



Grundlagen der Biogasgewinnung aus pflanzlicher Biomasse

Systemanalyse der mikrobiologischen Stoffumwandlung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Substratbereitstellung, der Intermediatbildung sowie der Prozessführung

Teilprojekt 03SF0317M

Erfassung der mikrobiellen Biozönosen in Monovergärungen von Getreide-Ganzpflanzensilage in mehrstufigen Fermentationen (*bioleaching*-Verfahren)

Dieses Projekt wurde finanziell unterstützt durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Schwerpunktprogramms NETZWERKE GRUNDLAGENFORSCHUNG ERNEUERBARE ENERGIEN UND RATIONELLE ENERGIEANWENDUNG in Projektträgerschaft durch den Projektträger Jülich, Forschungszentrum Jülich GmbH (PtJ).

Zuwendungsempfänger

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

Projektleiter

Dr. Michael Klocke
Email: mklocke@atb-potsdam.de

Förderkennzeichen

03SF0317M

Vorhabenbezeichnung

BIOGAS-CROPS-NETWORK

Grundlagen der Biogasgewinnung aus pflanzlicher Biomasse: Systemanalyse der mikrobiologischen Stoffumwandlung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Substratbereitstellung, der Intermediatbildung sowie der Prozessführung

Teilprojekt

Erfassung der mikrobiellen Biozönosen in Monovergärungen von Getreide-Ganzpflanzensilage in mehrstufigen Fermentationen (*bioleaching*-Verfahren)

Laufzeit des Vorhabens

01.09.2005 bis 31.08.2008

Berichtszeitraum

01.09.2005 bis 31.08.2008

Datum der Berichtserstellung

28.02.2009

Inhalt

I.1	Aufgabenstellung	1
I.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	1
I.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	2
	Durchführung der Fermentationsversuche	2
	Versuchsbegleitende Probennahme	2
	Isolierung der mikrobiellen genomischen DNA	2
	Anlage von 16S rDNA Klonbibliotheken	2
	Analyse der 16S rDNA Sequenzen	3
	Aufbau einer <i>fingerprint</i> -Datenbank zur Analyse von Proben aus Biogas-Fermentern	3
	Fluoreszenz-mikroskopische Analyse	3
	Änderungen gegenüber dem ursprünglich geplanten Versuchsprogramm	3
I.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	3
	Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, welche für das Vorhaben benutzt wurden	3
	Verwendete Fachliteratur	5
	Benutzte Informations- und Dokumentationsdienste	7
I.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
II.1	Ergebnisse	9
<i>II.1.1</i>	<i>Arbeiten zur Erreichung der technischen Arbeitsziele</i>	<i>9</i>
	Etablierung der notwendigen molekulargenetischen Analytik	9
	Entwicklung einer computergestützten <i>fingerprint</i> -Analytik und Aufbau einer <i>fingerprint</i> -Datenbank	10
	Etablierung und Nutzung der FISH-Mikroskopie zur gruppenspezifischen Quantifizierung von Archaea und Bacteria	11
<i>II.1.2</i>	<i>Arbeiten zur Erreichung der wissenschaftlichen Arbeitsziele</i>	<i>12</i>
	Auswahl der Biogasreaktoren	12
	Analyse der mikrobiellen Biozönosen in einstufigen Biogasfermentationen bei Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen als Substrat unter Verwendung molekulargenetischer Methoden	13
	Analyse der methanogenen Archaea-Gemeinschaft in zweiphasigen, zweistufigen Biogasfermentationen mit <i>bioleaching</i> von Triticale-Silage	15
	Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit <i>bioleaching</i> von Roggen-Silage - Analyse der Struktur der methanogenen Archaea in dem Anaerobfilter	17

Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit <i>bioleaching</i> von Roggen-Silage - Analyse der räumlichen Verteilung der methanogenen Archaea in dem Anaerobfilter	19
Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit <i>bioleaching</i> von Roggen-Silage - Analyse der Struktur der hydrolytischen Bacteria Gemeinschaft in der Hydrolyse	21
Zweiphasige, einstufige Biogasfermentation von Mais-Silage - Analyse der Entwicklung der methanogenen Archaea Gemeinschaft während Startphase, kontinuierlichem Betrieb und Übersäuerung	30
Zusammenfassung der Ergebnisse	34
II.2 Verwertbarkeit	37
II.3 Fortschritte anderer Stellen	37
II.4 Veröffentlichungen	37
Referierte Fachartikel	37
Beiträge zu Sammelwerken	38
Poster-Präsentationen auf Fachtagungen	38
Fachvorträge	39
Dissertationen	39
Diplomarbeiten	39

I.1 Aufgabenstellung

Gegenstand des Vorhabens ist die Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften, welche die Biokonversion pflanzlicher Biomasse zu Biogas durchführen.

Hierzu sollen im Einzelnen folgende Arbeitsziele erreicht werden:

- (1) Beschreibung der mikrobiellen Biozönose in zweistufigen Biogasfermentern mit *bioleaching*-System bei Nutzung von Mais- und Roggensilage als Substrat unter Verwendung molekulargenetischer Methoden (ARDRA, 16S rDNA Sequenzierung),
- (2) Analyse der mikrobiellen Biozönose während der Hydrolyse von nachwachsenden Rohstoffen sowie der acetogenen und methanogenen Population in dem Anaerobfilter (Festbettreaktor) des zweistufigen Systems,
- (3) Ermittlung der Auswirkungen des Biomassetransfers zwischen Vor- und Hauptfermenter auf die jeweiligen mikrobiellen Systeme,
- (4) Analyse der Etablierung der methanbildenden Archaea-Flora sowie der säurebildenden Bacteria im Verlauf der Startphase, bei kontinuierlichem Betrieb sowie in Grenzzuständen,
- (5) Aufbau einer Fingerprint-Datenbank zur schnellen Charakterisierung der Artzusammensetzung in Biogasfermenter-Proben.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik (Leitung: Prof. Dr. B. Linke) an dem Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) (Leitung: Prof. Dr. R. Brunsch) betreibt anwendungsorientierte Grundlagenforschung zur Entwicklung neuer Verfahren für die biotechnologische Konversion nachwachsender Rohstoffe sowohl zur Energiegewinnung wie auch zur Erzeugung von Grundchemikalien. Bearbeitet werden schwerpunktmäßig Themen der verfahrenstechnischen Grundlagen der Biokonversion, der Umweltbioverfahrenstechnik sowie der technischen Mikrobiologie.

Die Forschung der Abteilung Bioverfahrenstechnik ist eingebunden in die abteilungsübergreifende 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) an der Abteilung Bioverfahrenstechnik bearbeitet Fragestellungen aus dem Bereich der angewandten Mikrobiologie. Zu den Arbeitsschwerpunkten gehören u.a. die Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften in technischen Anwendungen mittels molekulargenetischer Methoden, die Entwicklung von markergestützten Nachweisverfahren für bioverfahrenstechnisch genutzte Mikroorganismen sowie die gentechnische Optimierung von Fermentationsstämmen.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Durchführung der Fermentationsversuche

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte vorrangig eine mikrobiologische Systemanalyse des experimentellen zweiphasigen und zweistufigen Biogasreaktorsystems bestehend aus einem Fermenter (*leachbed* Reaktor) zur Hydrolyse (*bioleaching*) von nachwachsenden Rohstoffen und einem Anaerobfilter (Festbettreaktor) zur Ansiedlung methanbildender Mikroorganismen (Archaea) erfolgen, welches im Rahmen des Teilprojektes 03SF0317G (Leitung: Prof. Dr. B. Linke, Projektbearbeiterin: Dipl.-Ing. M. Schönberg) eingerichtet wurde. Zur Beantwortung einzelner Fragestellungen wurden zusätzliche, eigene Fermentationsversuche durchgeführt (Übersicht Tab. 1).

Versuchsbegleitende Probennahme

Die Probennahme erfolgte aus beiden Stufen (Hydrolysereaktor und Anaerobfilter) eines zweiphasigen, zweistufigen Fermenters. Der Zeitpunkt der Probennahme orientierte sich an dem jeweiligen Prozesszustand bzw. den aktuellen Gaswerten und Säuregehalten. Primär wurde der Reaktor während einer als „normal“ einzustufenden Betriebsweise beprobt.

Im Rahmen eines gesonderten Versuchs wurde zusätzlich ein Fermenter zu folgenden Zeitpunkten beprobt: (1) Startphase, (2) *steady-state* Phase, (3) Phase der Fehlversäuerung. Letztere wurde durch eine gezielte Überladung mit organischem Material erreicht.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die räumliche Verteilung methanogener Archaea in dem Anaerobfilter des zweistufigen Reaktorsystems untersucht. Hierzu wurde die Prozessflüssigkeit und der Biofilm auf der Oberfläche der Füllkörper beprobt.

Isolierung der mikrobiellen genomischen DNA

Zur Isolierung und Reinigung der mikrobiellen DNA wurde ein Protokoll basierend auf folgenden Schritten etabliert: (1) Reinigung der mikrobiellen Zellen mittels mehrerer Waschschritte, (2) Lyse der Zellen mittels lytischer Enzyme und Detergenzien teilweise unterstützt durch physikalische Verfahren, (3) Reinigung des Zellextraktes durch Detergenzien, organischer Extraktion und DNA-Fällung. Grundlage der Verfahren bildeten verschiedene bereits publizierte Verfahren aus der Umwelt- und Abwassermikrobiologie.

Anlage von 16S rDNA Klonbibliotheken

Aus der isolierten mikrobiellen DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) selektiv die 16S rDNA Sequenz mithilfe von Standard-Universal-Primern [nach verschiedenen Autoren] vermehrt. Je nach Versuch wurden selektive Primer für Bacteria (= hydrolytisch aktive Mikroflora) oder für Archaea (= methanbildende Mikroorganismen) eingesetzt.

Anschließend wurde das 16S rDNA Amplifikat in einen Standardvektor (pGEM-T) mittels TA-Klonierung überführt. Zur Konstruktion einer 16S rDNA Klonbibliothek wurden die rekombinierten Plasmide in *E. coli* Zellen transformiert. Die rekombinanten Stämme (Klone) wurden durch Ausstrich auf Agarplatten vereinzelt.

Analyse der 16S rDNA Sequenzen

Zur Artbestimmung muss von den 16S rDNA Sequenzen die genaue Nukleotidsequenz ermittelt werden. Dieser Schritt ist jedoch kostenintensiv und produziert in hohem Maße redundante Daten. Im Rahmen dieses Projektes wurde daher eine Voranalyse der 16S rDNA Sequenzen mittels ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*, auch als PCR-RFLP bezeichnet) durchgeführt. Hierzu wurde jede klonierte 16S rDNA einzeln mittels PCR vermehrt und anschließend enzymatisch verdaut. Anhand des resultierenden Fragmentmusters (*fingerprint*) konnte dann auf gleiche oder verschiedene Arten geschlossen werden. Je Fragmentmuster wurde ein repräsentativer Klon ausgewählt und dessen 16S rDNA Nukleotidsequenz ermittelt. Die taxonomische Klassifizierung der Ursprungsorganismen erfolgte über die bioinformatische und phylogenetische Analyse der erhaltenen Nukleotidsequenz.

Aufbau einer fingerprint-Datenbank zur Analyse von Proben aus Biogas-Fermentern

Zur Bearbeitung und Verwaltung der im Rahmen des Projektes erzeugten *fingerprints* wurde ein Programm auf Basis von LabView entwickelt. Die zugehörigen Sequenzinformationen wurden in der NCBI-Genbank publiziert.

Fluoreszenz-mikroskopische Analyse

Parallel zu der 16S rDNA Analyse sollte eine fluoreszenz-mikroskopische Analyse der *Archaea*-Population erfolgen. Eine entsprechende Methodik wurde am ATB etabliert.

Änderungen gegenüber dem ursprünglich geplanten Versuchsprogramm

Gegenüber dem geplanten Versuchsprogramm wurden keine wesentlichen Änderungen vorgenommen.

