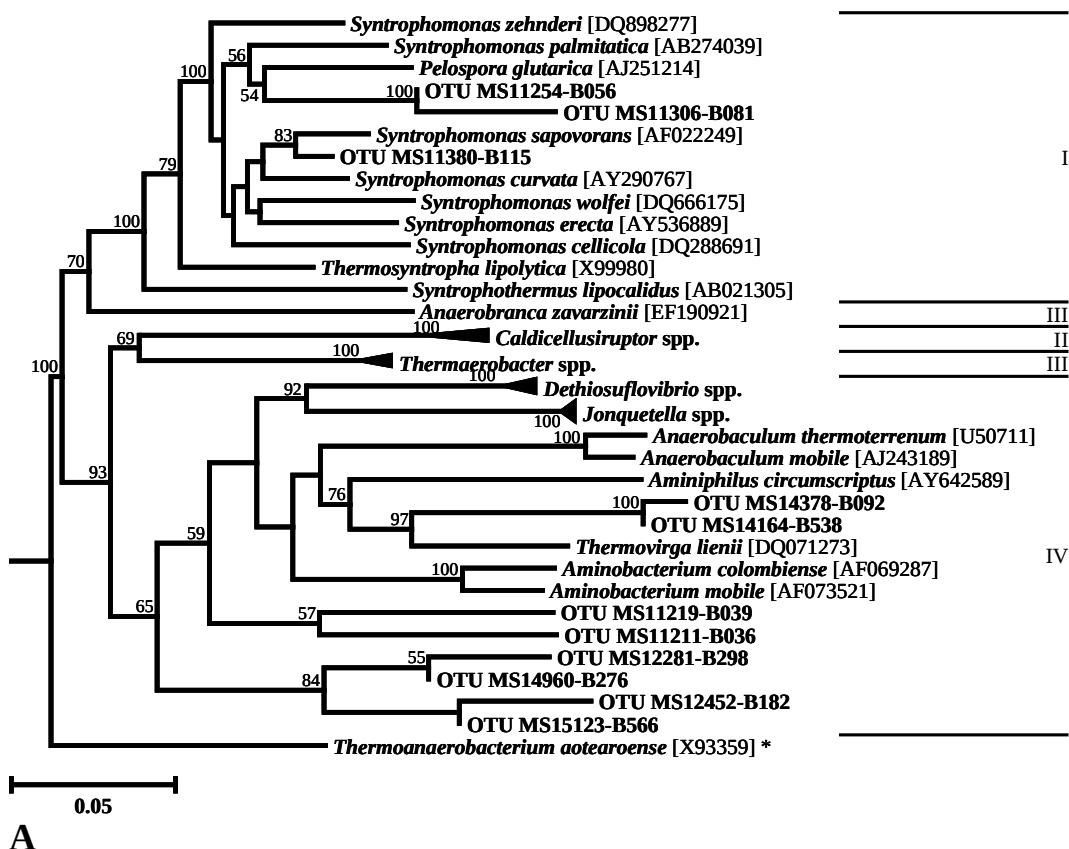


Abb. A-63: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia** (I-III) und Stamm **Synergistes**, Klasse **Synergistia** (IV). I: Ordnung Clostridiales (Familie Syntrophomonadaceae); II: Ordnung Thermoanaerobacterales; III: Genera incertae sedis; IV: Ordnung Synergistales (Familie Synergistaceae). A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

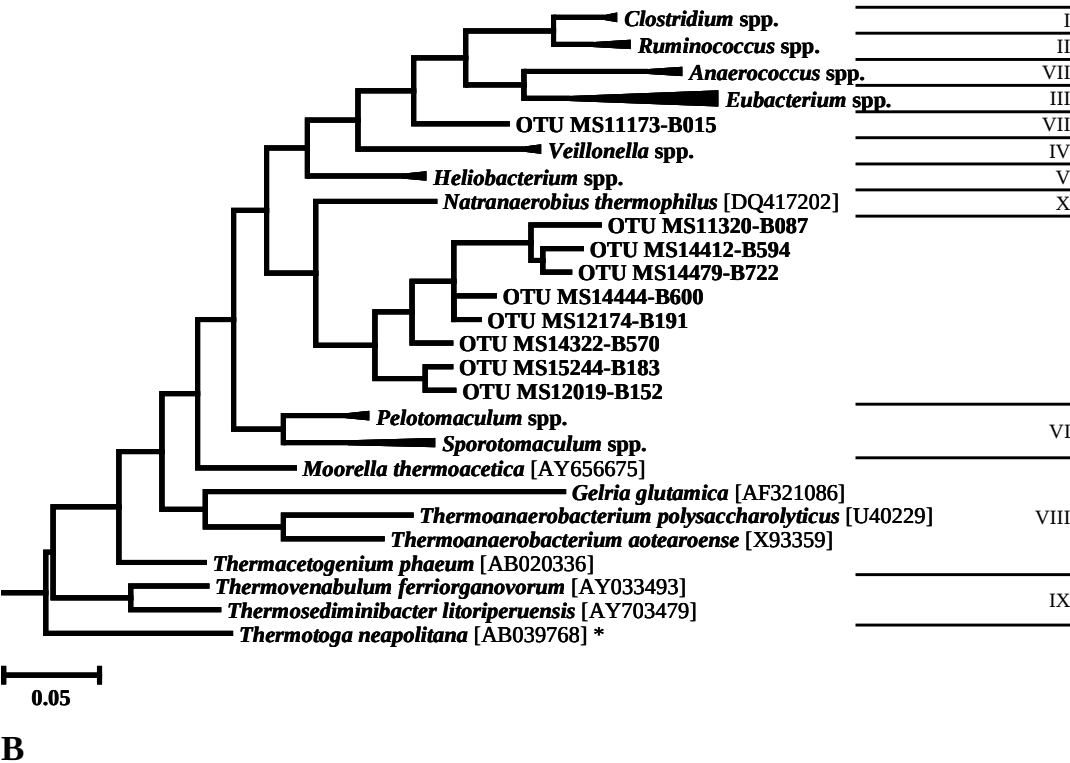
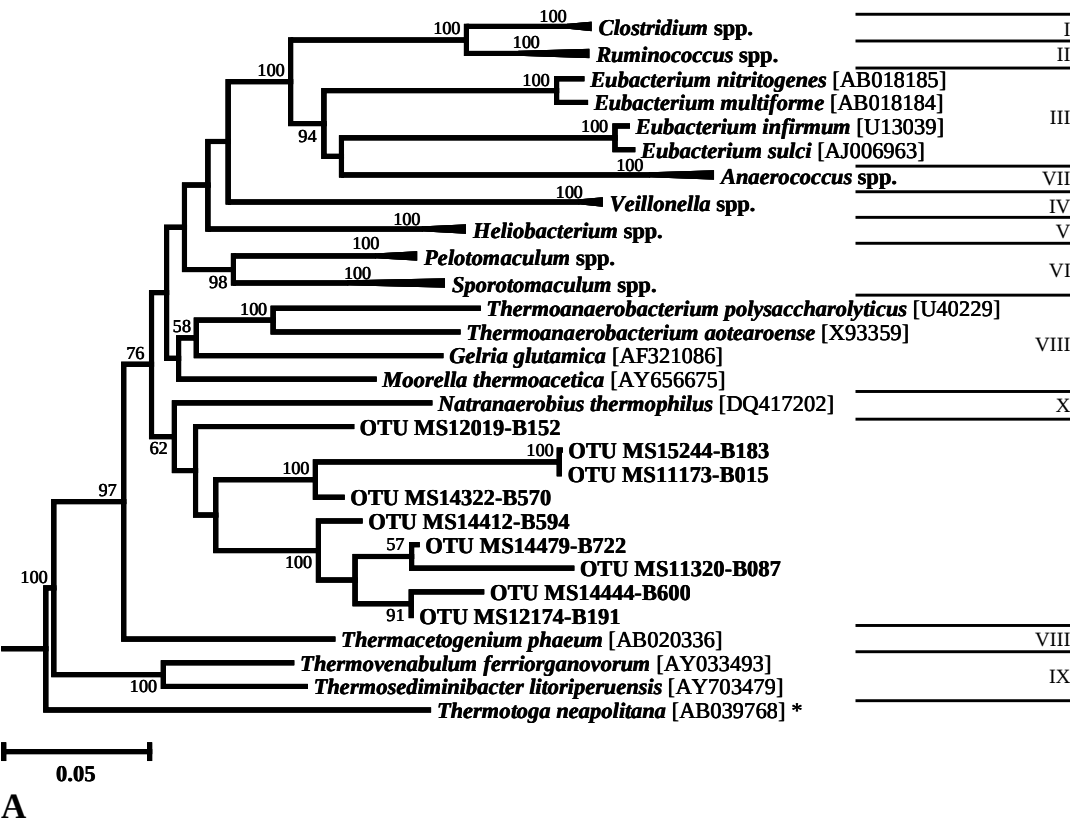
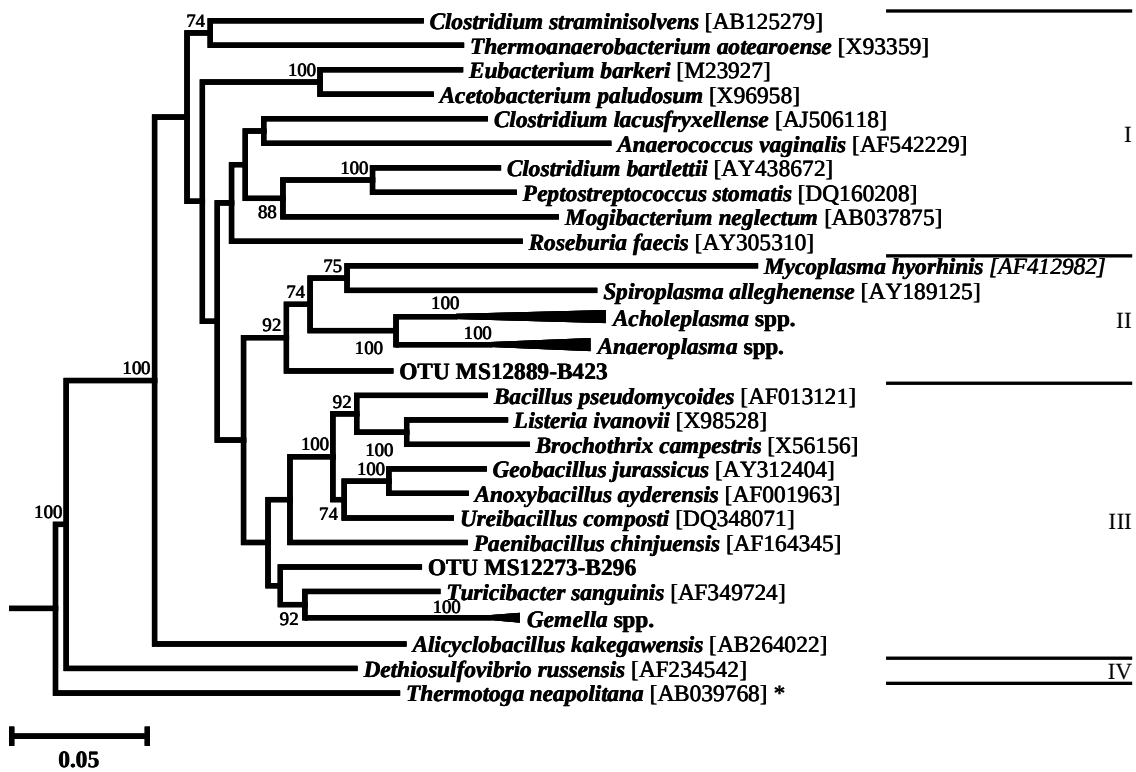
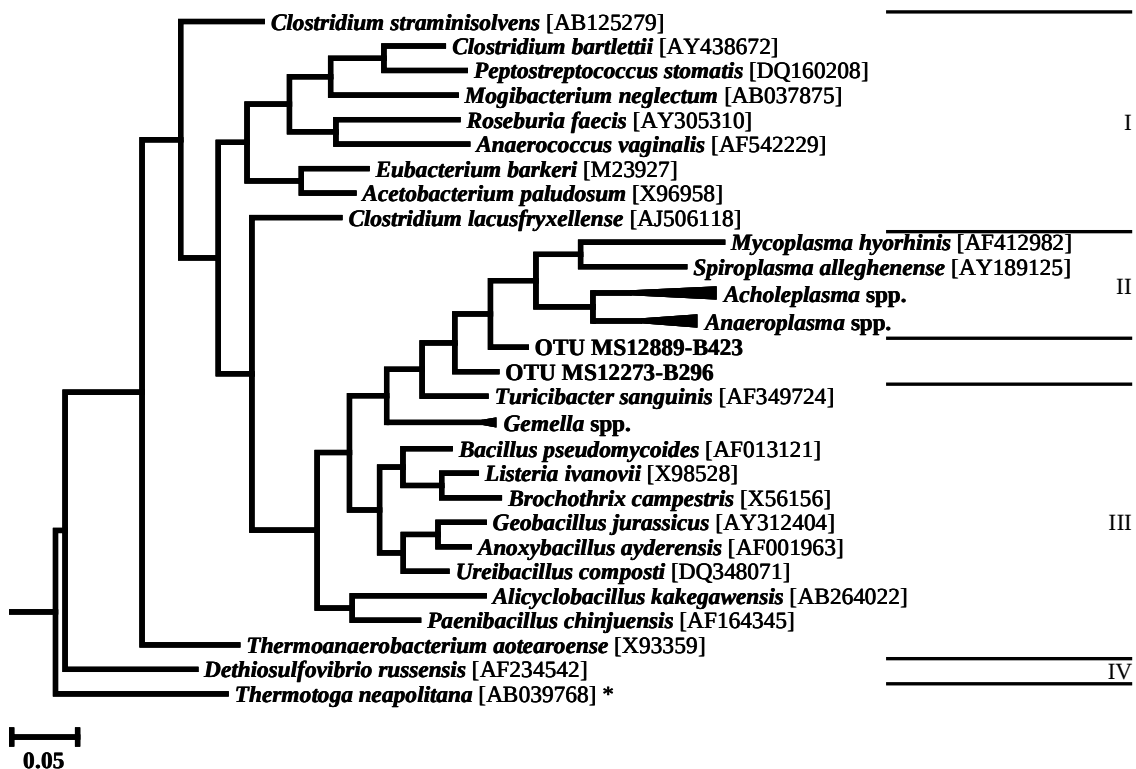