Jedoch konnten aus verschiedenen technischen Gründen nicht alle Versuche mit Probenmaterial aus dem zweistufigen Reaktorsystem von Teilprojekt 03SF0317G durchgeführt werden (vgl. Schlussbericht TP 03SF0317G). Alternativ wurden andere zweistufige Reaktorsysteme auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen beprobt bzw. eigene experimentelle Biogas-Fermentationen durchgeführt.

Ergänzend zu der ursprünglichen Projektplanung wurde in einzelnen Versuchsansätzen zusätzlich die Methode der quantitativen *realtime*-PCR (Q-PCR) zur Quantifizierung methanogener Archaea genutzt.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, welche für das Vorhaben benutzt wurden

Konventionelle, kontinuierlich gerührte Biogasreaktoren, wie sie üblicherweise für die Verwertung von Gülle verwendet werden, sind häufig nicht in der Lage, größere Mengen an pflanzlicher Biomasse wirtschaftlich zu verwerten. Der zwingend erforderliche hohe Eintrag von Biomasse sowie dessen physikalisches Verhalten stellen erhöhte Ansprüche an die Rührtechnik bzw. -leistung, welche konventionelle Biogasreaktoren konstruktionsbedingt nicht erfüllen können oder deren Betrieb unwirtschaftlich werden lässt.

Im Rahmen des gesondert beantragten Teilprojektes 03SF0317G sollte daher als alternatives System ein zweiphasiges und zweistufiges System mit räumlicher Trennung von Hydrolyse (*bioleaching*) und Methanogenese (Hauptfermentation) erprobt werden. Da sich dieses System gegenwärtig noch in der experimentellen Phase befindet, sollte hierzu begleitend eine Charakterisierung der mikrobiellen Biozönosen erfolgen.

Als Substrat zur Biomethanisierung sollte im Rahmen dieses Projektes ausschließlich pflanzliche Biomasse genutzt werden. Die geplanten Arbeiten sollten sich auf folgende zwei Pflanzenarten konzentrieren:

- (1) Weite Verbreitung im Anbau besitzt Mais. Seine hohe Biomasse- und Stärkeproduktionsleistung prädestinieren Mais für die Biomethanisierung. Zudem erfolgt gegenwärtig eine verstärkte Züchtung spezieller 'Energiesorten'.
- (2) Von regionaler Bedeutung für das Land Brandenburg ist der Anbau von Roggen. Roggen ist erfahrungsgemäß ebenfalls sehr gut als Substrat für eine Biomethanisierung geeignet.

Der Prozess der anaeroben Biokonversion besteht im Wesentlichen aus vier eng miteinander verknüpften Abbauschritten (Abb. 1) [Ahring 2003]. Hierbei wird allgemein angenommen, dass bestimmte Gruppen von Mikroorganismen für bestimmte Stoffwechselreaktionen verantwortlich sind. Die Intermediate oder auch Endprodukte dieser Stoffwechselreaktionen stellen wiederum die Substrate für andere Mikroorganismen dar.

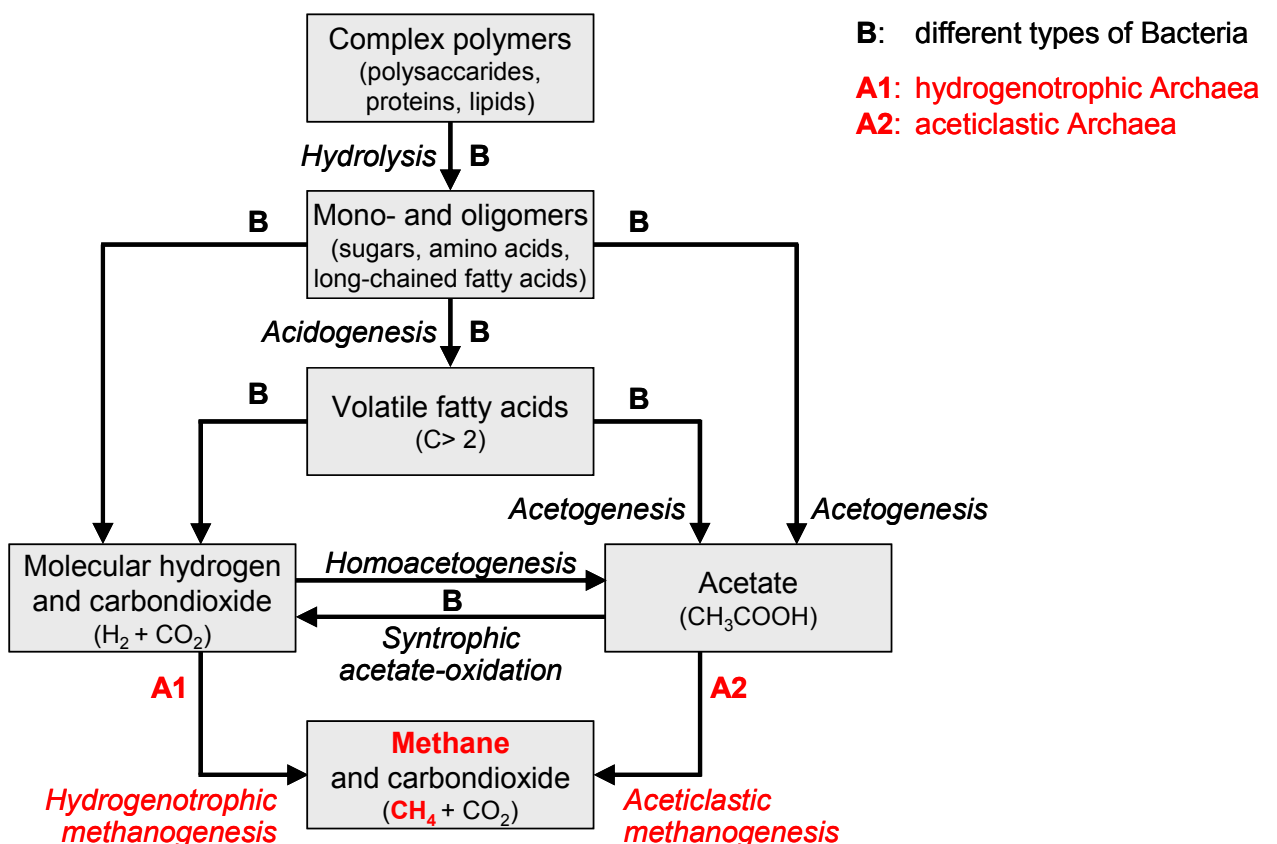


Abb. 1: Intermediate bei der Bildung von Methan

Übertragen auf den Prozess des anaeroben Abbaus pflanzlicher Biomasse bedeutet dieses, dass das Verfahren idealerweise in einem mehrstufigen Verfahren durchgeführt werden sollte, welches für die unterschiedlichen Gruppen von Mikroorganismen optimale Verhältnisse bietet.

Endprodukt des anaeroben Abbaus ist u.a. Methan (CH_4) als energetisch wertvoller Bestandteil des Biogases. Methan kann je nach Verfahren bis zu 80% des Biogases ausmachen, durchschnittlich besteht Biogas aus ca. 50-60% Methan, zu 35-45% CO_2 sowie aus geringeren Anteilen verschiedener gasförmiger Verbindungen.

Problematisch bei der Analyse der mikrobiellen Prozesse in Biogas-Reaktoren mithilfe klassischer mikrobiologischer Methoden ist, dass geeignete Techniken zur Kultur dieser Organismen aufgrund ihrer teilweise obligat anaeroben Lebensweise, hohen Substratanforderungen und symbiotischer Beziehungen nur mit großem Arbeits- und Technikaufwand etabliert werden können. Schätzungen zufolge können aus anaeroben Lebensräumen nur 1-5 % der Bakterien isoliert und damit charakterisiert werden. Als Alternative, welche gänzlich ohne eine Kultivierung der Bakterien anwendbar ist, hat sich die Analyse der 16S rDNA bewährt. Die Gesamtheit aller 16S rDNA Anteile innerhalb einer Biozönose kann durch die PCR-gestützte Klonierung in einer 16S rDNA Bank in Kombination mit einer Restriktionsfragment-Analyse (ARDRA, auch als PCR-RFLP-Analyse bezeichnet) erfolgen. Die eindeutige Identifizierung individueller OTU (= *operational taxonomic units*) erfolgt durch Sequenzierung der entsprechenden Klone und nachfolgendem Abgleich mit einer rDNA Datenbank. Diese Technik hat sich für die Analyse einer Vielzahl von Biozönosen sowohl natürlichen Ursprunges wie auch innerhalb technischer Anwendungen bewährt.

Zum spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung einzelner Arten oder Gruppen von Mikroorganismen lassen sich zwei verschiedene Techniken einsetzen: Die 16S rDNA gestützte Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) markiert Zellen art- bzw. gattungsspezifisch, die Quantifizierung innerhalb von Proben erfolgt mikroskopisch. Alternativ kann die quantitative PCR (auch als *realtime*-PCR bezeichnet, Abk.: Q-PCR) genutzt werden [Yu et al. 2005, 2006]. Diese Technik ist insbesondere sehr gut für die Analyse hoher Probenzahlen geeignet.

Verwendete Fachliteratur

- Ahring, B. (2003): Perspectives for anaerobic digestion. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 81: 1-30.
- Amann, R.L.; Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Chan, R.K., Wortman, C.R., Smiley, B.K. & Hendrick, C.A. (2003): Construction and use of a computerized DNA fingerprint database for lactic acid bacteria from silage. *Journal of Microbial Methods* 55: 565-574.
- Fernandez, A.; Huang, S. Y.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C. & Tiedje, J. (1999): How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3697-3704.

- Friedrich, U.; Prior, K.; Altendorf, K. & Lipski, A. (2002): High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. *Environmental Microbiology* 4: 721-734.
- Hall, S. J.; Hugenholtz, P.; Siyambalapitiya, N.; Keller, J. & Blackall, L.L. (2002): The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. *Water Science and Technology* 46: 267-272.
- Head, I.M. Saunders, J.R. & Pickup, R.W. (1998): Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35: 1-21.
- Heiermann, M.; Schelle, H. & Plöchl, M. (2002): Biogaspotenziale pflanzlicher Kosubstrate. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 32: 15-20.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B.M. & Pace, N.R. (1998): Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180: 4765-4774. +Erratum 180: 6793-6793.
- Imachi, H.; Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Ohashi, A. & Harada, H. (2000): Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3608-3615.
- Kolb, S.; Knief, C.; Stubner, S. & Conrad, R. (2003): Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2423-2429.
- Kuratorium für Technik in der Landwirtschaft (2005): Gasausbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. KTBL-Schrift Nr. 50. Landwirtschaftsverlag, Münster: 2005.
- Lebuhn, M.; Effenberger, M.; Gronauer, A.; Wilderer, P.A. & Wuertz S. (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Science and Technology* 48: 97-103.
- Linke, B. (2003): Biogas aus Energiepflanzen. *Agrartechnische Forschung* 9: 78-82.
- Linke, B. & Thieme, H.-J. (1996): Biogasgewinnung aus Schweinegülle und anderen organischen Reststoffen durch Cofermentation. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 12: 94-104.
- Liu, W.T.; Marsh, T.L.; Cheng, H. & Forney, L.J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522
- Oude Elferink, S.J.W.H.; van Lis, R.; Heilig, H.G.H.J.; Akkermans, A.D.L. & Stams, A.J.M. (1998): Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation* 9: 169-177.
- Sekar, R.; Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Warnecke, F.; Posch, T. & Amann, R. (2003): An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2928-2935.
- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Nakamura, K.; Ohashi, A. & Harada, H. (1999): Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1280-1288.

- Ward, D.M.; Weller, R. & Bateson, M.M. (1990): 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FEMS Microbiological Reviews* 6: 105-115.
- Weisburg, W.G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. & Lane, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Yu, Y.; Kim, J. & Hwang, S. (2006): Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures. *Biotechnology and Bioengineering* 93: 424-433.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 670-679.