Abb. A-64: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Clostridia**. I-VII: Ordnung Clostridiales (I: Familie Clostridiaceae, II: Familie Ruminococcaceae, III: Familie Eubacteriaceae, IV: Familie Veillonellaceae, V: Familie Heliobacteriaceae, VI: Familie Peptococcaceae, VII: Genera incertae sedis); VIII-IX: Ordnung Thermobacteriales (VIII: Familie Thermobacteriaceae, IX: Genera incertae sedis); X: Ordnung Natranaerobiales, Familie Natranaerobiaceae. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.



A



B

Abb. A-65: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**. I: Klasse Clostridia; II: Klasse Mollicutes; III: Klasse Bacilli; IV: Stamm Synergistetes. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

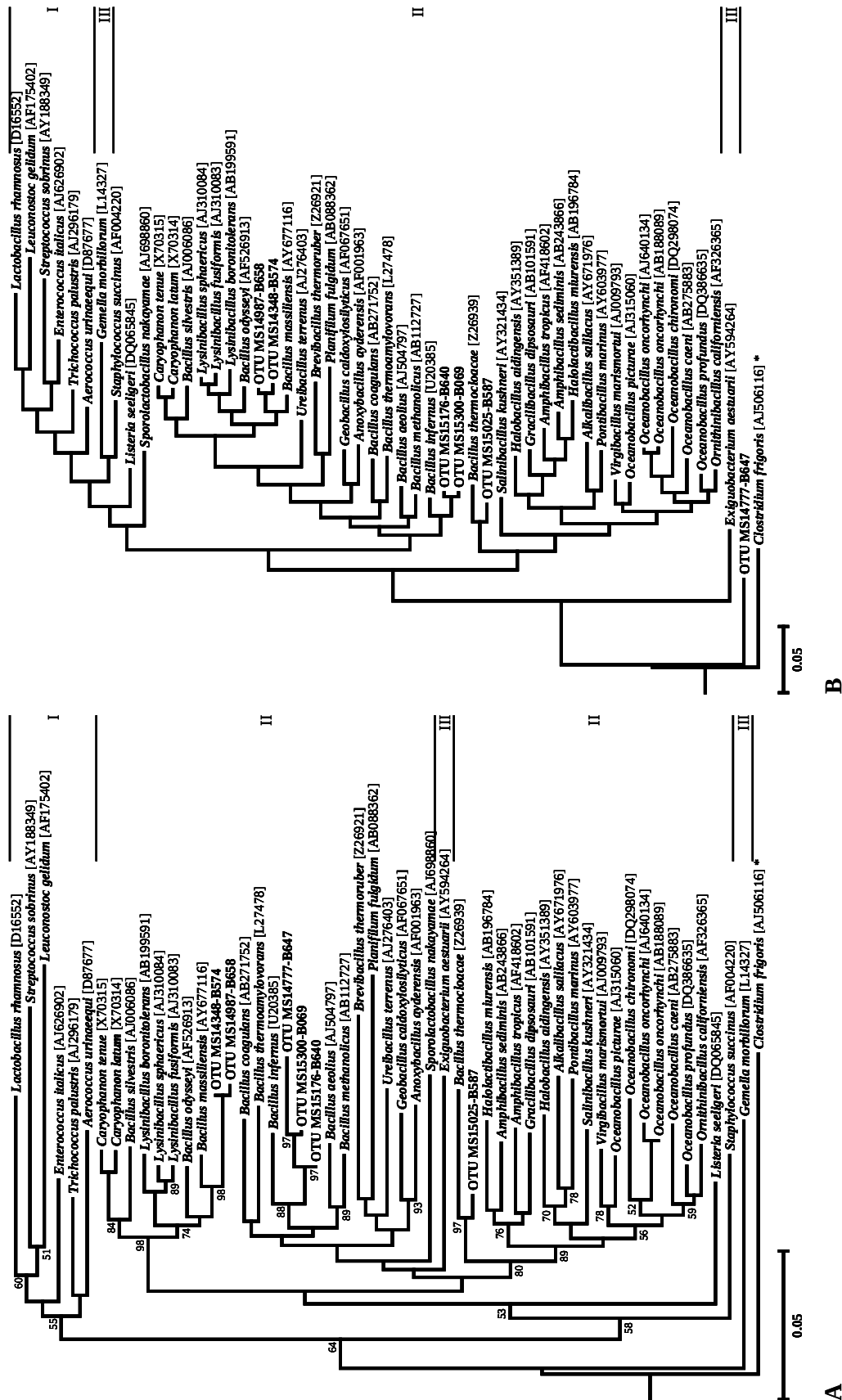


Abb. A-66: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**. I: Ordnung Lactobacillales; II: Ordnung Bacillales; III: Genera incertae sedis. Eine detailliertere Darstellung der Lactobacillales findet sich in Abb. A-25. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

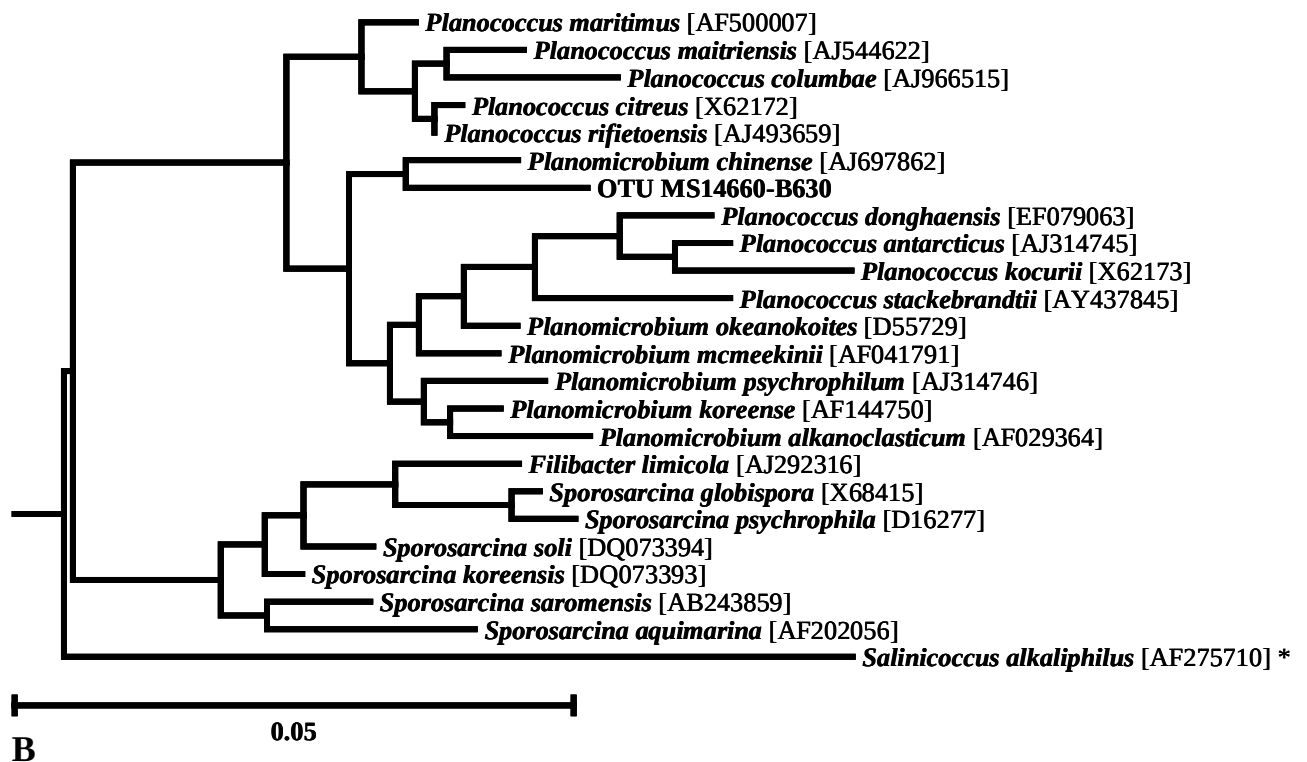
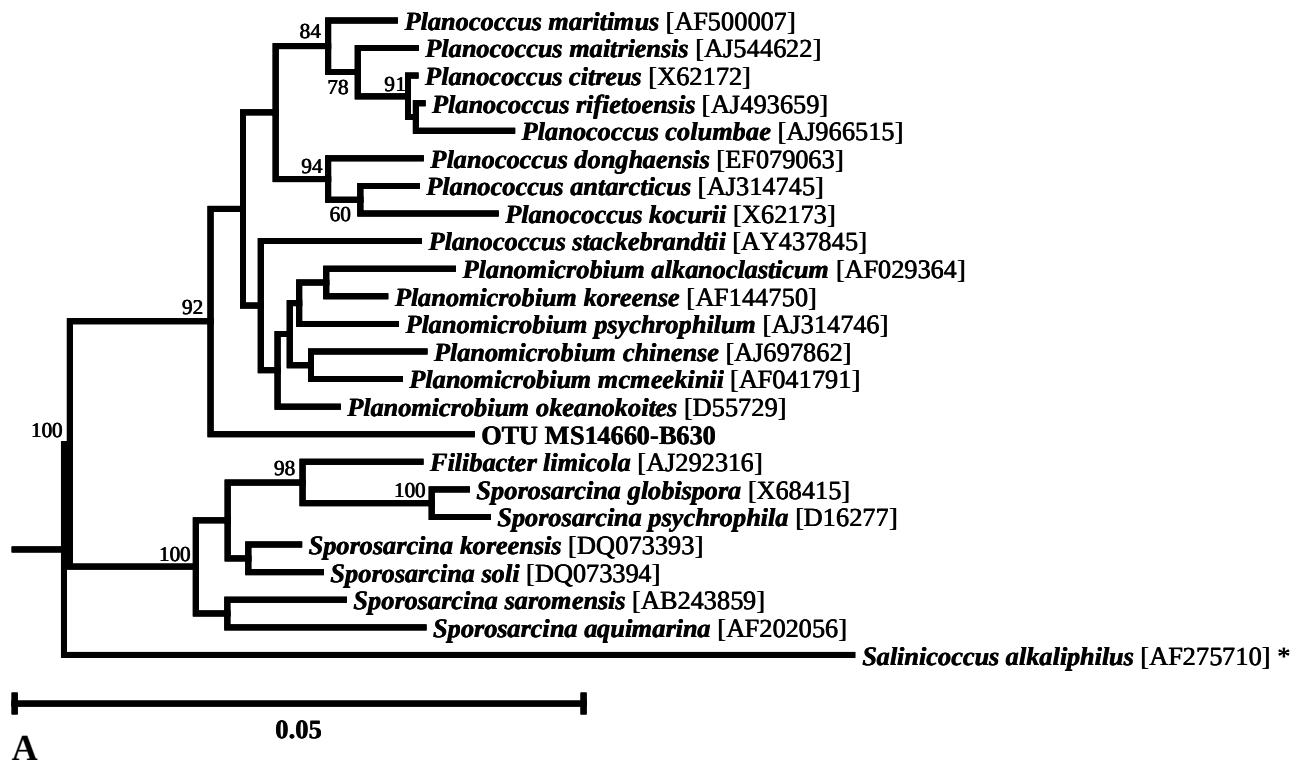


Abb. A-67: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Bacillales**, Familie **Planococcaceae**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

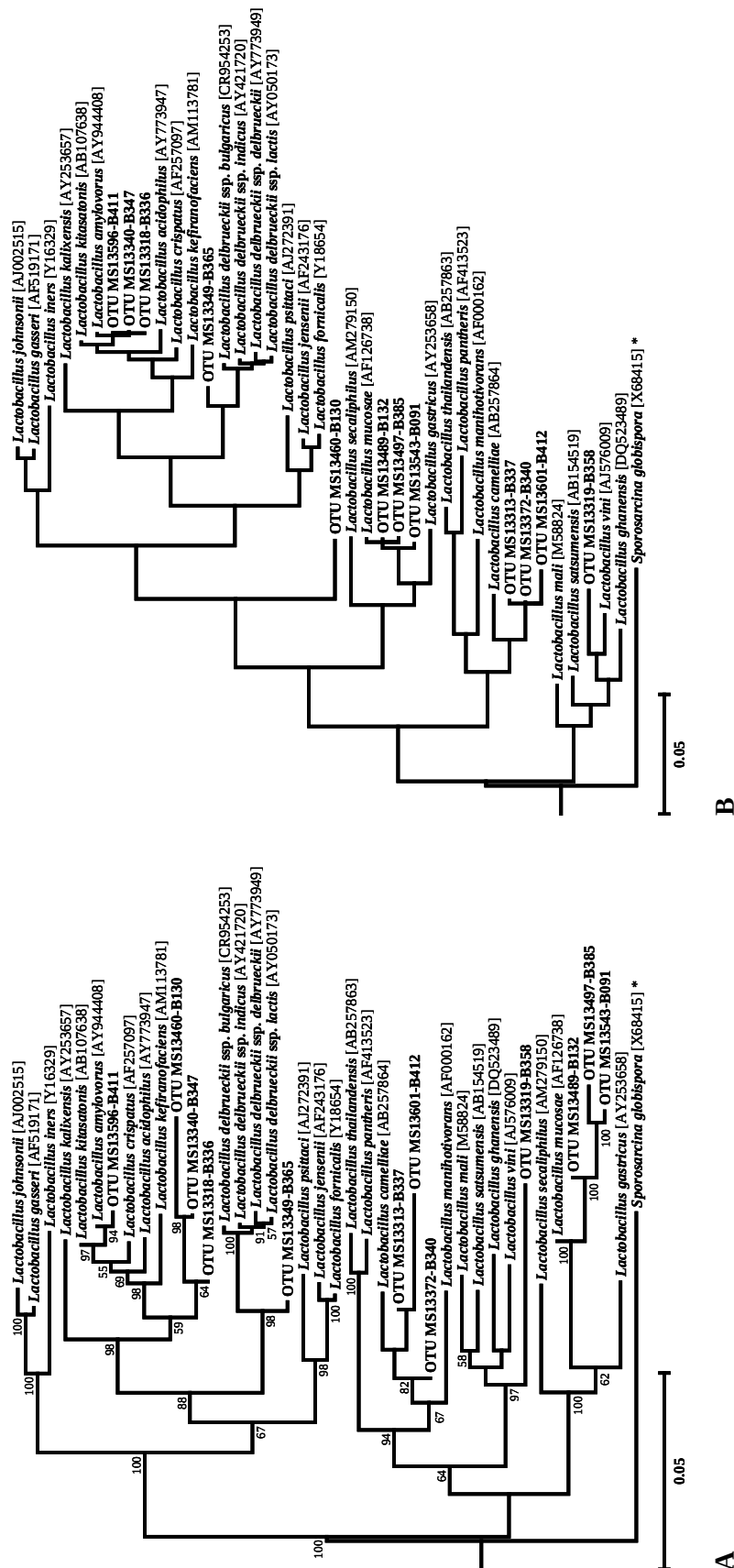


Abb. A-68: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Lactobacillales**, Familie **Lactobacillaceae**, Gattung **Lactobacillus**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

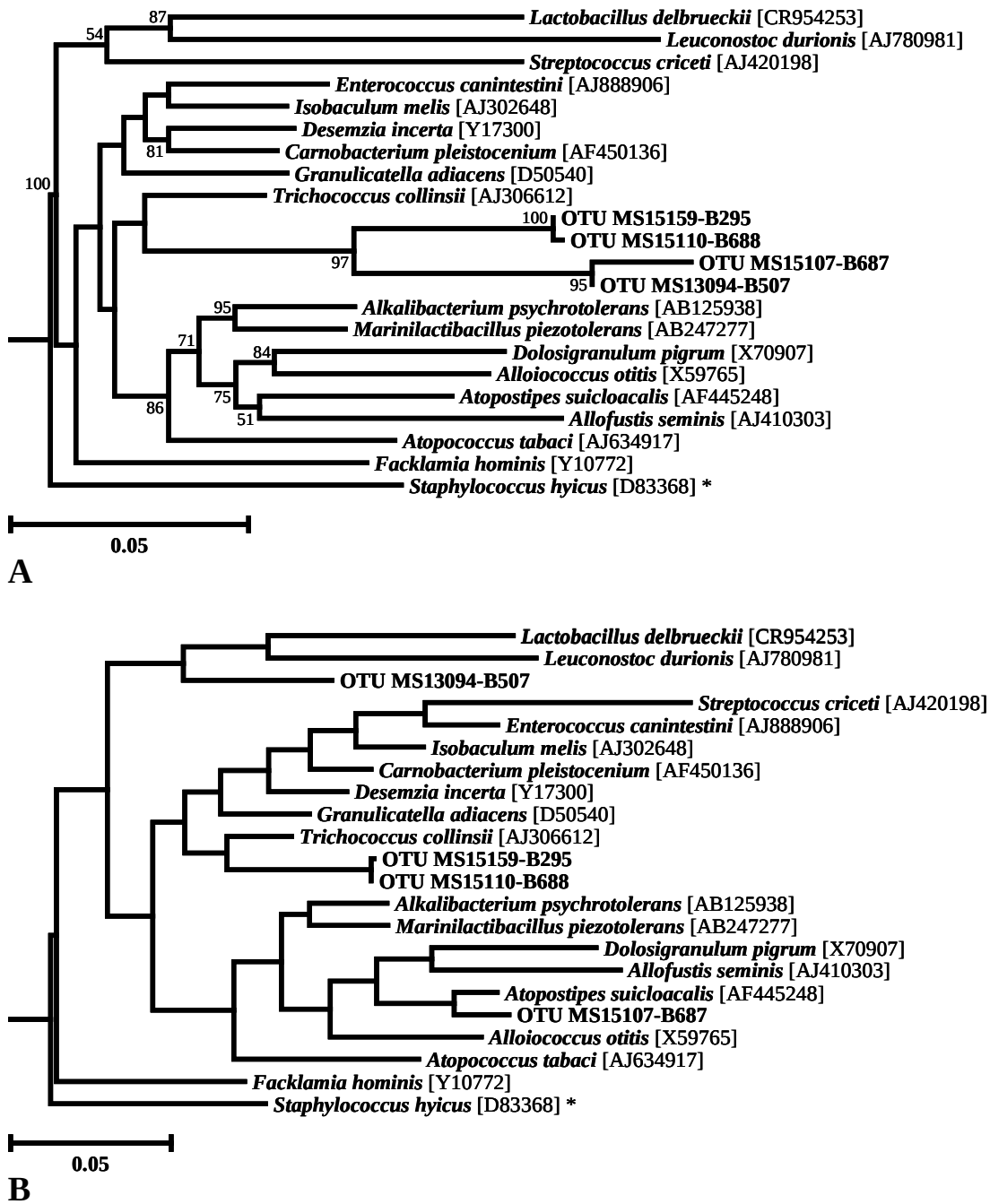


Abb. A-69: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs für Stamm **Firmicutes**, Klasse **Bacilli**, Ordnung **Lactobacillales**. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