Benutzte Informations- und Dokumentationsdienste

Im Rahmen dieses Vorhabens wurden folgende Literaturdatenbanken genutzt:

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

Des Weiteren wurden folgende Informations- und Dokumentationsdienste genutzt:

- Datenbank für DNA-Sequenzen *GenBank* und ergänzende Dienste des *National Center for Biotechnology Information* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]
- Datenbank für 16S rRNA Sequenzen *Ribosomal database project* [<http://rdp.cme.msu.edu>]
- Datenbank für DNA-Sonden *probeBase* der Universität Wien [URL: <http://www.microbial-ecology.net/probebase>]

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Vorhaben war ein Teilprojekt im Rahmen des Forschungsverbundes Biogas-Crops-Network (BCN) unter Koordination durch das Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte (IASP) an der Humboldt-Universität zu Berlin.

Für dieses Teilprojekt erfolgte eine Zusammenarbeit vorrangig mit folgenden Partnern aus dem BCN-Verbund:

- Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg
Fachgebiet Lifetec Engineering

- Humboldt-Universität zu Berlin
Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät
Fachgebiet Agrartechnik
- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Landtechnik und Tierhaltung
Abteilung Umwelttechnik in der Landnutzung

Die Zusammenarbeit innerhalb des BCN erfolgte in Form von halbjährlichen Statusseminaren unter Beteiligung aller Projektpartner sowie in Form von bilateralen Arbeitstreffen und Workshops.

II.1 Ergebnisse

Im Folgenden erfolgt vorrangig die Darstellung der Arbeitsergebnisse des Teilprojektes. Die Darstellung der Fermentationsversuche wird beschränkt auf einzelne für die mikrobiologische Analytik relevante Aspekte. Eine detaillierte Darstellung der jeweiligen Fermentationsbedingungen und -parameter finden sich in den jeweiligen Fachpublikationen sowie in dem Schlussbericht zu Teilprojekt 03SF0317G.

II.1.1 Arbeiten zur Erreichung der technischen Arbeitsziele

Etablierung der notwendigen molekulargenetischen Analytik

Im Rahmen des Vorhabens wurde ein Protokoll zur molekularen Analyse der Mikroorganismen in Biogasreaktoren etabliert (Abb. 2). Je nach konkreter Fragestellung beinhaltet jede Stufe der Aufarbeitung verschiedene Modifikationen bzw. Einzelanalysen.

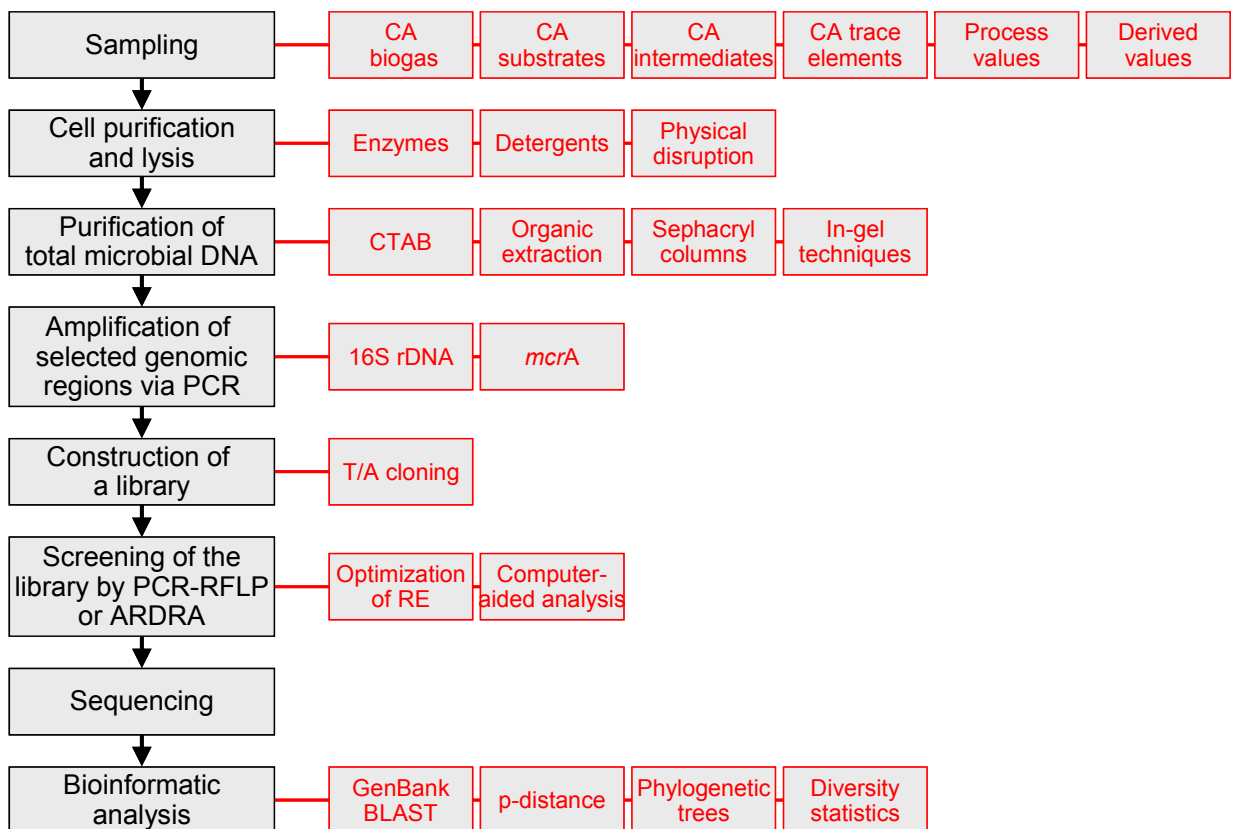


Abb. 2: Ablauf der Probenaufbereitung für die molekulargenetische Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Biogasfermentern. Links ist der Aufarbeitungsfluss dargestellt. Auf der rechten Seite sind hierzu jeweils einzelne Aspekte der Analyse bzw. Modifikation aufgeführt.

CA= Chemische Analyse; CTAB= Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid; 16S rDNA= Gensequenz für die taxonomische Klassifizierung von Prokaryoten; *mcrA*= Methyl-Coenzym-M-Reductase, α -Untereinheit, Gensequenz für die taxonomische Klassifizierung von methanogenen Archaea; RE= Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonucleasen.

Detaillierte Angaben zu den jeweiligen Versuchsprotokollen sind in folgenden Publikationen zu finden: Klocke et al. 2007, Souidi et al. 2007, Klocke et al. 2008, Blume et al. (Manuskript eingereicht zum Review).

Entwicklung einer computergestützten fingerprint-Analytik und Aufbau einer fingerprint-Datenbank

Eine Evaluierung der kommerziell erhältlichen Software-Programme zur Fragmentanalyse und Bildauswertung ergab, dass viele Programme für die aktuelle Fragestellung ungeeignet waren. Eventuell geeignete Programme waren dagegen mit einem unverhältnismäßig hohen Investitionsaufwand verbunden. Da keine kostengünstige, für die Fragestellung geeignete Software ermittelt werden konnte, wurde basierend auf der weit verbreiteten Programm-Plattform LabView eine eigene Software-Lösung entwickelt und erfolgreich zur Analyse auch umfangreicherer Klonbibliotheken (>1000 *fingerprints*) eingesetzt (Abb. 3).

Die entwickelten Applets sind so entworfen, dass sie außer der Gelbild-Auswertung auch automatisch eine *fingerprint*-Datenbank erzeugen sowie kompatibel für die gängigsten Bildformate (jpg, tif, bmp) sind.

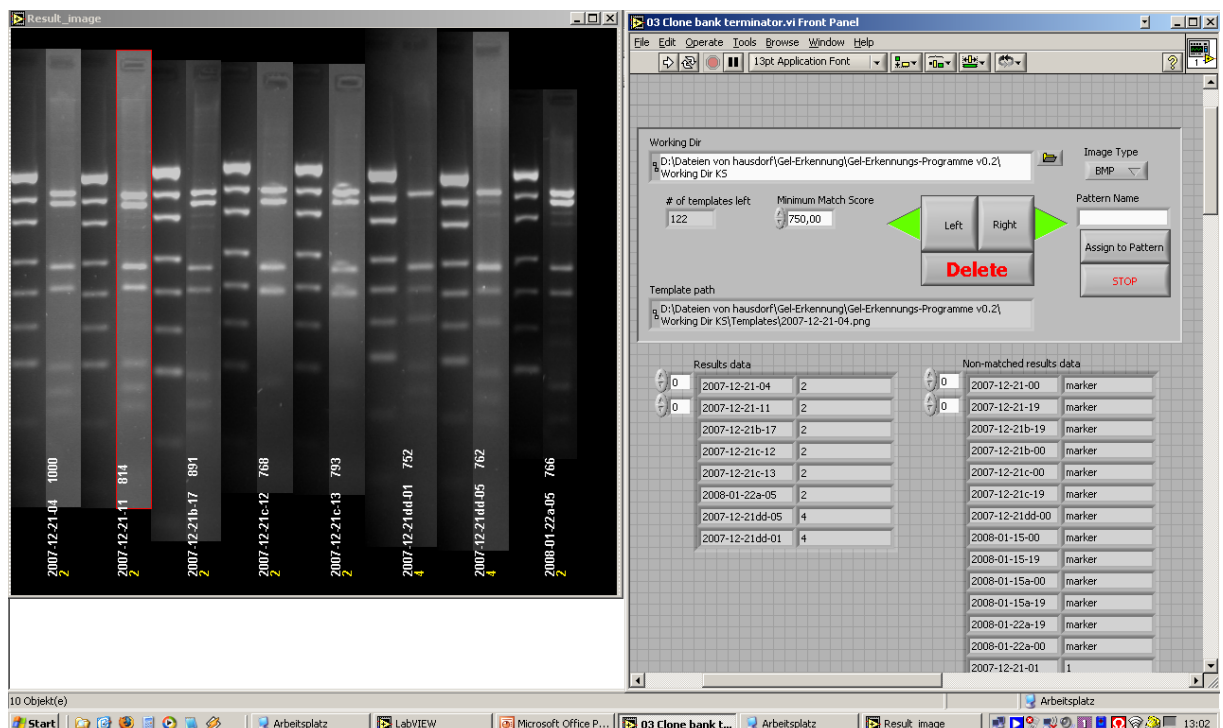
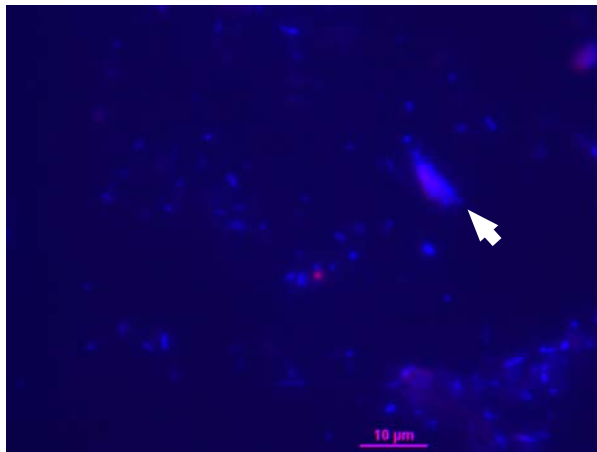


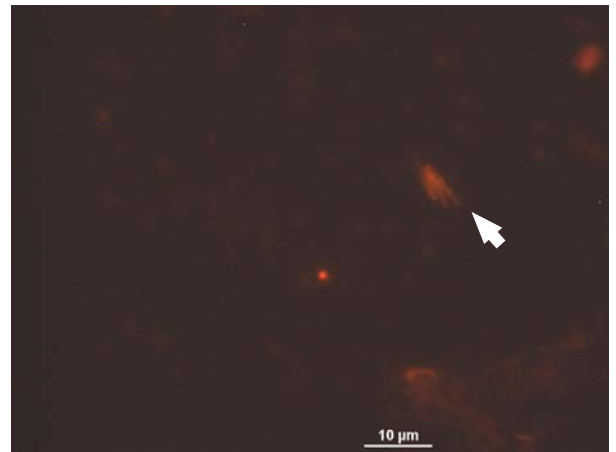
Abb. 3: Screenshot der entwickelten LabView-Applikation zur Einordnung und Sortierung von PCR-RFLP Mustern und zur Verwaltung der *fingerprint*-Datenbank. Zu sehen ist der Vergleich zweier *fingerprints* (2 und 4, gelbe Markierung im linke Fenster).

Etablierung und Nutzung der FISH-Mikroskopie zur gruppenspezifischen Quantifizierung von Archaea und Bacteria

Parallel zu der 16S rDNA Analyse sollte die fluoreszenz-mikroskopische Analyse der *Archaea*-Population erfolgen. Die hierzu erforderliche Technik wurde im Rahmen dieses Vorhabens am ATB aufgebaut und in enger Kooperation mit den BCN-Partnern (insbesondere HAW Hamburg) sowie der TU Berlin etabliert (Abb. 4).



+ DAPI
(= unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff für DNA)



+ FISH-Sonde MX825
(= spezifische Sonde für Methanosaetaceae, CY3-markiert)

Abb. 4: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen einer Biogasreaktorprobe bei 600x Vergrößerung. Der Pfeil markiert eine filamentöse Aggregation von *Methanosaeta* sp.

II.1.2 Arbeiten zur Erreichung der wissenschaftlichen Arbeitsziele

Auswahl der Biogasreaktoren

Für dieses Vorhaben wurden verschiedene Reaktorsysteme auf Basis nachwachsender Rohstoffe beprobt (Tab. 1). Hierbei handelte es sich sowohl um Systeme im Labormaßstab als auch um eine Pilotanlage im Praxismaßstab. Das Reaktorsystem 3 wurde eigens für die BCN-Vorhaben eingerichtet. In Ergänzung zu der ursprünglichen Planung wurden ebenfalls Anlagen betrieben mit Triticale-Silage in die Arbeiten einbezogen.

Zusätzlich zu den zweistufigen Systemen 1-3 wurden im Rahmen von Vorarbeiten drei einstufige Systeme (Rührkesselreaktoren im Labormaßstab, Systeme 4-6) mit in diese Studie einbezogen.

Tab. 1: Im Rahmen dieses Vorhabens beprobte Biogasreaktoren. Reaktorsystem 3 wurde im Rahmen eines gesonderten Teilprojektes im BCN-Verbund (03SF0317G) eingerichtet und betrieben. Reaktorsystem 4 diente zur Methodenetablierung und als Referenzsystem. Reaktorsystem 6 wurde zur Analyse des Einflusses einer Belastungssteigerung auf die methanogene Archaea-Population verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurde erfolgte die Probennahme aus der Reaktorflüssigkeit bzw. dem Ablauf.
LBR= *leachbed reactor* (Hydrolyse-Stufe); AF= *anaerobic filter* (Festbettreaktor zur Ansiedelung methanogener Archaea); CSTR= *completely stirred tank reactor* (Rührkesselreaktor); n.s.= nicht beprobt; n.a.= nicht analysiert.

Reactor system				Temperature	Substrate	Loading rate	Sampling
System	Stages	Construction	Volume				
System 1 (Lab system)	3x LBR	Up-flow	70 l	Mesophilic (38°C)	Triticale silage	(4.8 - 5.7 kg _{VS} m ⁻³ d ⁻¹)	LBR1 (RT of silage 7 d), LBR2 (RT of silage 14 d)
	1x AF	Down-flow	70 l				AF
System 2 (Biogas plant)	4x LBR	Up-flow	150 m ³	Mesophilic (37°C)	Triticale silage, cattle manure	(10 - 17 kg _{FM} m ⁻³ d ⁻¹)	LBR2 (RT of silage 14 d)
	1x AF	Down-flow	150 m ³				AF
System 3a (Schönberg/Linke)	3x LBR	Trickling, parallel operated	106 l	Mesophilic (37°C)	Rye silage	2.2 kg _{TS} m ⁻³ d ⁻¹	n.s.
	3x AF	Down-flow, parallel operated	60 l				AF1 (process fluid), AF1 (biofilm on surfaces), AF2 AF3
System 3b (Schönberg/Linke)	2x LBR	Trickling, operated in row	106 l	Mesophilic (37°C)	Rye silage	2.2 kg _{TS} m ⁻³ d ⁻¹	LBR1 (RT of silage 2 d), LBR1 (RT of silage 4 d), LBR1 (RT of silage 14d)
	3x AF	Down-flow, parallel operated	60 l				n.a.
System 4 (Lab system)	1x CSTR		9 l	Mesophilic (35-37°C)	Maize silage, cattle manure	var.	Process fluid
System 5 (Lab system)	1x CSTR		8 l	Mesophilic (35°C)	Fodder beet	var.	Process fluid
System 6 (Lab system)	1x CSTR		10 l	Mesophilic (37°C)	Maize silage	var.	Process fluid



Abb. 5: Ansichten der beprobten Reaktorsysteme 1-4. Die Systeme 5-6 ähneln im Aufbau System 4.

Analyse der mikrobiellen Biozönosen in einstufigen Biogasfermentationen bei Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen als Substrat unter Verwendung molekulargenetischer Methoden

Erste Arbeiten zu Beginn des Vorhabens behandelten die Einarbeitung der Projektmitarbeiter sowie die Etablierung bzw. Optimierung der Laborprotokolle (vgl. Abb. 2). Das hierfür erforderliche Probenmaterial wurde aus einem Labormodell eines komplett durchmischten Tankreaktors (CSTR, **System 5**) gewonnen. Biogasfermentoren vom CSTR-Typ sind aufgrund ihrer kostengünstigen Bauweise in der Landwirtschaft weit verbreitet. Die Beschickung des Reaktors erfolgte kontinuierlich und ausschließlich mit pflanzlichem Substrat (Futtermüllsilage).

Folgende Prozessparameter des Reaktors wurden erfasst: pH-Wert, Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren, N:P Verhältnis sowie Ausbeute, Bildungsrate und Zusammensetzung des Biogases. Die durchschnittliche Biogasbildung lag bei $0,87 \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ bei einer Belastung von $1,2 - 2,3 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Diese Ausbeute entsprach 94% der theoretischen Maximalausbeute.

Zur Identifizierung der an der Biogasbildung bzw. dem Abbau der pflanzlichen Biomasse beteiligten Mikroorganismen wurde eine 16S rDNA Klonbibliothek unter Verwendung von Primern spezifisch für Prokaryoten konstruiert. Von dieser Klonbibliothek wurden 147 Klone mittels ARDRA (PCR-RFLP) analysiert. Insgesamt wurden 60 ARDRA Muster erhalten und als eigenständige taxonomische Einheiten (*operational taxonomic units*, OTUs) gewertet (Abb. 6).

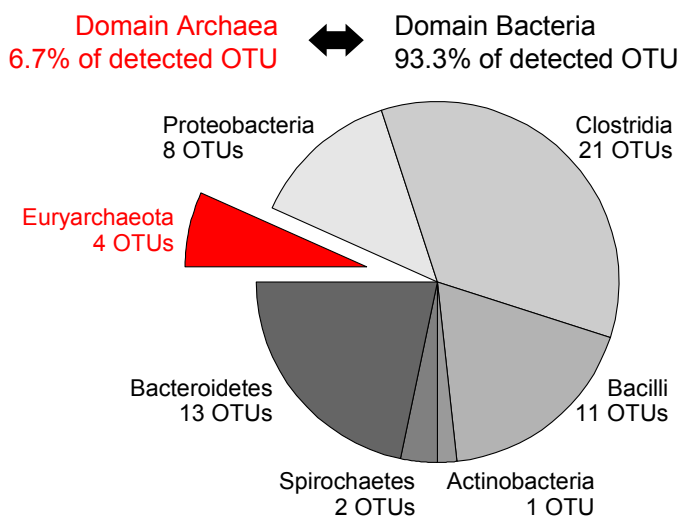


Abb. 6: Verteilung der in System 5 detektierten taxonomischen Einheiten (OTU).

Von diesen 60 OTUs konnten 4 methanogenen Archaea zugeordnet werden (Abb. 7). Weiterhin konnten eine Reihe von Vertretern der Stämme Firmicutes (33 OTUs, 44% aller 16S rDNA Klone), Proteobacteria (8 OTUs, 24% aller 16S rDNA Klone) sowie Bacteroidetes (13 OTUs, 21% aller 16S rDNA Klone) detektiert werden.

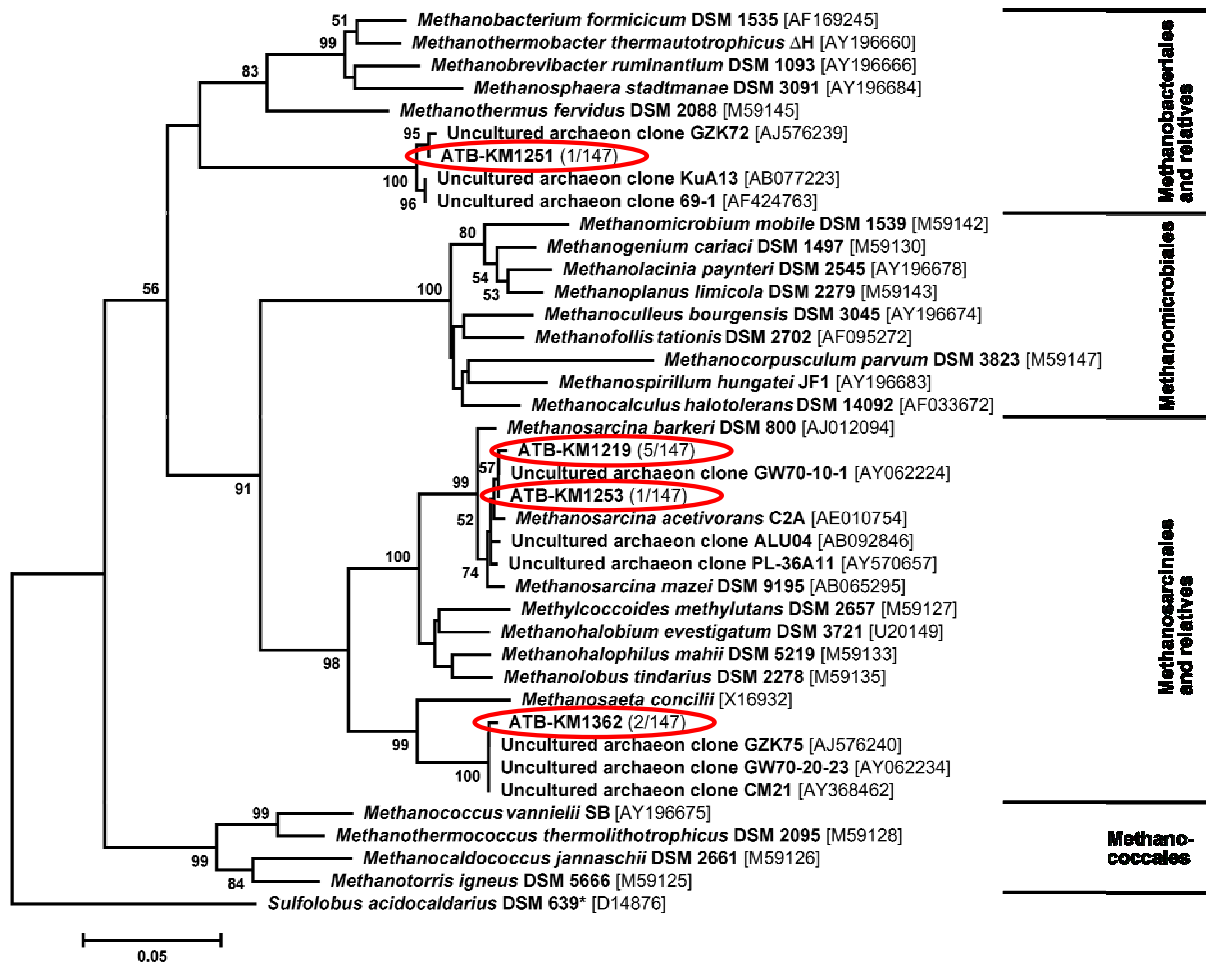


Abb. 7: Phylogenetische Darstellung des taxonomischen Systems der methanogenen Archaea [verändert nach Klocke et al. 2007]. Markiert sind die in dem System 5 nachgewiesenen OTUs.