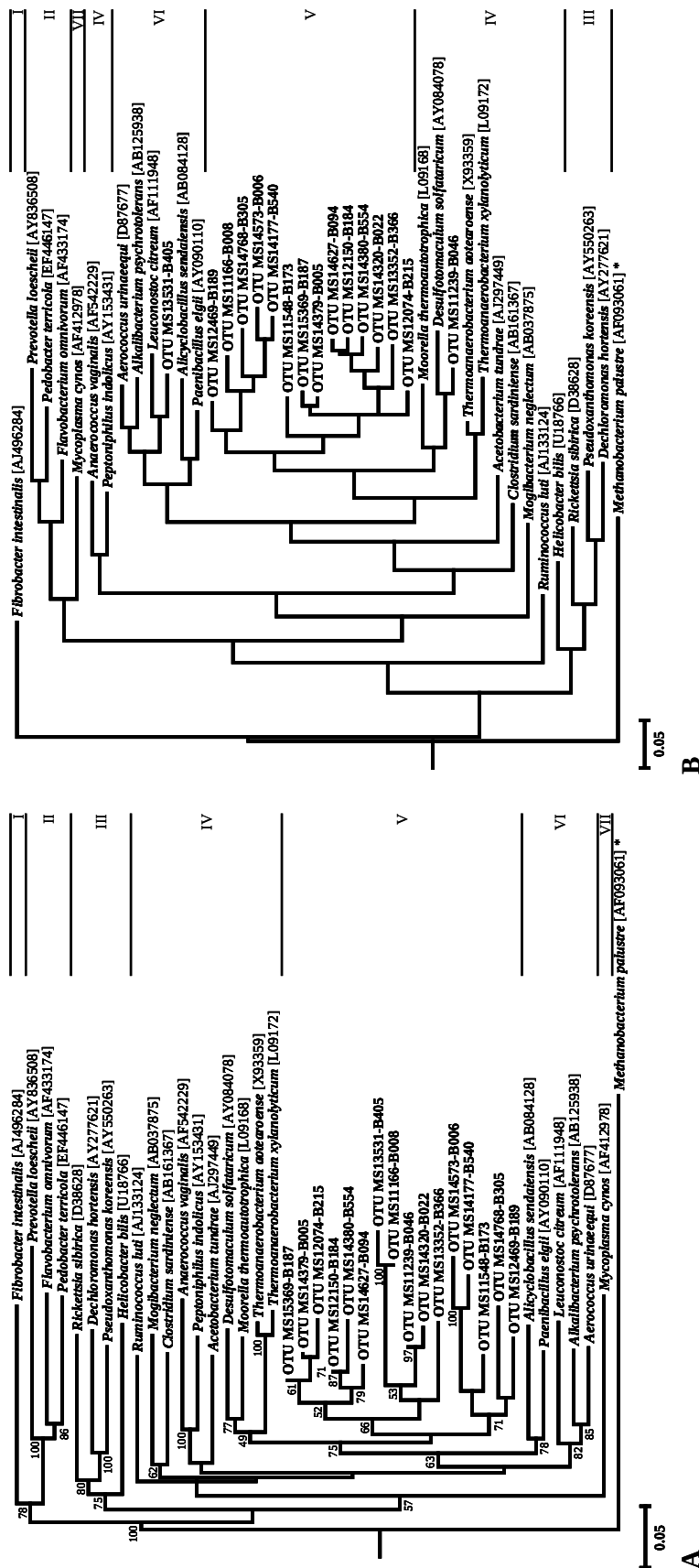


Abb. A-70: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Einordnung. I: Stamm Fibrobacteres; II: Stamm Bacteroides; III: Stamm Proteobacteria; IV-VII: Stamm Firmicutes (IV: Klasse Clostridia, V: Genera incertae sedis, VI: Klasse Bacilli, VII: Klasse Mollicutes). A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

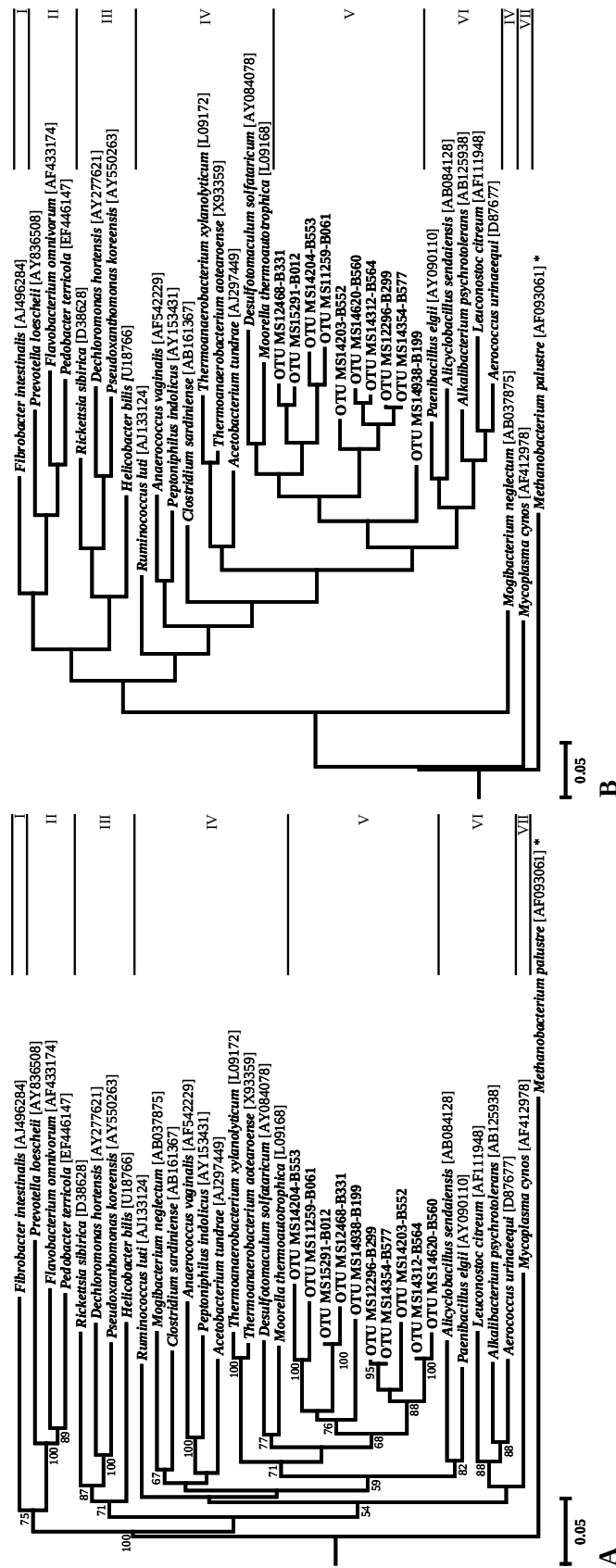


Abb. A-71: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Einordnung. I: Stamm Fibrobacteres; II: Stamm Bacteroides; III: Stamm Proteobacteria; IV-VII: Stamm Firmicutes (IV: Klasse Clostridia, V: Genera incertae sedis, VI: Klasse Bacilli, VII: Klasse Mollicutes). A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode.

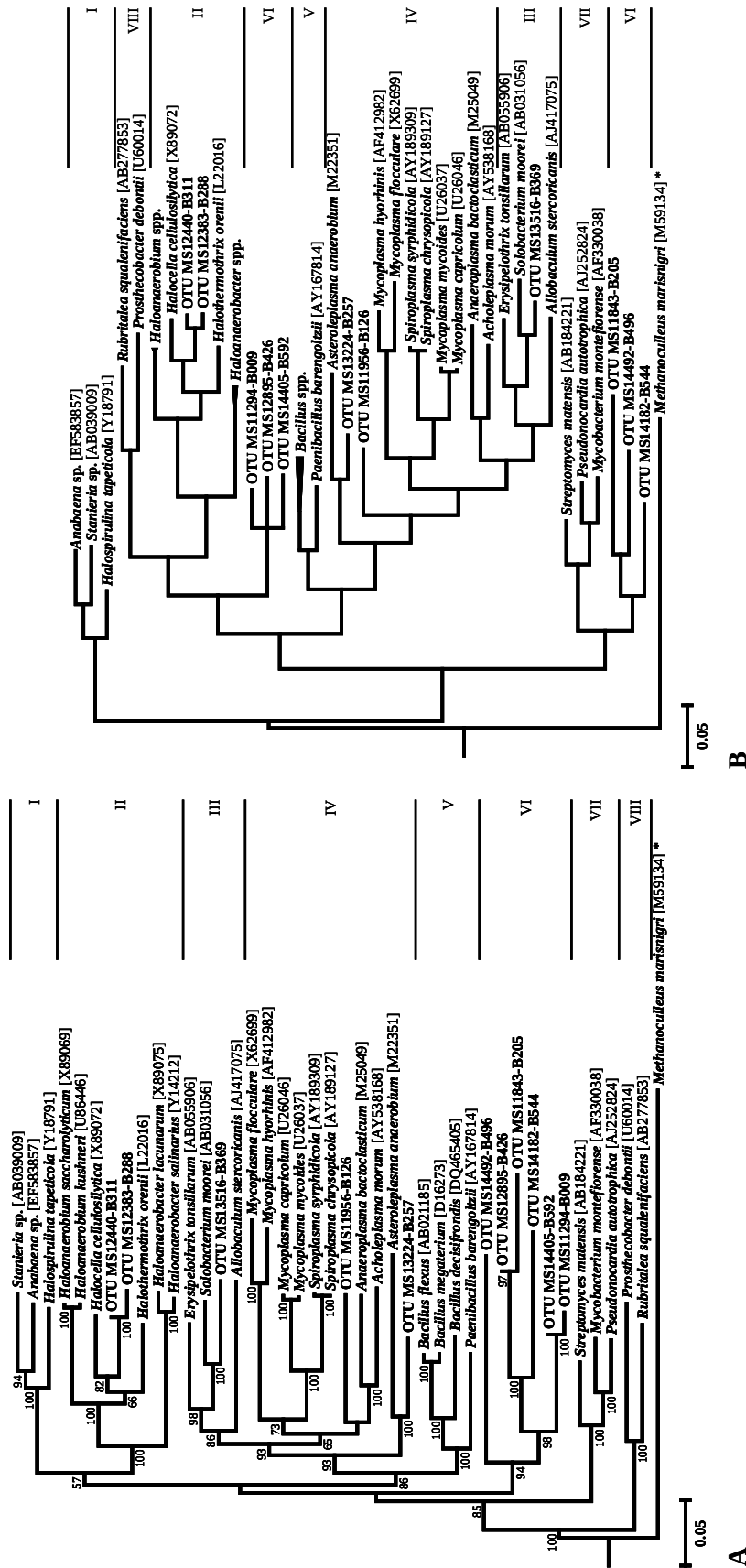
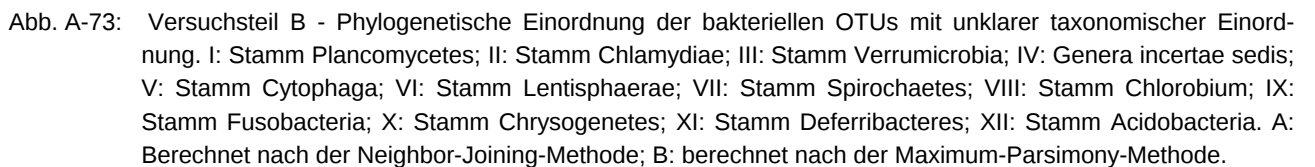
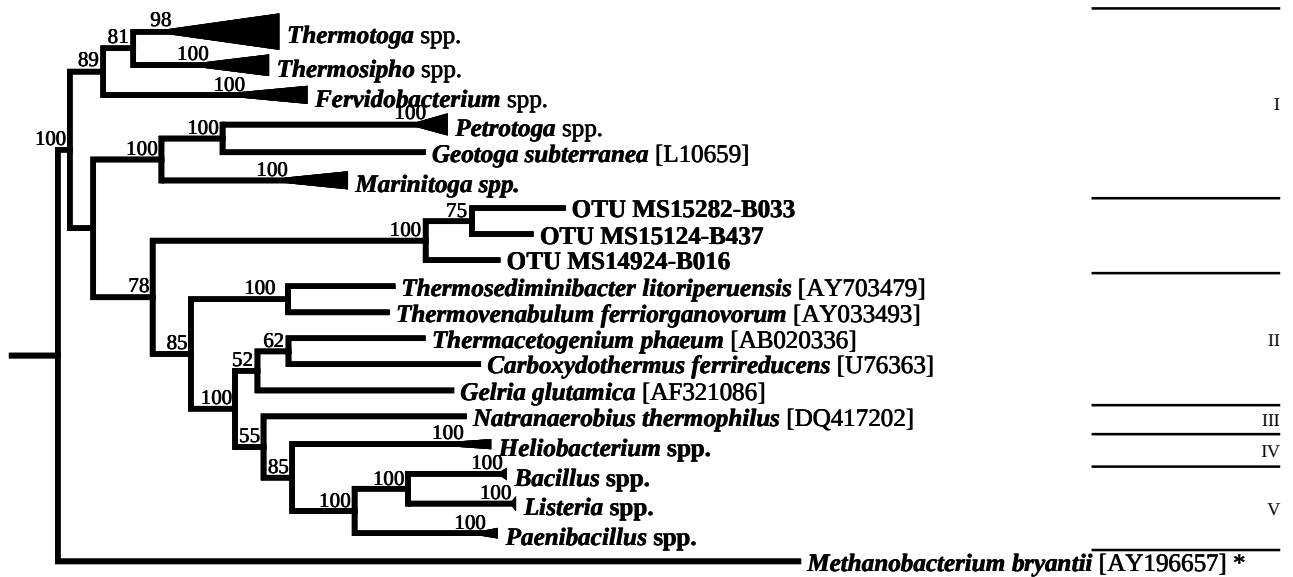