Wie erwartet, wurden in System 5 sowohl hydrogenotrophe wie auch acetotrophe, acetiklastische Methanogene detektiert, welches ein Zeichen einer effektiven Substratverwertung ist. Weiterhin ist auffällig, dass viele der detektierten 16S rDNA Sequenzen größere Distanzen zu den bekannten Typenstämmen aufweisen (vgl. Abb. 7). Dieses kann als Beleg für das Vorkommen von bislang unbeschriebenen Mikroorganismen mit u.U. neuartigen Wegen der Substratnutzung gewertet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in der Zeitschrift *Systematic and Applied Microbiology* publiziert [Klocke et al. (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. Syst. Appl. Microbiol. 30:139-151].

Grundsätzliche Erkenntnis dieser Arbeit war, dass zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft die bakterielle (fermentative bzw. hydrolytisch-aktive Mikroorganismen) und die archaeelle (= methanogene Mikroorganismen) Mikroflora aufgrund der in dem Probenmaterial vorhandenen, großen Biodiversität in getrennten Ansätzen betrachtet werden müssen. Für die Etablierung eines solchen Ansatzes wurden geeignete Primersets bzw. PCR-Regime entwickelt und zur Analyse eines weiteren Biogas produzierenden Rührkesselreaktor (CSTR,

System 4, Kofermentation von Maissilage und Rindergülle) verwendet. Hierbei wurden zwei 16S rDNA Bibliotheken jeweils spezifisch für methanogene Archaea (81 Klone) und fermentative Bacteria (118 Klone) konstruiert.

Der CSTR wies eine hohe Diversität innerhalb der methanogenen Archaea auf. Aus der Ordnung Methanomicrobiales wurden acht OTUs nachgewiesen, für die Ordnung Methanosarcinales drei OTUs und für die Ordnung Methanobacteriales zwei OTUs. Eine weitere OTU wies eine deutliche genetische Distanz zu den bekannten taxonomischen Ordnungen auf. Die Ordnung Methanococcales wurde nicht detektiert. Die meisten OTUs (71%) konnten in Verwandtschaft zu hydrogenotrophen Methanbildnern wie *Methanoculleus bourgensis*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanospirillum hungatei* und *Methanocorpusculum parvum* gesetzt werden. Acetat-verwertende Archaea wurden mit drei OTUs verwandt zu *Methanosarcina barkeri* und *Methanosaeta concilii* detektiert.

Innerhalb der Domäne Bacteria wurde eine hohe Diversität unter den Vertretern der Phyla Firmicutes (27 OTUs) und Bacteroidetes (13 OTUs) festgestellt. Ebenso wurden mehrere OTUs der Phyla Proteobacteria (4 OTUs), Spirochaetes (2 OTUs), Fibrobacteres (1 OTU) und Chloroflexi (1 OTUs) detektiert. Weitere zehn OTUs konnten nicht taxonomisch eingeordnet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in der Zeitschrift *Agrartechnische Forschung / Agricultural Engineering Research* publiziert [Souidi et al. (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agrartechn. Forsch. / Agr. Eng. Res.* 13:197-206].

Analyse der methanogenen Archaea-Gemeinschaft in zweiphasigen, zweistufigen Biogasfermentationen mit bioleaching von Triticale-Silage

Um einen ersten Einblick in die Struktur und Verteilung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften eines mehrstufigen Biogasreaktors zu bekommen, wurde eine Analyse der archaeellen Diversität in einem Labormodell eines mesophil betriebenen, zweiphasigen *leachbed* Reaktors mit Anaerobfilter durchgeführt (**System 1**). Die Beschickung des Systems erfolgte kontinuierlich mit Triticale-Ganzpflanzensilage.

Sowohl für die Hydrolyse-Stufe als auch für den Anaerobfilter wurden DNA-Banken spezifisch für die Archaea 16S rDNA (Fragmentgröße ca. 850 bp) angelegt. Insgesamt wurden drei 16S rDNA Bibliotheken mit zusammen 449 Klonen entwickelt. In diesen wurden 84 verschiedene OTUs detektiert, von welchen 35 der Domäne Archaea zugeordnet werden konnten. Die Archaea OTUs konnten den Ordnungen Methanosarcinales, Methanomicrobiales und Methanobacteriales sowie den bislang unkultivierten und taxonomisch nicht eingeordneten Gruppen CA-11 und ARC-I zugeordnet werden. Dominierend in den 16S rDNA Banken waren OTUs verwandt mit acetat-verwertenden Methanosarcinales wie *Methanosaeta* sp. Wasserstoff verwertende Archaea wurden mit einer reichen Diversität detektiert. Die größten Gruppen in den 16S rDNA Bibliotheken wurden von OTUs verwandt mit *Methanocorpusculum* sp. und *Methanoculleus* sp. gebildet.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in der Zeitschrift *Systematic and Applied Microbiology* publiziert [Klocke et al. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-

phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst. Appl. Microbiol. 31:190-205].

Basierend auf dem Prinzip von System 1 wurde im Rahmen eines gesonderten Projektes eine Pilotanlage im Praxismaßstab eingerichtet (**System 2**). Bei diesem System wurden sowohl Hydrolyse-Stufe wie auch Anaerobfilter beprobt. Aus beiden Proben wurde jeweils eine Archaea spezifische 16S rDNA Klonbibliothek konstruiert (Tab. 2)

Tab. 2: In der zweistufigen, zweiphasigen Pilotanlage nachgewiesene methanogene Archaea [verändert nach Klocke et al. 2008].

Assumed phylogenetic affiliation	Two-phase pilot plant (system 2) - mesophilic, Triticale-silage							
	Anaerobic filter				Leach bed reactor			
	OTU		Clones		OTU		Clones	
Total analyzed	23		107		22		107	
Removed from analysis			5				5	
Assigned to domain Bacteria	6		6		2		3	
Total Archaea	17	100 %	96	100 %	20	100 %	99	100 %
Methanosarcinales	4	24 %	10	10 %	6	30 %	30	30 %
<i>Methanosaeta</i> sp.	2	12 %	2	2 %	2	10 %	5	5 %
<i>Methanosarcina</i> sp.	2	12 %	8	8 %	3	15 %	24	24 %
<i>Methanimitococcus</i> sp.	ND				1	5 %	1	1 %
Methanomicrobiales	8	47 %	73	76 %	8	40 %	61	62 %
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	ND				ND			
<i>Methanoculleus</i> sp.	7	41 %	68	71 %	6	30 %	50	51 %
<i>Methanospirillum</i> sp.	1	6 %	5	5 %	1	5 %	9	9 %
<i>Methanofollis</i> sp.	ND				1	5 %	2	2 %
<i>Methanomicrobium</i> sp.	ND				ND			
Unknown	ND				ND			
Methanobacteriales	3	18 %	8	8 %	3	15 %	4	4 %
<i>Methanobacterium</i> sp.	1	6 %	1	1 %	2	10 %	2	2 %
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	2	12 %	7	7 %	1	5 %	2	2 %
CA-11 lineage	1	6 %	3	3 %	2	10 %	3	3 %
ARC-I lineage	1	6 %	2	2 %	1	5 %	1	1 %

Im Unterschied zu dem System 1 wurden in dem vergrößerten System 2 wesentlich seltener Acetat verwertende Methanogene der Gattung *Methanosaeta* nachgewiesen. Stattdessen wurden in der Pilotanlage überwiegend hydrogentrophe Methanbildner insbesondere der Gattung *Methanoculleus* gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden zusammen mit den Ergebnissen zu System 1 in der Zeitschrift *Systematic and Applied Microbiology* publiziert [Klocke et al. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst. Appl. Microbiol. 31:190-205].

Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit bioleaching von Roggen-Silage - Analyse der Struktur der methanogenen Archaea in dem Anaerobfilter

In Kooperation mit TP 03SF0317G wurde eine Analyse eines mesophil betriebenen *bioleaching* Reaktors ausschließlich betrieben mit Roggen-Ganzpflanzensilage begonnen (**System 3a**). Details zu diesem System sind dem Abschlussbericht dieses Teilprojektes (03SF0317G) zu entnehmen.

Ziel der Analyse war die Beschreibung der methanogenen Archaea Population in den Festbett-Anaerobfiltern. Zusätzlich war zu klären, ob sich in den drei parallel geschalteten Anaerobfiltern eine vergleichbare methanogene Mikroflora etabliert hat.

Hierzu wurden drei 16S rDNA Bibliotheken, eine je Anaerobfilter, spezifisch für methanogene Archaea konstruiert (Tab. 3). Zusammen umfassten die drei Bibliotheken 432 Klone. Mittels ARDRA konnten in den drei 16S rDNA Bibliotheken 42 OTUs detektiert werden. Von diesen 42 OTUs erwiesen sich nach Sequenzierung des jeweiligen 16S rDNA Fragments 39 OTUs als zugehörig zu der Domäne Archaea. Diese 39 Archaea OTUs fanden sich bei der Mehrzahl der Klone der 16S rDNA Bibliothek, insgesamt bei 408 Klonen.

Tab. 3: In dem zweistufigen Laborsystem von TP 03SF0317G nachgewiesene methanogene Archaea.

Assumed phylogenetic affiliation	Substrate for methanogenesis	Anaerobic filter 1				Anaerobic filter 2				Anaerobic filter 3			
		OTU		Clones		OTU		Clones		OTU		Clones	
Total analyzed		21		144		20		144		21		144	
Removed from analysis				2				9				9	
Assigned to domain Bacteria		1		2				0		2		2	
Total Archaea		20	100 %	140	100 %	20	100 %	135	100 %	19	100 %	133	100 %
Methanosarcinales		6	30 %	20	14 %	6	30 %	19	14 %	5	26 %	10	8 %
<i>Methanosaeta</i> sp.	Acetate	4	20 %	13	9 %	4	20 %	14	10 %	4	21 %	9	7 %
<i>Methanosarcina</i> sp.	Various	1	5 %	6	4 %	1	5 %	3	2 %	1	5 %	1	1 %
<i>Methanimicrococcus</i> sp.	H ₂ /CO ₂	1	5 %	1	1 %	1	5 %	2	1 %	ND		ND	
Methanomicrobiales		11	55 %	117	84 %	11	55 %	112	83 %	11	58 %	113	85 %
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	H ₂ /CO ₂ or Formate	3	15 %	75	54 %	2	10 %	77	57 %	5	26 %	78	59 %
<i>Methanoculleus</i> sp.	H ₂ /CO ₂	5	25 %	29	21 %	7	35 %	26	19 %	5	26 %	32	24 %
<i>Methanospirillum</i> sp.	H ₂ /CO ₂	2	10 %	2	1 %	1	5 %	1	1 %	ND			
<i>Methanofollis</i> sp.	H ₂ /CO ₂ or Formate	1	5 %	11	8 %	1	5 %	8	6 %	1	1 %	3	2 %
<i>Methanomicrobium</i> sp.	H ₂ /CO ₂	ND				ND				ND			
Unknown	Unknown	ND				ND				ND			
Methanobacteriales		ND		ND		1	5 %	1	1 %	1	1 %	1	1 %
<i>Methanobacterium</i> sp.	H ₂ /CO ₂ or Formate					1		1		1			
<i>Methanobrevibacter</i> sp.						ND				ND			
CA-11 lineage	Unknown	3	15 %	3	2 %	2	10 %	3	2 %	2	11 %	9	7 %
ARC-I lineage	Unknown	ND		ND		ND		ND		ND		ND	

Gemeinsam vertreten in allen drei 16S rDNA Bibliotheken und damit in den drei Anaerobfiltern waren zehn Archaea OTUs (Tab. 4). Diese zehn Archaea OTUs waren in 88 - 91% der Klone der 16S rDNA Bibliotheken zu finden.