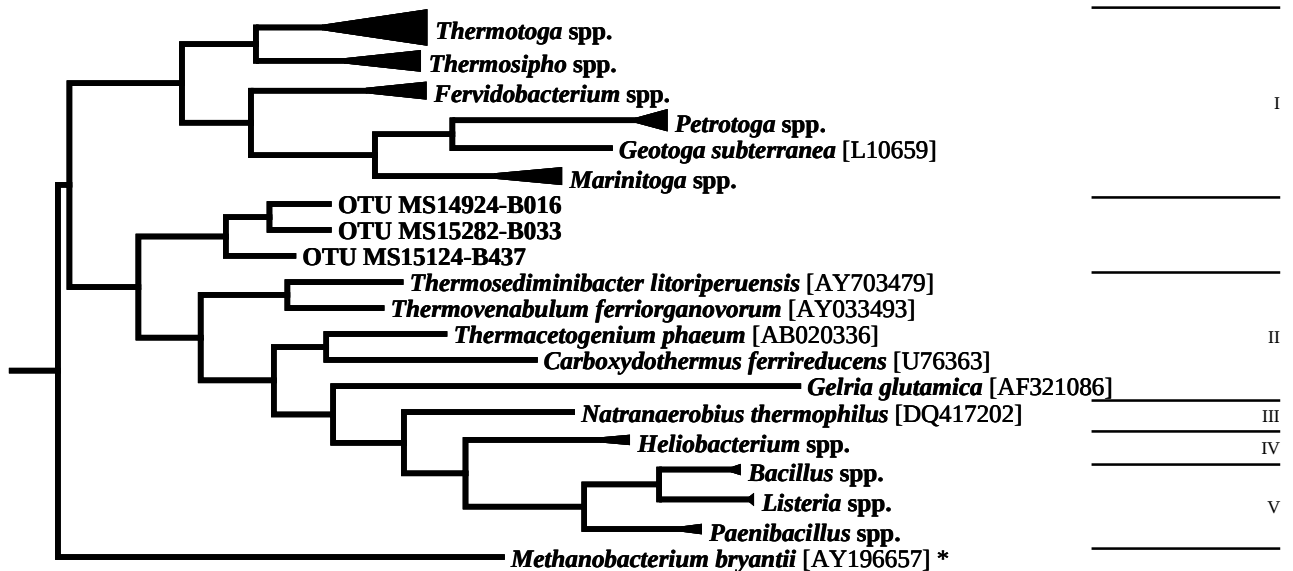
Abb. A-72: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung der bakteriellen OTUs mit unklarer taxonomischer Einordnung. I: Stamm Cyanobacteria; II-VI: Stamm Firmicutes (II: Klasse Clostridia; III: Klasse Erysipelotrichi, IV: Klasse Mollicutes, V: Class Bacilli); VII: Stamm Actinobacteria, VIII: Stamm Verrumicrobia. VI: Genera incertae sedis. A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode





0.05

A



0.05

B

Abb. A-74: Versuchsteil B - Phylogenetische Einordnung bakterieller OTUs mit unklarer taxonomischer Einordnung. I: Stamm und Klasse Thermotogae, Ordnung Thermotogales; II-VI: Stamm Firmicutes, Klasse Clostridia (II: Ordnung Thermoanaerobacteriales, III: Ordnung Natranaerobiales, IV: Ordnung Clostridiales, V: Ordnung Bacillales). A: Berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode; B: berechnet nach der Maximum-Parsimony-Methode. Weitere Details wie in Abb. A-1.

### Anhang 3

## **Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A1 ermittelten OTUs**

| Klon bzw. OTU  | EMBL Akzession     | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU<br>ermittelt durch ARDRA |          |          | Reaktor                        |
|----------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------|----------|--------------------------------|
|                |                    |                            | A                                            | B        | C        |                                |
|                |                    |                            | Mais                                         | Rübe     | Gülle    | Substrat                       |
|                |                    |                            | 35                                           | 35       | 35       | Temperatur [°C]                |
|                |                    |                            | 2,1                                          | 2,0      | 2,4      | Raumbelastung [kg m-3 d-1]     |
|                |                    |                            | 04.08.04                                     | 27.10.04 | 07.07.04 | Datum der Probenahme           |
|                |                    |                            | 26                                           | 38       | 21       | Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
| MS01220-UBF010 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01221-UBF005 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01223-UBF023 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 3        | 0        |                                |
| MS01224-UBF031 | Klocke et al. 2007 | B                          | 2                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01226-UBF032 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01227-UBF033 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01232-UBF025 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 5        | 0        |                                |
| MS01234-UBF011 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 8        |                                |
| MS01236-UBF003 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01237-UBF021 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 1        |                                |
| MS01238-UBF016 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01239-UBF006 | Klocke et al. 2007 | B                          | 1                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01240-UBF020 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01248-UBF061 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01249-UBF062 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01254-UBF002 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 5        | 0        |                                |
| MS01256-UBF059 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01258-UBF024 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| MS01259-UBF060 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01260-UBF030 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01264-UBF029 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01265-UBF022 | Klocke et al. 2007 | B                          | 1                                            | 9        | 0        |                                |
| MS01272-UBF008 | Klocke et al. 2007 | B                          | 2                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01274-UBF064 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01275-UBF065 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01279-UBF017 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 7        | 1        |                                |
| MS01280-UBF015 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 8        | 0        |                                |
| MS01283-UBF066 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01285-UBF052 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01289-UBF067 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01325-UBF026 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01326-UBF027 | Klocke et al. 2007 | B                          | 3                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01327-UBF018 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 5        | 0        |                                |
| MS01328-UBF019 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 6        | 1        |                                |
| MS01330-UBF028 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01331-UBF055 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01332-UBF056 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01334-UBF057 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01335-UBF035 | Klocke et al. 2007 | B                          | 2                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01340-UBF013 | Klocke et al. 2007 | B                          | 4                                            | 13       | 0        |                                |
| MS01341-UBF012 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 12       | 3        |                                |
| MS01344-UBF004 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 2        |                                |
| MS01345-UBF053 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01346-UBF007 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 3        | 1        |                                |
| MS01348-UBF036 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01349-UBF054 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01351-UBF001 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS01354-UBF034 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01357-UBF052 | Klocke et al. 2007 | B                          | 7                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01359-UBF049 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01360-UBF014 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 5        | 0        |                                |
| MS01365-UBF051 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01373-UBF047 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01374-UBF048 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01376-UBF043 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01377-UBF044 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 2        |                                |
| MS01378-UBF045 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01382-UBF040 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01383-UBF041 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01384-UBF042 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01392-UBF038 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01394-UBF039 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01405-UBF037 | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS01529-UBG001 | FN985234           | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS01532-UBG004 | FN985235           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01540-UBG008 | FN985236           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01546-UBM003 | FN985274           | A                          | 2                                            | 0        | 8        |                                |
| MS01547-UBM004 | FN985275           | A                          | 4                                            | 8        | 0        |                                |
| MS01548-UBM005 | FN985276           | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01550-UBM002 | FN985277           | A                          | 9                                            | 0        | 3        |                                |
| MS01562-UBM013 | FN985278           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01564-UBM014 | FN985279           | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01565-UBM015 | FN985280           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01568-UBM007 | FN985281           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01572-UBM016 | FN985282           | A                          | 1                                            | 0        | 3        |                                |
| MS01576-UBM010 | FN985283           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01578-UBM018 | FN985284           | A                          | 7                                            | 0        | 10       |                                |
| MS01580-UBM019 | FN985285           | A                          | 6                                            | 0        | 7        |                                |

| Klon bzw. OTU           | EMBL Akzession     | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU<br>ermittelt durch ARDRA |          |          | Reaktor                        |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------|----------|--------------------------------|
|                         |                    |                            | A                                            | B        | C        |                                |
|                         |                    |                            | Mais                                         | Rübe     | Gülle    | Substrat                       |
|                         |                    |                            | 35                                           | 35       | 35       | Temperatur [°C]                |
|                         |                    |                            | 2,1                                          | 2,0      | 2,4      | Raumbelastung [kg m-3 d-1]     |
|                         |                    |                            | 04.08.04                                     | 27.10.04 | 07.07.04 | Datum der Probennahme          |
|                         |                    |                            | 26                                           | 38       | 21       | Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
| MS01581-UBM020          | FN985286           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01582-UBM021          | FN985287           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01585-UBM022          | FN985288           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01591-UBM024          | FN985289           | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01596-UBM026          | FN985290           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01599-UBM027          | FN985291           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01600-UBM028          | FN985292           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01601-UBM029          | FN985293           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01604-UBM030          | FN985294           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01611-UBM037          | FN985295           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01612-UBM038          | FN985296           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01615-UBM039          | FN985297           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01618-UBM040          | FN985298           | A                          | 2                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01620-UBM041          | FN985299           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01622-UBM042          | FN985300           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01628-UBM043          | FN985301           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01629-UBM012          | FN985302           | A                          | 4                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01630-UBM044          | FN985303           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01639-UBM006          | FN985304           | A                          | 4                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01642-UBM032          | FN985305           | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01644-UBM034          | FN985306           | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01647-UBM035          | FN985307           | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                |
| MS01651-UBM017          | FN985308           | A                          | 5                                            | 0        | 4        |                                |
| MS01660-UBG012          | FN985237           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01661-UBG013          | FN985238           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01665-UBG015          | FN985239           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01668-UBG018          | FN985240           | C                          | 4                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01672-UBG021          | FN985241           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01673-UBG022          | FN985242           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01680-UBG023          | FN985243           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01681-UBG024          | FN985244           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01685-UBG025          | FN985245           | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS01687-UBG026          | FN985246           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01691-UBG028          | FN985247           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01705-UBG035          | FN985248           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01707-UBG036          | FN985249           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01711-UBG038          | FN985250           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01713-UBG039          | FN985251           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01716-UBG033          | FN985252           | C                          | 0                                            | 1        | 2        |                                |
| MS01721-UBG042          | FN985253           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01724-UBG043          | FN985254           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01726-UBG045          | FN985255           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01730-UBG046          | FN985256           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01733-UBG044          | FN985257           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01734-UBG048          | FN985258           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01737-UBG049          | FN985259           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01738-UBG050          | FN985260           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01739-UBG051          | FN985261           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01745-UBG052          | FN985262           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01746-UBG053          | FN985263           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01747-UBG054          | FN985264           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01750-UBG055          | FN985265           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01752-UBG047          | FN985266           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01753-UBG056          | FN985267           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01754-UBG057          | FN985268           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01755-UBG058          | FN985269           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS01756-UBG019          | FN985270           | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS01759-UBG060          | FN985271           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01785-UBG068          | FN985272           | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS01788-UBG070          | FN985273           | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| KM1219                  | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| KM1251                  | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| KM1253                  | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| KM1362                  | Klocke et al. 2007 | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| Summe analysierte Klone |                    |                            | 109                                          | 162      | 113      |                                |
| Summe analysierte OTUs  |                    |                            | 44                                           | 69       | 57       |                                |