Die in allen Anaerobfiltern gemeinsam detektierten Archaea-Klone für hydrogenotrophe Methanbildner umfassen zwischen 79 - 81% der Klone der 16S rDNA Bibliothek. Obligat (*Methanosaeta* sp.) oder fakulativ acetotrophen (*Methanosarcina* sp.) Methanbildner waren da-

gegen bei den in allen Anaerobfiltern gemeinsam detektierten Archaea nur mit 7 - 12% der Klone in der 16S rDNA Bibliothek vertreten.

Dementsprechend fallen die Werte für den paarweisen *similarity index* berechnet nach Jaccard mit der Korrektur von Chao aus (Tab. 5). Die Werte zwischen 0,891 (Anaerobfilter 2 vs. 3) und 0,978 (Anaerobfilter 1 vs. 2) unterstützen die Beobachtung, dass sich in den parallel betriebenen Anaerobfiltern weitestgehend ähnliche Archaea Gemeinschaften etabliert haben. Unter der Annahme, dass die prozentuale Verteilung der OTU in den 16S rDNA Bibliotheken in grober Näherung die Populationsstruktur in dem Anaerobfilter widerspiegeln, kann somit die Population der Methanbildner als größtenteils identisch in den drei Anaerobfiltern angesehen werden.

Tab. 4: In allen Anaerobfiltern (AF) vertretende Archaea sowie die Häufigkeit ihres Nachweises in den einzelnen 16S rDNA Klonbibliotheken.

	Total		Anaerobic filter 1				Anaerobic filter 2				Anaerobic filter 3			
	OTU		OTU		Clones		OTU		Clones		OTU		Clones	
Archaea (total)	32		20		140		20		135		19		133	
Archaea (common in all three AF)	10	31 %	10	50 %	128	91 %	10	50 %	122	90 %	10	53 %	117	88 %
<i>Methanosaeta</i> sp.	3	9 %	3	15 %	11	8 %	3	15 %	13	10 %	3	16 %	8	6 %
<i>Methanosarcina</i> sp.	1	3 %	1	5 %	6	4 %	1	5 %	3	2 %	1	5 %	1	1 %
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	1	3 %	1	5 %	72	51 %	1	5 %	76	56 %	1	5 %	74	56 %
<i>Methanoculleus</i> sp.	4	13 %	4	20 %	28	20 %	4	20 %	22	16 %	4	21 %	31	23 %
<i>Methanofollis</i> sp.	1	3 %	1	5 %	11	8 %	1	5 %	8	6 %	1	5 %	3	2 %
Aceticlastic Methanogens	4	13 %	4	20 %	17	12 %	4	20 %	16	12 %	4	21 %	9	7 %
Hydrogenotrophic Methanogens	6	19 %	6	30 %	111	79 %	6	30 %	106	79 %	6	32 %	108	81 %

Tab. 5: Paarweiser Chao-Jaccard Similarity Index für den Vergleich der Archaea Gemeinschaften in drei parallel betriebenen Anaerobfiltern von System 3a.

		Anaerobic filter		
		1	2	3
Anerobic filter	1	-		
	2	0.978	-	
	3	0.940	0.891	-

Unter der weiteren Annahme, dass hydrogenotrophe und acetotrophe Methanbildner ähnliche Stoffwechselaktivität aufweisen, sind diese Ergebnisse ein Indiz für eine überwiegende Nutzung von CO₂/H₂ zur Methanogenese. In diesem Falle wäre eine Acetat-Verstoffwechselung durch acetotrophe Bakterien (z.B. Sulfat reduzierende Bakterien) in Konkurrenz zu den acetotrophen Methanbildnern wahrscheinlich.

Ein Manuskript zur wissenschaftlichen Publikation dieser Ergebnisse befindet sich derzeit in Vorbereitung.

Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit bioleaching von Roggen-Silage - Analyse der räumlichen Verteilung der methanogenen Archaea in dem Anaerobfilter

Zur Beurteilung der Verteilung der methanogenen Archaea innerhalb der Reaktors wurde bei der „methanogenen“ Stufe, dem Anaerobfilter, eines zweistufigen Reaktors (**System 3a**) sowohl die Prozessflüssigkeit wie auch der Oberflächenbewuchs auf den Füllkörpern beprobt und mittels der Konstruktion zweier Archaea spezifischer 16S rDNA Klonbibliotheken analysiert (Tab. 6).

Tab. 6: Vergleich der Archaea Gemeinschaft in Prozessflüssigkeit und Biofilm von Anaerobfilter 1 eines zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktors (System 3a)

Assumed phylogenetic affiliation	Two-phase reactor (System 3a) Anaerobic filter 1							
	Process fluid				Biofilm			
	OTU		Clones		OTU		Clones	
Total analyzed	21		144		27		144	
Removed from analysis			2				8	
Assigned to domain Bacteria	1		2		5		5	
Total Archaea	20	100 %	140	100 %	17	100 %	131	100 %
Methanosarcinales	6	30 %	20	14 %	6	35 %	74	56 %
<i>Methanosaeta</i> sp.	4	20 %	13	9 %	5	29 %	59	45 %
<i>Methanosarcina</i> sp.	1	5 %	6	4 %	1	6 %	15	11 %
<i>Methanimicrococcus</i> sp.	1	5 %	1	1 %	ND		ND	
Methanomicrobiales	11	55 %	117	84 %	7	41 %	33	25 %
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	3	15 %	75	54 %	1	6 %	21	16 %
<i>Methanoculleus</i> sp.	5	25 %	29	21 %	3	18 %	8	6 %
<i>Methanospirillum</i> sp.	2	10 %	2	1 %	1	6 %	2	2 %
<i>Methanofollis</i> sp.	1	5 %	11	8 %	1	6 %	1	1 %
<i>Methanomicrobium</i> sp.	ND				ND			
<i>Unknown</i>	ND				1	6 %	1	1 %
Methanobacteriales	ND		ND		2	12 %	14	11 %
<i>Methanobacterium</i> sp.					2		14	
<i>Methanobrevibacter</i> sp.					ND			
CA-11 lineage	3	15 %	3	2 %	1	6 %	2	2 %
ARC-I lineage	ND		ND		1	6 %	8	6 %

In beiden Banken konnten insgesamt 271 Nukleotidsequenzen archaellen Ursprungs bestimmt werden. Auffällig waren hierbei die Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von 16S rDNA Sequenzen von Acetat verwertenden *Methanosaeta*. In dem Biofilm wurden zwar grundsätzlich ähnliche *Methanosaeta* detektiert wie in der Prozessflüssigkeit, jedoch erfolgte der Nachweis entsprechender OTUs in dem Biofilm wesentlich häufiger (45% aller untersuchten Klone vs. 9% in der Prozessflüssigkeit). Umgekehrt wurden in der Prozessflüssigkeit wesentlich häufiger hydrogenotrophe Methanogene wie z.B. Vertreter der Gattungen *Methanocorpusculum* und *Methanoculleus* gefunden.

Dass *Methanosaeta* in dem Biofilm häufiger auftritt, scheint eventuell mit dessen zellulärer Form begründet zu sein: *Methanosaeta* bildet lange Ketten aus hintereinander gereihten, stäbchenförmigen Einzelzellen, sog. Filamente. Durch die Knäuelbildung von mehreren solcher Filamenten entsteht u.U. ein wesentliches, Struktur bildendes Element von Biofilmen.

Andererseits wurden in der Prozessflüssigkeit von System 1 ebenfalls hohe Anteile von *Methanosaeta* bei der Analyse der entsprechenden 16S rDNA Klonbibliotheken gefunden. Hierfür sind zwei Ursachen denkbar: (1) Aufgrund unbekannter Prozessparameter können sich *Methanosaeta* sp. in der Umlaufflüssigkeit von System 1 anreichern. (2) Es handelt sich bei den im System 1 in der Prozessflüssigkeit gefundenen *Methanosaeta* sp. um Ablösungen von dem Biofilm auf den Oberflächen im Anaerobfilter.

Grundsätzlicher Unterschied in der Konstruktion von System 1 und 3a war, dass die Hydrolysestufe von System 1 im Einstaufverfahren betrieben wurden, die von System 3a dagegen im Perkulationsverfahren. Das Perkulationsverfahren könnte sich negativ auf eine Anreicherung der *Methanosaeta* in der umlaufenden Prozessflüssigkeit ausgewirkt haben. Andererseits unterliegt die Prozessflüssigkeit auf im Einstaufverfahren ebenfalls verschiedenen mechanischen Belastungen z.B. während der Passage in der Umwälzpumpe.

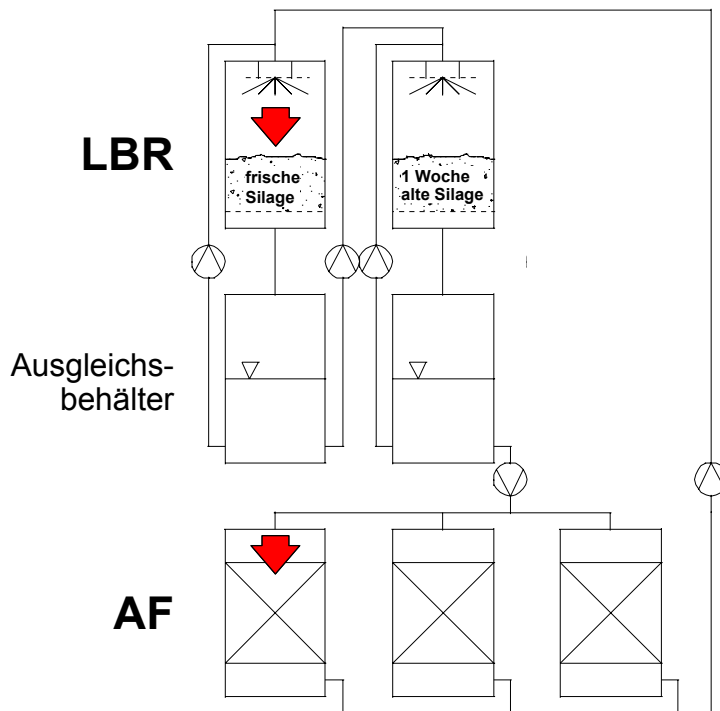


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von System 3b. Das Reaktorsystem wurde im Rahmen eines gesonderten Teilprojektes (03SF0317G) im BCN-Verbund eingerichtet und betrieben. Die Probenahme erfolgte aus dem Ablauf von LBR 1 und AF 1 (Pfeil).

LBR= *leach bed reactor* (Hydrolyse-Stufe); AF= *anaerobic filter* (Festbettreaktor zur Ansiedelung methanogener Archaea) [verändert nach Schönberg et al., unpubl.].

Zweiphasige, zweistufige Biogasfermentationen mit bioleaching von Roggen-Silage - Analyse der Struktur der hydrolytischen Bacteria-Gemeinschaft in der Hydrolyse

Das hierbei untersuchte System (**System 3b**) beruhte auf dem zuvor beprobten System 3a. Im Unterschied zu System 3a bestand die Hydrolysestufe dieses Systems aus zwei in Reihe geschalteten *leachbed*-Reaktoren (LBR) sowie drei parallel geschalteten Anaerobfiltern (AF). Ein Schema des Versuchstandes ist in Abb. 8 wiedergegeben.

Das System wurde ausschließlich mit Roggen-Ganzpflanzensilage mit einer OLR von $2,2 \text{ kg}_{\text{oTS}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ betrieben. Die Verweilzeit der Silage in den LBRs betrug 14 Tage, wobei die zwei LBRs im Wechsel von 7 Tagen befüllt wurden. Die theoretische Verweilzeit der Prozessflüssigkeit in den Anaerobfiltern betrug 1,4 Tage.

Die Ausbeuten an Biogas und Methan sowie die Werte für pH und die Anteile an organischen Säuren in der Prozessflüssigkeit von Hydrolysestufe und Anaerobfilter sind in Abb. 9 dargestellt. Während der vierzehntägigen Fermentation wurden in dem gesamten System $286 \text{ l}_\text{N} \text{ kg}_{\text{oS}}^{-1}$ Biogas (bezogen auf die organische Substanz als Summe von organischer Trockensubstanz und organischen Säuren) mit einem Methananteil von 54% erzeugt. Davon wurden in den Anaerobfiltern ca. 74% des Biogases und 89% des Methans gebildet.

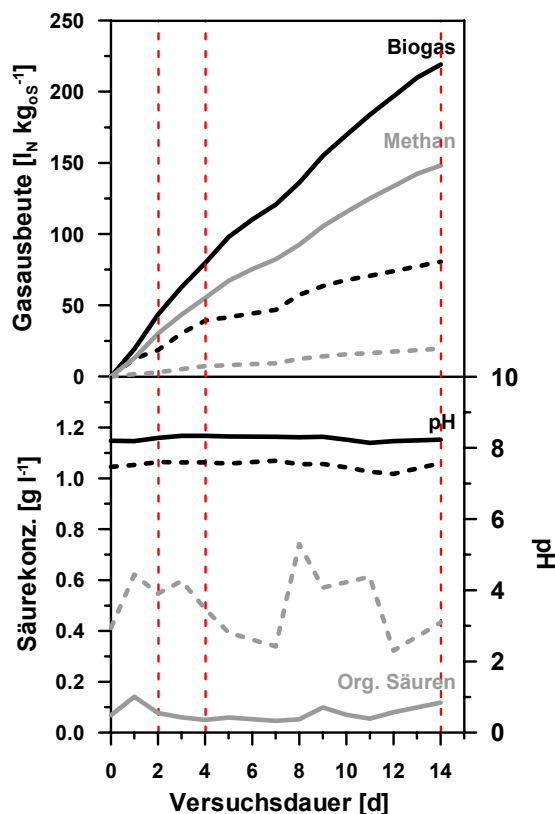


Abb. 9: Ausbeuten an Biogas und Methan, pH Werte und Konzentration der organischen Säuren im Ablauf von Hydrolysestufe (LBR3, gestrichelte Linie) und Anaerobfilter (AF1, durchgezogene Linie) von System 3b während der Probennahme zur 16S rDNA Analytik. Senkrechte Linien symbolisieren den Zeitpunkt der Probennahme nach 2, 4 und 14 Tagen Hydrolyse von Roggensilage. Die akkumulierten Gasausbeuten sind bezogen auf die zu Beginn der Hydrolyse eingebrachte organische Substanz (oS, Summe aus organischer Trockensubstanz und organischen Säuren) [verändert nach Schönberg et al., unpubl.].

Das Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL) gibt als Gasausbeute für die Vergärung von Roggen-Ganzpflanzensilage einen Biogasertrag von $664 \text{ l}_N \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ (Variationskoeffizient 23,5%) an. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Hydrolysezeiten, der unterschiedlichen Bezugsgröße, der unterschiedlich großen Raumbelastung, des hohen Variationskoeffizienten und nicht zuletzt unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Fermentationssystems ist der Biogasertrag dieses Systems zwar geringer als Referenzwerte, aber dennoch in einem genügend hohen Ausmaß um eine funktionelle Mikrobiologie in Hydrolyse und Methanogenese anzunehmen.

Die Ursache für die geringere Biogasproduktion wird in Verwendung einer Silage mit schlechter Qualität evtl. aufgrund begonnener Kompostierung vermutet. Eine detaillierte Darstellung der Prozessparameter und der Silageproblematik erfolgt im Schlussbericht von Teilprojekt 03SF0317G.

Zur Analyse der an der Hydrolyse der Roggensilage beteiligten Bacteria wurde eine Probe aus dem Ablauf von LBR 1 nach 2, 4 und 14 Tagen Hydrolyse entnommen und mittels 16S rDNA Analyse untersucht.

Die methanbildende Archaea Population in den Anaerobfiltern wurde ebenfalls zur Kontrolle der Konstanz der methanogenen Lebensgemeinschaft erfasst. Die Probennahme erfolgte hierbei nach 2 und 14 Tagen Hydrolyse aus AF1. Zur Analyse der methanbildenden Archaea in AF1 wurden zwei 16S rDNA Klonbibliotheken spezifisch für methanogene Euryarchaeota entwickelt. Die Methodik erfolgte hierbei analog des in Klocke et al. [2008] publizierten Protokolls.

Tab. 7: Übersicht über die in AF1 von System 3b mittels 16S rDNA Analyse nachgewiesenen OTUs des Phylums Euryarchaeota.

Two-phase biogas system (system 3b), mesophilic, rye silage									
Anaerobic filter, 2 days after LBR loading					Anaerobic filter, 14 days after LBR loading				
OTUs		Clones			OTUs		Clones		
Total analyzed		138					146		
Removed from analysis		5					11		
Assigned to domain Bacteria		0					0		
Total Archaea	14	100%	133	100%	13	100%	135	100%	
Methanosarcinales	3	21%	42	32%	2	15%	36	27%	
<i>Methanosaeta</i> sp.	1	7%	10	8%	1	8%	14	10%	
<i>Methanimicrococcus</i> sp.	2	14%	32	24%	1	8%	22	16%	
Methanomicrobiales	9	64%	85	64%	9	69%	93	69%	
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	3	21%	49	37%	3	23%	46	34%	
<i>Methanoculleus</i> sp.	6	43%	36	27%	6	46%	47	35%	
Unclassified Euryarchaeota	2	14%	6	5%	2	15%	6	4%	

Insgesamt wurden aus den zwei Klonbibliotheken 284 16S rDNA Klone mittels ARDRA analysiert. Dabei wurden 24 OTUs für potentiell methanbildenden Euryarchaeota gefunden (Tab.

7, Abb. 10). Die höchste Artenvielfalt wurde in beiden Klonbibliotheken für die Ordnung Methanomicrobiales gefunden (jeweils 9 OTUs). Methanomicrobiales wurden ebenfalls am häufigsten in den Klonbibliotheken nachgewiesen. Der prozentuale Anteil lag bei 64 bzw. 69% der untersuchten Klone. 32 bzw. 27% der untersuchten Klone ließen sich der Ordnung Methanosarcinales zuordnen. 5 bzw. 4% der Klone wiesen größere Unterschiede auf Ebene der 16S rDNA Nukleotidsequenz zu den bisher bekannten Typenspecies auf und waren nicht näher taxonomisch einzuordnen (Abb. 10, Sequenzen ATB-8822-A07, ATB-6246-A07, ATB-6292-A15, ATB-8790-A37).

Tab. 8: Analyse der methanogenen Archaea Lebensgemeinschaft in AF1 von System 3b mittels 16S rDNA Analyse: Indices für Richness, Diversität und Similarität.

	Two-phase biogas system (system 3b), mesophilic, rye silage	
	Anaerobic filter, 2 days after LBR loading	Anaerobic filter, 14 days after LBR loading
Analyzed Archaea clones		
Total	133	135
Detected Archaea OTUs		
Total	14	13
Singulett	6	3
Richness		
Good Coverage	0,955	0,978
Chao-I richness estimator (95% confidence intervals)	23 (16, 67)	17 (14, 72)
Diversity		
Shannon diversity	1,951	1,819
Evenness	0,503	0,475
Similarity		
Jaccard, with Chao correction		0,921
Soerensen, with Chao correction		0,955
Bray-Curtis		0,731

Die methanogene Archaea-Flora in der Prozessflüssigkeit von AF1 von System 3b ähnelt der zuvor in System 3a ermittelten Archaea-Biozönose. In überwiegendem Maße wurden hydrogenotrophe Methanogene wie *Methanocorpusculum* sp. und *Methanoculleus* sp. gefunden.

An acetoklastischen Methanogenen wurden ausschließlich Vertreter der Gattung *Methanosaeta* nachgewiesen, welche nur jeweils durch zwischen 8 und 10% der Klone in den 16S rDNA Bibliotheken repräsentiert wurden. Diese Verhältnisse sind ein Indiz für eine überwiegende Methanbildung in der Prozessflüssigkeit aus der Reduktion von CO₂ mittels H₂.

Der Biofilm auf den Festkörpern in dem Anaerobfilter wurde in diesem Versuch nicht untersucht. Es ist jedoch naheliegend anzunehmen, dass sich wie in System 3a in dem Biofilm hohe Anteile filamentöser acetiklastischer *Methanosaeta* sp. angesiedelt haben.

Die Struktur der methanogenen Archaea Population ändert sich im Verlauf von vierzehn Tagen Hydrolyse nur wenig. Die Werte für die Gleichheitsindices (*similarity index*) berechnet

nach Jaccard bzw. Soerensen (jeweils mit Korrektur nach Chao) liegen bei 0,921 bzw. 0,955, welches für eine weitestgehend stabile Biozönose spricht (Tab. 8).

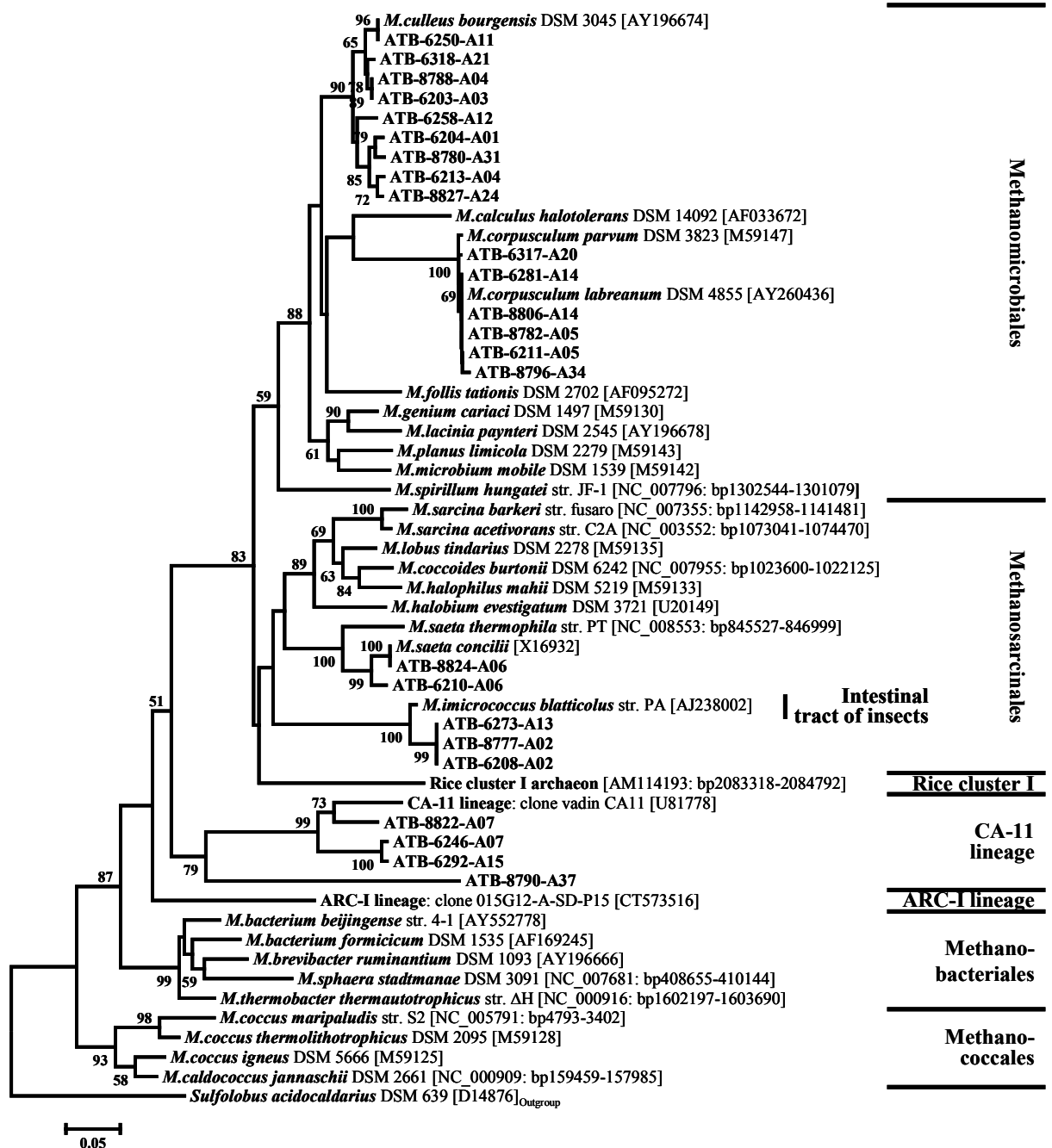


Abb. 10: Phylogenetische Einordnung der in System 3b nachgewiesenen OTUs des Phylums Euryarchaeota. Die phylogenetische Analyse wurde auf Basis von 201 Positionen innerhalb der 16S rDNA Sequenz durchgeführt. Der Größenmaßstab repräsentiert 0,05 Basenaustausche je Position. Die evolutionären Distanzen wurden mittels der Kimura-2-Parameter Methode berechnet. Der Stammbaum wurde mittels der Neighbor-Joining Methode berechnet. Zahlen an den Verzweigungen repräsentieren die prozentualen Anteile bei der diese Verzweigung in einer Bootstrap-Analyse mit 1000 Wiederholungen gefunden wurde; hierbei sind nur Werte über 50% dargestellt.