#### Anhang 4

### **Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil A2 ermittelten OTUs**

| Klon bzw. OTU  | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU<br>ermittelt durch ARDRA |          |          | Reaktor                        |
|----------------|----------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------|----------|--------------------------------|
|                |                |                            | A                                            | B        | C        |                                |
|                |                |                            | Mais                                         | Rübe     | Gülle    | Substrat                       |
|                |                |                            | 55                                           | 55       | 55       | Temperatur [°C]                |
|                |                |                            | 2,1                                          | 2,1      | 1,9      | Raumbelastung [kg m-3 d-1]     |
|                |                |                            | 02.11.05                                     | 02.11.05 | 24.11.05 | Datum der Probenahme           |
|                |                |                            | 38                                           | 38       | 36       | Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
| MS10833-UBF001 | FN985352       | B                          | 21                                           | 21       | 0        |                                |
| MS10835-UBF003 | FN985353       | B                          | 2                                            | 5        | 0        |                                |
| MS10836-UBF004 | FN985354       | B                          | 0                                            | 3        | 0        |                                |
| MS10839-UBF006 | FN985355       | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| MS10840-UBF007 | FN985356       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10844-UBF010 | FN985357       | B                          | 1                                            | 2        | 0        |                                |
| MS10847-UBF012 | FN985358       | B                          | 1                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10850-UBF013 | FN985359       | B                          | 0                                            | 3        | 0        |                                |
| MS10853-UBF015 | FN985360       | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| MS10857-UBF018 | FN985361       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10858-UBF019 | FN985362       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10863-UBF021 | FN985363       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10865-UBF022 | FN985364       | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS10867-UBF024 | FN985365       | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| MS10868-UBF025 | FN985366       | B                          | 1                                            | 6        | 0        |                                |
| MS10872-UBF027 | FN985367       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10880-UBF032 | FN985368       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10882-UBF033 | FN985369       | B                          | 1                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10884-UBF034 | FN985370       | B                          | 0                                            | 4        | 0        |                                |
| MS10899-UBF038 | FN985371       | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS10910-UBF042 | FN985372       | B                          | 1                                            | 11       | 0        |                                |
| MS10913-UBF044 | FN985373       | B                          | 0                                            | 2        | 0        |                                |
| MS10914-UBF045 | FN985374       | B                          | 2                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10917-UBF046 | FN985375       | B                          | 1                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10918-UBF047 | FN985376       | B                          | 2                                            | 3        | 0        |                                |
| MS10922-UBF048 | FN985377       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10926-UBF049 | FN985378       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10927-UBF050 | FN985379       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10938-UBF054 | FN985380       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10946-UBF056 | FN985381       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10951-UBF060 | FN985382       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10957-UBF062 | FN985383       | B                          | 1                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10961-UBF064 | FN985384       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10968-UBF067 | FN985385       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10980-UBF071 | FN985386       | B                          | 0                                            | 1        | 0        |                                |
| MS10981-UBG001 | FN985429       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS10982-UBG002 | FN985430       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS10983-UBG003 | FN985393       | C                          | 2                                            | 1        | 4        |                                |
| MS10984-UBG004 | FN985394       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS10985-UBG005 | FN985395       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS10986-UBG006 | FN985396       | C                          | 23                                           | 6        | 20       |                                |
| MS10987-UBG007 | FN985431       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS10988-UBG008 | FN985432       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS10990-UBG009 | FN985397       | C                          | 0                                            | 0        | 4        |                                |
| MS10991-UBG010 | FN985398       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS10992-UBF009 | FN985387       | B                          | 10                                           | 11       | 21       |                                |
| MS10993-UBG012 | FN985399       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS10996-UBG014 | FN985400       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS10999-UBF005 | FN985388       | B                          | 5                                            | 10       | 5        |                                |
| MS11000-UBG016 | FN985401       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS11001-UBG017 | FN985402       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS11002-UBG018 | FN985433       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11009-UBG020 | FN985434       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11011-UBG021 | FN985435       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11021-UBG025 | FN985436       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11032-UBG028 | FN985403       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS11038-UBG069 | FN985437       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11039-UBG070 | FN985438       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS11041-UBG041 | FN985404       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS11043-UBF040 | FN985389       | B                          | 0                                            | 3        | 1        |                                |
| MS11049-UBG074 | FN985439       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11052-UBG029 | FN985405       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                |
| MS11056-UBG030 | FN985440       | C                          | 1                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11059-UBG032 | FN985446       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11060-UBG033 | FN985441       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                |
| MS11061-UBF017 | FN985390       | B                          | 0                                            | 6        | 2        |                                |
| MS11062-UBG035 | FN985406       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                |
| MS11063-UBF030 | FN985391       | B                          | 0                                            | 1        | 1        |                                |

| Klon bzw. OTU           | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU<br>ermittelt durch ARDRA |          |          |                                                     |
|-------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------|----------|-----------------------------------------------------|
|                         |                |                            | A                                            | B        | C        | Reaktor                                             |
|                         |                |                            | Mais                                         | Rübe     | Gülle    | Substrat                                            |
|                         |                |                            | 55                                           | 55       | 55       | Temperatur [°C]                                     |
|                         |                |                            | 2,1                                          | 2,1      | 1,9      | Raumbelastung [kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ] |
|                         |                |                            | 02.11.05                                     | 02.11.05 | 24.11.05 | Datum der Probennahme                               |
|                         |                |                            | 38                                           | 38       | 36       | Laufzeit des Reaktors [Wochen]                      |
| MS11064-UBG037          | FN985442       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11066-UBG039          | FN985443       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11067-UBG040          | FN985444       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11070-UBG026          | FN985407       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                                     |
| MS11073-UBG019          | FN985408       | C                          | 0                                            | 0        | 2        |                                                     |
| MS11074-UBF020          | FN985392       | B                          | 0                                            | 1        | 1        |                                                     |
| MS11077-UBG023          | FN985410       | C                          | 0                                            | 0        | 4        |                                                     |
| MS11078-UBG044          | FN985411       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11080-UBG024          | FN985412       | C                          | 0                                            | 0        | 3        |                                                     |
| MS11081-UBG045          | FN985445       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11083-UBG047          | FN985413       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11084-UBG048          | FN985414       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11087-UBG051          | FN985415       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11089-UBG052          | FN985416       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11090-UBG053          | FN985417       | C                          | 7                                            | 4        | 2        |                                                     |
| MS11091-UBG054          | FN985418       | C                          | 0                                            | 1        | 1        |                                                     |
| MS11097-UBG056          | FN985419       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11098-UBG057          | FN985420       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11099-UBG058          | FN985421       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11100-UBG059          | FN985422       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11101-UBG060          | FN985423       | C                          | 1                                            | 0        | 2        |                                                     |
| MS11108-UBG061          | FN985424       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11109-UBG062          | FN985425       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11110-UBG063          | FN985426       | C                          | 0                                            | 0        | 1        |                                                     |
| MS11114-UBG064          | FN985427       | C                          | 0                                            | 1        | 1        |                                                     |
| MS11115-UBG065          | FN985428       | C                          | 1                                            | 1        | 1        |                                                     |
| MS11577-UBM001          | FN985309       | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11578-UBM002          | FN985310       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11579-UBM003          | FN985311       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11581-UBM005          | FN985326       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11583-UBM007          | FN985327       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11586-UBM009          | FN985312       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11588-UBM010          | FN985313       | A                          | 9                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11590-UBM011          | FN985328       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11598-UBM015          | FN985329       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11599-UBM016          | FN985314       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11603-UBM018          | FN985330       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11604-UBM019          | FN985315       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11605-UBM020          | FN985331       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11606-UBM021          | FN985332       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11610-UBM023          | FN985333       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11611-UBM024          | FN985316       | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11614-UBM025          | FN985317       | A                          | 1                                            | 0        | 2        |                                                     |
| MS11615-UBM026          | FN985334       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11617-UBM028          | FN985318       | A                          | 3                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11619-UBM030          | FN985319       | A                          | 6                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11628-UBM035          | FN985335       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11632-UBM036          | FN985336       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11636-UBM037          | FN985337       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11640-UBM039          | FN985338       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11646-UBM042          | FN985320       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11660-UBM045          | FN985321       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11661-UBM046          | FN985339       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11667-UBM049          | FN985340       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11672-UBM052          | FN985341       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11678-UBM056          | FN985322       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11691-UBM058          | FN985323       | A                          | 8                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11693-UBM059          | FN985324       | A                          | 2                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11698-UBM061          | FN985342       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| MS11709-UBM064          | FN985343       | A                          | 1                                            | 0        | 0        |                                                     |
| Summe analysierte Klone |                |                            | 153                                          | 142      | 138      |                                                     |
| Summe analysierte OTUs  |                |                            | 53                                           | 47       | 60       |                                                     |

## Anhang 5

### **Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Bacteria**

| Klon bzw. OTU | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU ermittelt durch ARDRA |                 |                 |                 |                   |                 |                 |                 | Reaktor<br>Temperatur [°C]<br>Raumbelastung [kg m-3 d-1]<br>Datum der Probenahme<br>Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
|---------------|----------------|----------------------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                |                            | A                                         | B               | C               | D               | E                 | F               | G               | H               |                                                                                                                    |
|               |                |                            | 35                                        | 35              | 35              | 35              | 55                | 55              | 55              | 55              |                                                                                                                    |
|               |                |                            | Start<br>04.02.04                         | 2,0<br>04.08.04 | 2,7<br>29.09.04 | 4,2<br>22.12.04 | Start<br>09.03.05 | 2,2<br>02.11.05 | 3,0<br>14.12.05 | 3,3<br>18.01.06 |                                                                                                                    |
|               |                |                            | 1                                         | 26              | 34              | 46              | 4                 | 38              | 44              | 49              |                                                                                                                    |
| MS11160-B002  | FN985595       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11162-B004  | FN985596       | A                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11165-B007  | FN985597       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11166-B008  | FN985598       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11171-B013  | FN985599       | A                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11172-B014  | FN985600       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11173-B015  | FN985601       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11175-B017  | FN985602       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11178-B019  | FN985603       | A                          | 9                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11179-B020  | FN985604       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11180-B021  | FN985605       | A                          | 2                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11183-B023  | FN985606       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11188-B026  | FN985607       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11199-B031  | FN985608       | A                          | 2                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11210-B035  | FN985609       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11211-B036  | FN985610       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11215-B037  | FN985611       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11219-B039  | FN985612       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11224-B040  | FN985613       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11225-B041  | FN985614       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11228-B042  | FN985615       | A                          | 4                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11236-B024  | FN985616       | A                          | 8                                         | 3               | 17              | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11237-B044  | FN985617       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11238-B045  | FN985618       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11239-B046  | FN985619       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11240-B047  | FN985620       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11243-B049  | FN985621       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11252-B055  | FN985622       | A                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11254-B056  | FN985623       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11259-B061  | FN985624       | A                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11272-B065  | FN985625       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 2               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11282-B070  | FN985626       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11294-B009  | FN985627       | A                          | 3                                         | 1               | 5               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11295-B038  | FN985628       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11301-B080  | FN985629       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11306-B081  | FN985630       | A                          | 5                                         | 0               | 3               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11318-B086  | FN985631       | A                          | 3                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11320-B087  | FN985632       | A                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11352-B082  | FN985633       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11380-B115  | FN985634       | A                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11465-B138  | FN985635       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11468-B144  | FN985636       | A                          | 4                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11486-B011  | FN985637       | A                          | 4                                         | 0               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11489-B146  | FN985638       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11506-B043  | FN985639       | A                          | 3                                         | 1               | 1               | 0               | 0                 | 1               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11510-B744  | FN985640       | A                          | 5                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11511-B158  | FN985641       | A                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11541-B029  | FN985642       | A                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11548-B173  | FN985643       | A                          | 1                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11754-B207  | FN993966       | C                          | 0                                         | 0               | 48              | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11773-B206  | FN993967       | C                          | 0                                         | 0               | 15              | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11809-B226  | FN993968       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11815-B244  | FN993969       | C                          | 0                                         | 0               | 4               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11817-B104  | FN993970       | C                          | 10                                        | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11834-B068  | FN993971       | C                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11843-B205  | FN993972       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11881-B747  | FN993973       | C                          | 0                                         | 1               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11882-B074  | FN993974       | C                          | 1                                         | 0               | 5               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11884-B239  | FN993975       | C                          | 0                                         | 0               | 4               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11885-B240  | FN993976       | C                          | 0                                         | 1               | 3               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11886-B025  | FN993977       | C                          | 2                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11908-B245  | FN993978       | C                          | 0                                         | 4               | 3               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11914-B141  | FN993979       | C                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11921-B001  | FN993980       | C                          | 3                                         | 6               | 28              | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11932-B237  | FN993981       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 7               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11948-B255  | FN993982       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11956-B126  | FN993983       | C                          | 1                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11969-B756  | FN993984       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |
| MS11993-B084  | FN993985       | C                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                    |

| Klon bzw. OTU | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU ermittelt durch ARDRA |                 |                 |                 |                   |                 |                 |                 | Reaktor<br>Temperatur [°C]<br>Raumbelastung [kg m-3 d-1]<br>Datum der Probennahme<br>Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
|---------------|----------------|----------------------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                |                            | A                                         | B               | C               | D               | E                 | F               | G               | H               |                                                                                                                     |
|               |                |                            | 35                                        | 35              | 35              | 35              | 55                | 55              | 55              | 55              |                                                                                                                     |
|               |                |                            | Start<br>04.02.04                         | 2,0<br>04.08.04 | 2,7<br>29.09.04 | 4,2<br>22.12.04 | Start<br>09.03.05 | 2,2<br>02.11.05 | 3,0<br>14.12.05 | 3,3<br>18.01.06 |                                                                                                                     |
|               |                |                            | 1                                         | 26              | 34              | 46              | 4                 | 38              | 44              | 49              |                                                                                                                     |
| MS12003-B142  | FN993986       | C                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12019-B152  | FN993987       | C                          | 1                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12020-B236  | FN993988       | C                          | 0                                         | 1               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12023-B030  | FN993989       | C                          | 2                                         | 5               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12025-B216  | FN993990       | C                          | 0                                         | 2               | 13              | 7               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12061-B242  | FN993991       | C                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12074-B215  | FN993992       | C                          | 0                                         | 2               | 3               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12078-B280  | FN993993       | C                          | 0                                         | 1               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12096-B746  | FN993994       | C                          | 2                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12114-B252  | FN993995       | C                          | 0                                         | 0               | 1               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12124-B288  | FN993996       | C                          | 0                                         | 4               | 1               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 3               |                                                                                                                     |
| MS12150-B184  | FN994086       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 4               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12158-B185  | FN994087       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 44              | 64              | 30              |                                                                                                                     |
| MS12171-B190  | FN994088       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12174-B191  | FN994089       | F                          | 0                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 1               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12178-B193  | FN994090       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 4               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12179-B176  | FN994091       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12187-B195  | FN994092       | F                          | 0                                         | 0               | 1               | 0               | 0                 | 5               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12251-B292  | FN994093       | F                          | 0                                         | 1               | 0               | 0               | 0                 | 1               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12273-B296  | FN994094       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 3               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12276-B297  | FN994095       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 3               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12281-B298  | FN994096       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 4               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12296-B299  | FN994097       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12307-B300  | FN994098       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12311-B301  | FN994099       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12383-B288  | FN994100       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12440-B311  | FN994101       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12452-B182  | FN994102       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12468-B331  | FN994103       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12469-B189  | FN994104       | F                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12860-B416  | FN994003       | D                          | 0                                         | 1               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12889-B423  | FN993950       | B                          | 0                                         | 3               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12894-B425  | FN993951       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12895-B426  | FN993952       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12896-B427  | FN993953       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12932-B444  | FN993954       | B                          | 0                                         | 3               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS12951-B449  | FN993955       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13006-B466  | FN993956       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13066-B217  | FN993957       | B                          | 0                                         | 2               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13094-B507  | FN993958       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13137-B519  | FN993959       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13165-B516  | FN993960       | B                          | 0                                         | 2               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13180-B446  | FN993961       | B                          | 0                                         | 9               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13212-B417  | FN993962       | B                          | 0                                         | 6               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13224-B257  | FN993963       | B                          | 0                                         | 5               | 1               | 0               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13313-B337  | FN994004       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 11              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13318-B336  | FN994005       | D                          | 0                                         | 1               | 0               | 95              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13319-B358  | FN994006       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 18              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13340-B347  | FN994007       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13341-B362  | FN994008       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 12              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13344-B364  | FN994009       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 5               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13349-B365  | FN994010       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13352-B366  | FN994011       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13361-B083  | FN994012       | D                          | 1                                         | 1               | 1               | 21              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13372-B340  | FN994013       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 30              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13392-B360  | FN994014       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 5               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13394-B338  | FN994015       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 7               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13405-B342  | FN994016       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 10              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13460-B130  | FN994017       | D                          | 1                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13489-B132  | FN994018       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 4               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13497-B385  | FN994019       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13507-B392  | FN994020       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 3               | 0                 | 0               | 0               | 1               |                                                                                                                     |
| MS13515-B394  | FN994021       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 4               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13516-B369  | FN994022       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 3               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13531-B405  | FN994023       | D                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13543-B091  | FN994024       | D                          | 1                                         | 0               | 0               | 21              | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13571-B262  | FN994025       | D                          | 0                                         | 1               | 1               | 1               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13596-B411  | FN994026       | D                          | 0                                         | 2               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13601-B412  | FN994027       | D                          | 0                                         | 1               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |

| Klon bzw. OTU | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU ermittelt durch ARDRA |                 |                 |                 |                   |                 |                 |                 | Reaktor<br>Temperatur [°C]<br>Raumbelastung [kg m-3 d-1]<br>Datum der Probennahme<br>Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
|---------------|----------------|----------------------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                |                            | A                                         | B               | C               | D               | E                 | F               | G               | H               |                                                                                                                     |
|               |                |                            | 35                                        | 35              | 35              | 35              | 55                | 55              | 55              | 55              |                                                                                                                     |
|               |                |                            | Start<br>04.02.04                         | 2,0<br>04.08.04 | 2,7<br>29.09.04 | 4,2<br>22.12.04 | Start<br>09.03.05 | 2,2<br>02.11.05 | 3,0<br>14.12.05 | 3,3<br>18.01.06 |                                                                                                                     |
|               |                |                            | 1                                         | 26              | 34              | 46              | 4                 | 38              | 44              | 49              |                                                                                                                     |
| MS13608-B414  | FN994028       | D                          | 0                                         | 1               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS13609-B415  | FN994029       | D                          | 0                                         | 1               | 0               | 1               | 0                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14164-B538  | FN994036       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14172-B408  | FN994037       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14175-B541  | FN994038       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 8                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14177-B540  | FN994039       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 3                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14179-B543  | FN994040       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14182-B544  | FN994041       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14187-B546  | FN994042       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14189-B547  | FN994043       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14197-B549  | FN994044       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14201-B550  | FN994045       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14202-B551  | FN994046       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 3                 | 0               | 1               | 6               |                                                                                                                     |
| MS14203-B552  | FN994047       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14204-B553  | FN994048       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 5                 | 0               | 1               | 1               |                                                                                                                     |
| MS14212-B555  | FN994049       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14218-B479  | FN994050       | E                          | 0                                         | 1               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14305-B562  | FN994051       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14306-B563  | FN994052       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14312-B564  | FN994053       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 7                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14313-B565  | FN994054       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 4                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14315-B003  | FN994055       | E                          | 7                                         | 17              | 0               | 4               | 1                 | 0               | 0               | 2               |                                                                                                                     |
| MS14320-B022  | FN994056       | E                          | 2                                         | 13              | 6               | 1               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14322-B570  | FN994057       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14339-B088  | FN994058       | E                          | 1                                         | 9               | 2               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14340-B346  | FN994059       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 12              | 3                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14342-B355  | FN994060       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 4                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14348-B574  | FN994061       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14349-B575  | FN994062       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 7               | 2               |                                                                                                                     |
| MS14354-B577  | FN994063       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 4                 | 0               | 2               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14366-B584  | FN994064       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14368-B585  | FN994065       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14372-B580  | FN994066       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14378-B092  | FN994067       | E                          | 1                                         | 1               | 0               | 0               | 7                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14379-B005  | FN994068       | E                          | 2                                         | 3               | 0               | 1               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14380-B554  | FN994069       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 7                 | 0               | 3               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14405-B592  | FN994070       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14410-B401  | FN994071       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 2               | 3                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14412-B594  | FN994072       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14431-B597  | FN994073       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14442-B537  | FN994074       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 60                | 0               | 3               | 12              |                                                                                                                     |
| MS14444-B600  | FN994075       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14461-B749  | FN994076       | E                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14477-B458  | FN994077       | E                          | 0                                         | 1               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14479-B722  | FN994078       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14492-B496  | FN994079       | E                          | 0                                         | 3               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14499-B593  | FN994080       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14573-B006  | FN994081       | E                          | 66                                        | 49              | 60              | 13              | 2                 | 5               | 9               | 5               |                                                                                                                     |
| MS14598-B579  | FN994082       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14610-B623  | FN994083       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14620-B560  | FN994084       | E                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 5                 | 0               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14623-B032  | FN994085       | E                          | 9                                         | 22              | 6               | 2               | 4                 | 1               | 0               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14627-B094  | FN994110       | G                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14660-B630  | FN994111       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 1               | 1               |                                                                                                                     |
| MS14740-B196  | FN994112       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 2               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14755-B645  | FN994113       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 2               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14768-B305  | FN994114       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 1               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14777-B647  | FN994115       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 3               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14780-B649  | FN994116       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 6               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14800-B214  | FN994117       | G                          | 0                                         | 6               | 3               | 0               | 0                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14835-B601  | FN994118       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 2                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14843-B155  | FN994119       | G                          | 1                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14852-B556  | FN994120       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14860-B569  | FN994121       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 0               | 2               | 1               |                                                                                                                     |
| MS14919-B669  | FN994122       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 0                 | 0               | 2               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14924-B016  | FN994123       | G                          | 10                                        | 27              | 24              | 4               | 0                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14932-B258  | FN994124       | G                          | 0                                         | 0               | 2               | 0               | 0                 | 0               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14938-B199  | FN994125       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 4                 | 6               | 1               | 0               |                                                                                                                     |
| MS14946-B179  | FN994126       | G                          | 0                                         | 0               | 0               | 0               | 1                 | 24              | 10              | 2               |                                                                                                                     |

| Klon bzw. OTU                | EMBL Akzession | Sequenziert<br>aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU ermittelt durch ARDRA |          |          |          |          |          |          |          | Reaktor<br>Temperatur [°C]     |
|------------------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|
|                              |                |                            | A                                         | B        | C        | D        | E        | F        | G        | H        |                                |
|                              |                |                            | 35                                        | 35       | 35       | 35       | 55       | 55       | 55       | 55       |                                |
|                              |                |                            | Start                                     | 2,0      | 2,7      | 4,2      | Start    | 2,2      | 3,0      | 3,3      |                                |
|                              |                |                            | 04.02.04                                  | 04.08.04 | 29.09.04 | 22.12.04 | 09.03.05 | 02.11.05 | 14.12.05 | 18.01.06 |                                |
|                              |                |                            | 1                                         | 26       | 34       | 46       | 4        | 38       | 44       | 49       |                                |
|                              |                |                            |                                           |          |          |          |          |          |          |          | Reaktor<br>Temperatur [°C]     |
|                              |                |                            |                                           |          |          |          |          |          |          |          | Raumbelastung [kg m-3 d-1]     |
|                              |                |                            |                                           |          |          |          |          |          |          |          | Datum der Probenahme           |
|                              |                |                            |                                           |          |          |          |          |          |          |          | Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
| MS14960-B276                 | FN994127       | G                          | 0                                         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 2        | 1        |                                |
| MS14968-B327                 | FN994128       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 2        | 1        |                                |
| MS14974-B631                 | FN994129       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        |                                |
| MS14977-B673                 | FN994130       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        |                                |
| MS14979-B177                 | FN994131       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 9        | 1        | 0        |                                |
| MS14987-B658                 | FN994132       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 1        |                                |
| MS14988-B201                 | FN994133       | G                          | 0                                         | 1        | 4        | 2        | 9        | 1        | 3        | 0        |                                |
| MS15002-B638                 | FN994134       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        | 0        |                                |
| MS15010-B119                 | FN994135       | G                          | 2                                         | 1        | 0        | 0        | 1        | 10       | 3        | 3        |                                |
| MS15011-B653                 | FN994136       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        |                                |
| MS15025-B587                 | FN994137       | G                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 1        | 0        |                                |
| MS15033-B097                 | FN994141       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 5        | 0        | 5        | 13       |                                |
| MS15038-B096                 | FN994142       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 3        |                                |
| MS15052-B567                 | FN994143       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15056-B180                 | FN994144       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 3        | 0        | 2        |                                |
| MS15102-B686                 | FN994145       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        |                                |
| MS15107-B687                 | FN994146       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        |                                |
| MS15110-B688                 | FN994147       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        |                                |
| MS15119-B491                 | FN994148       | H                          | 0                                         | 3        | 0        | 0        | 4        | 0        | 0        | 2        |                                |
| MS15123-B566                 | FN994149       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 4        | 0        | 4        | 6        |                                |
| MS15124-B437                 | FN994150       | H                          | 0                                         | 7        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15139-B641                 | FN994151       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 2        |                                |
| MS15159-B295                 | FN994152       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        | 0        | 1        |                                |
| MS15168-B072                 | FN994153       | H                          | 3                                         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        |                                |
| MS15176-B640                 | FN994154       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        |                                |
| MS15191-B701                 | FN994155       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        |                                |
| MS15205-B702                 | FN994156       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15207-B197                 | FN994157       | H                          | 0                                         | 1        | 1        | 10       | 0        | 1        | 0        | 2        |                                |
| MS15211-B010                 | FN994158       | H                          | 38                                        | 0        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15219-B700                 | FN994159       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        |                                |
| MS15223-B330                 | FN994160       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 1        |                                |
| MS15239-B027                 | FN994161       | H                          | 6                                         | 11       | 10       | 2        | 6        | 4        | 1        | 2        |                                |
| MS15244-B183                 | FN994162       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 1        | 1        |                                |
| MS15257-B124                 | FN994163       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 4        |                                |
| MS15268-B302                 | FN994164       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 3        | 2        | 8        |                                |
| MS15282-B033                 | FN994165       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15291-B012                 | FN994166       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 3        | 0        | 3        |                                |
| MS15300-B069                 | FN994167       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 6        | 3        | 1        |                                |
| MS15309-B018                 | FN994168       | H                          | 6                                         | 4        | 12       | 1        | 3        | 0        | 0        | 2        |                                |
| MS15346-B098                 | FN994169       | H                          | 2                                         | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15361-B557                 | FN994170       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        | 0        | 63       |                                |
| MS15365-B683                 | FN994171       | H                          | 0                                         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 6        |                                |
| MS15369-B187                 | FN994172       | H                          | 0                                         | 0        | 1        | 0        | 30       | 59       | 22       | 7        |                                |
| MS15371-B059                 | FN994173       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 3        | 3        |                                |
| MS15378-B604                 | FN994174       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15392-B203                 | FN994175       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 21       | 2        | 14       | 27       |                                |
| MS15408-B174                 | FN994176       | H                          | 0                                         | 2        | 0        | 1        | 45       | 64       | 60       | 40       |                                |
| MS15409-B708                 | FN994177       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 3        |                                |
| MS15412-B079                 | FN994178       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |                                |
| MS15414-B101                 | FN994179       | H                          | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 2        | 13       | 15       | 22       |                                |
| MS15418-B175                 | FN994180       | H                          | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 10       | 38       | 75       | 37       |                                |
| Summe Klone mit Sequenz      |                |                            | 291                                       | 277      | 329      | 347      | 344      | 355      | 362      | 360      |                                |
| Nicht sequenzierte Singulets |                |                            | 78                                        | 89       | 59       | 37       | 42       | 36       | 27       | 29       |                                |
| Summe analysierte Klone      |                |                            | 369                                       | 366      | 388      | 384      | 386      | 391      | 389      | 389      |                                |
| Summe analysierte OTUs       |                |                            | 166                                       | 154      | 118      | 86       | 122      | 81       | 82       | 86       |                                |

## Anhang 6

## Akzessionsnummern und OTU-Häufigkeiten für die in Versuchsteil B ermittelten Archaea

| Klon bzw. OTU                | EMBL Akzession | Sequenziert aus Reaktor | Anzahl Klone je OTU ermittelt durch ARDRA |          |          |          |          |          |          |          | Reaktor                        |
|------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|
|                              |                |                         | A                                         | B        | C        | D        | E        | F        | G        | H        |                                |
|                              |                |                         | 35                                        | 35       | 35       | 35       | 55       | 55       | 55       | 55       | Temperatur [°C]                |
|                              |                |                         | Start                                     | 2,0      | 2,7      | 4,2      | Start    | 2,2      | 3,0      | 3,3      | Raumbelastung [kg m-3 d-1]     |
|                              |                |                         | 04.02.04                                  | 04.08.04 | 29.09.04 | 22.12.04 | 09.03.05 | 02.11.05 | 14.12.05 | 18.01.06 | Datum der Probenentnahme       |
|                              |                |                         | 1                                         | 26       | 34       | 46       | 4        | 38       | 44       | 49       | Laufzeit des Reaktors [Wochen] |
| MS02388-A011                 | FN993947       | B                       | 0                                         | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS02478-A057                 | FN993948       | B                       | 0                                         | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS02483-A059                 | FN993949       | B                       | 0                                         | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15442-A041                 | FN994030       | E                       | 0                                         | 3        | 1        | 6        | 2        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15452-A088                 | FN994031       | E                       | 39                                        | 0        | 0        | 1        | 5        | 0        | 1        | 3        |                                |
| MS15482-A206                 | FN994032       | E                       | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15531-A012                 | FN994033       | E                       | 1                                         | 2        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15548-A093                 | FN994034       | E                       | 3                                         | 0        | 1        | 0        | 10       | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15549-A023                 | FN994035       | E                       | 9                                         | 1        | 0        | 0        | 45       | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS15627-A210                 | FN994105       | G                       | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        |                                |
| MS15633-A092                 | FN994106       | G                       | 2                                         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 1        | 1        |                                |
| MS15664-A212                 | FN994107       | G                       | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        |                                |
| MS15667-A213                 | FN994108       | G                       | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        |                                |
| MS15671-A089                 | FN994109       | G                       | 4                                         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 1        | 2        |                                |
| MS16154-A113                 | FN985447       | A                       | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16155-A095                 | FN985448       | A                       | 2                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16215-A138                 | FN985449       | A                       | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16220-A139                 | FN985450       | A                       | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16235-A143                 | FN985451       | A                       | 1                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16381-A165                 | FN993964       | C                       | 0                                         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16424-A032                 | FN993965       | C                       | 0                                         | 1        | 8        | 3        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16473-A061                 | FN993997       | D                       | 1                                         | 1        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16510-A185                 | FN993998       | D                       | 0                                         | 0        | 0        | 2        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16560-A191                 | FN993999       | D                       | 0                                         | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16574-A173                 | FN994000       | D                       | 0                                         | 0        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16578-A193                 | FN994001       | D                       | 0                                         | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16683-A008                 | FN994002       | D                       | 0                                         | 8        | 21       | 9        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| MS16966-A002                 | FN994138       | H                       | 19                                        | 26       | 8        | 0        | 1        | 0        | 0        | 2        |                                |
| MS16979-A026                 | FN994139       | H                       | 6                                         | 0        | 0        | 0        | 55       | 42       | 84       | 74       |                                |
| MS16989-A211                 | FN994140       | H                       | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 4        |                                |
| Summe Klone mit Sequenz      |                |                         | 90                                        | 45       | 42       | 25       | 121      | 42       | 91       | 86       |                                |
| Nicht sequenzierte Singulets |                |                         | 0                                         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                |
| Summe analysierte Klone      |                |                         | 90                                        | 45       | 42       | 25       | 121      | 42       | 91       | 86       |                                |
| Summe analysierte OTUs       |                |                         | 14                                        | 10       | 8        | 9        | 9        | 1        | 8        | 6        |                                |