Zur Analyse der bakteriellen Mikroflora in der Hydrolyse wurden drei Klonbibliotheken aus Proben des Ablaufs eines *bioleaching*-Reaktors konstruiert. Zur Konstruktion der Klonbibliotheken wurden folgende etablierte 16S rDNA Primer nach Lane [1991] verwendet: Vorwärts-primer 27f (interne Nomenklatur: 16S-forw) AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG, Rückwärts-primer 1492r (intern: 16S-rev) TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T. Mittels dieser Primer wurde ein ca. 1460 bp großer Bereich der ca. 1550 bp langen bakteriellen 16S rDNA amplifiziert („*nearly full length*“). Die weitere Analyse der Sequenzen erfolgte analog zu der in Klocke et al. [2008] beschriebenen Vorgehensweise.

Tab. 9: Zur Analyse der Bacteria in der Hydrolysestufe entwickelte 16S rDNA Klonbibliotheken. Die Bibliotheken wurden aus Proben des Ablaufs von LBR1 nach 2, 4 und 14 Tagen Hydrolyse der Roggensilage entwickelt.

	Two-phase biogas system (system 3b), mesophilic, rye silage		
	Leach bed reactor, 2 days after loading	Leach bed reactor, 4 days after loading	Leach bed reactor, 14 days after loading
Analyzed Bacteria clones	492	502	452
Clone number for OTU with >1 clone	358 (73%)	391 (79%)	319 (71%)
Detected Bacteria OTUs	187	166	181
Singulets	134 (72%)	111 (67%)	133 (73%)
OTU with >1 clone	53 (28%)	55 (33%)	48 (27%)
Coverage [Good]	0,62	0,79	0,71
Diversity [Shannon]	4,476	4,321	4,417
Eveness	0,470	0,454	0,458

Insgesamt wurden von den drei Klonbibliotheken 1446 Klone mittels ARDRA untersucht. Durch die ARDRA wurden diese Klone in 444 verschiedene OTUs gruppiert (Tab. 9). Hiermit wurden durch die Klonbibliotheken zwischen 62 und 79% (*coverage* nach Good) der tatsächlich in der Hydrolyse vorhandenen bakteriellen Mikroflora detektiert. Weiterhin wurden zwischen 67 und 73% der OTUs nicht redundant nachgewiesen. Somit ist davon auszugehen, dass nur ein gewisser Teil der hydrolytischen Mikroflora abgebildet wurde. Für eine umfassende Analyse wäre demnach die Bearbeitung wesentlich höherer Klonzahlen erforderlich.

Die wiederholt in den Klonbibliotheken detektierten OTUs stellen jedoch die Mehrheit der 16S rDNA Sequenzen in den Bibliotheken. Insgesamt wurden 120 OTUs detektiert, welche mehrfach in den drei Klonbibliotheken auftraten. Je nach Bibliothek finden sich diese OTUs bei 71 bis 79% der Klone. Unter der Annahme, dass die Verteilung der 16S rDNA Sequenzen in den Klonbibliotheken die Struktur der bakteriellen Biozönose widerspiegelt, lässt sich hieraus folgern, dass durch die redundanten OTUs die häufigsten in der Biozönose auftretenden Bacteria detektiert worden sind. Deshalb wurde die taxonomische Analyse im Folgenden auf diese wiederholt detektierten OTUs beschränkt.

Die taxonomische Einordnung der redundanten OTUs erfolgte auf Basis der unkorrigierten p-Distanz des jeweiligen 16S rDNA Fragmentes zu der entsprechenden Sequenz von Typenstämmen mittels der Software ARB (Tab. 10). Als Grenzwert für die Variabilität der 16S rDNA Nukleotidsequenz auf Artebene wird derzeit eine Unähnlichkeit (unkorrigierte p-

Distanz) von maximal 3%, nach anderen Quellen 2% angenommen. Dieser Wert besitzt jedoch keine generelle Gültigkeit. So finden sich für manche Gruppen von Bakterien wie z.B. Lactobacilli im Vergleich von verschiedenen Arten häufig geringere Unähnlichkeiten als 2% auf Ebene der 16S rDNA Sequenz.

Lediglich 9 der 120 (= 7,5%) untersuchten 16S rDNA Sequenzen wiesen unter 3% Unähnlichkeit zu bekannten Typenstämmen auf. Für die übrigen Sequenzen wurden 16S rDNA Unähnlichkeiten von bis zu 25% zu der nächstverwandten Referenzart ermittelt. Dieses lässt auf einen sehr hohen Anteil (> 90%) an bislang taxonomisch nicht beschriebenen Arten der Domäne Bacteria in der Hydrolysestufe schließen. Eine taxonomische Beschreibung ist jedoch nur auf Basis von Isolaten möglich.

Die größte Artenvielfalt fand sich innerhalb der Gruppe der Firmicutes, und hier innerhalb der Clostridia (Abb. 12). Ebenfalls mit vielen OTUs vertreten war das Phylum bzw. die Klasse Bacteroidetes. Diese beiden Gruppen fanden sich auch bei jeweils über 30% der Klone in allen drei Klonbibliotheken. Mit Anteilen zwischen 5 und 10% der Klone fanden sich außerdem Vertreter der Flavobacteria (Phylum Bacteroidetes), der Spirochaetes sowie der ϵ -Proteobacteria.

Innerhalb der großen taxonomischen Einheiten weisen die drei Klonbibliotheken nur wenige Unterschiede auf (Abb. 12). Auf Ebene der OTU allerdings treten im Verlauf der Hydrolyse deutliche Unterschiede auf wie aus den paarweisen Similaritätsindices ersichtlich (Abb. 11). Mit Werten von 0,56 bzw. 0,60 fallen diese relativ gering aus. Bezieht man allerdings ausschließlich die redundant detektierten OTUs in die Berechnung ein, resultieren wesentlich höhere Werte von 0,84 bzw. 0,80. Dieses kann als Indiz gewertet werden, dass die hauptsächlichen Vertreter der hydrolytischen Bacteria Biozönose während des vierzehn tägigen Verlaufs der Hydrolyse verhältnismäßig konstant bleiben.

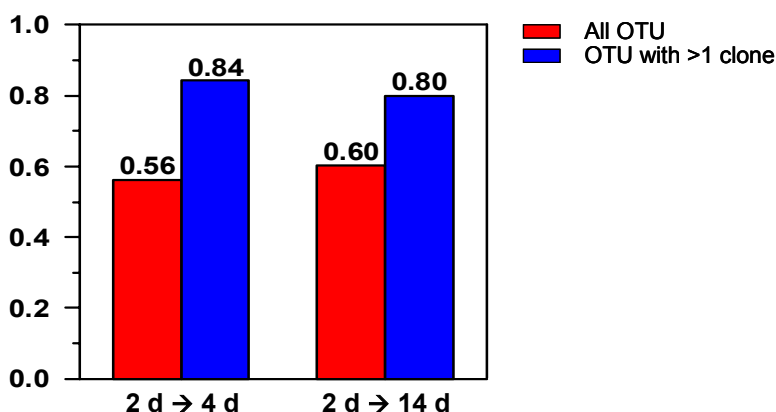


Abb. 11: Vergleich der Diversität innerhalb der hydrolytischen Bacteria-Gemeinschaft in der Hydrolyse-Stufe (*bio-leaching*) von System 3b bei fortgesetzter Hydrolyse. Dargestellt ist der paarweise Gleichheitsindex (*similarity index*) nach Jaccard mit Korrektur nach Chao. Als Datenbasis wurde entweder die gesamte Diversität (rote Balken) oder nur die redundant detektierten OTUs (blaue Balken) verwendet.

Tab. 10: Taxonomische Einordnung der in der Hydrolysestufe von System 3b redundant detektierten bakteriellen OTUs. Die p-Distanz wurde als unkorrigierte Distanz auf Basis der Unterschiede in der Nukleotidsequenz der jeweiligen 16S rDNA Region zwischen detektierter OTU und Referenz-Typenspezies berechnet.

ND= nicht detektiert.

16S rDNA clone		Number of clones in the 16S rDNA library			Uncorrected p-distance	Taxonomic classification				
Name	Length [bp]	Time of bioleaching				Reference species	NCBI acc.	Family	Order	Phylum
		2 days	4 days	14 days						
Bact_027_6666	925	43	46	39	0,06	<i>Bacteroides nordii</i>	AY608697	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_009_6644	892	30	32	22	0,05	<i>Weeksella virosa</i>	AF133539	Flavobacteriaceae	Flavobacteriales	Bacteroidetes
Bact_328_6646	833	25	10	5	0,04	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>	L11305	Peptostreptococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_001_6675	873	21	15	24	0,00	<i>Arcobacter skirrowii</i>	L14625	Campylobacteraceae	Campylobacteriales	Proteobacteria
Bact_008_6643	882	17	20	35	0,12	<i>Spirochaeta coccoides</i>	AJ698092	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_012_6647	845	13	29	7	0,19	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i>	AY327251	Peptococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_004_6639	836	13	18	16	0,06	<i>Ruminococcus luti</i>	AJ133124	Lachnospiraceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_059_6711	900	12	12	6	0,06	<i>Bacteroides nordii</i>	AY608697	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_029_6668	927	10	7	17	0,14	<i>Alistipes shahii</i>	AY974072	Rikenellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_053_6705	860	10	7	7	0,09	<i>Clostridium lactatifermentans</i>	AY033434	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_137_6870	849	10	4	1	0,19	<i>Prostheobacter dejongii</i>	U60012	Verrucomicrobiaceae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobia
Bact_102_6641	811	10	2	1	0,17	<i>Pelobacter acidigallici</i>	X77216	Pelobacteraceae	Desulfuromonadales	Proteobacteria
Bact_076_6741	892	9	11	1	0,16	<i>Rikenella microfusus</i>	L16498	Rikenellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_034_6677	836	9	8	ND	0,02	<i>Bacteroides intestinalis</i>	AB214328	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_070_6692	894	8	12	1	0,14	<i>Treponema medium</i>	D85437	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_075_6702	789	8	3	12	0,11	<i>Bacteroides intestinalis</i>	AB214328	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_101_6796	835	6	11	11	0,04	<i>Clostridium aminovalericum</i>	X73436	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_023_6659	882	6	5	1	0,09	<i>Treponema brennaborens</i>	Y16568	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_158_7074	806	6	3	1	0,05	<i>Pelotomaculum schinkii</i>	X91170	Peptococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_141_6696	872	6	2	5	0,04	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	AY742226	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_118_6829	797	5	3	ND	0,12	<i>Ruminococcus luti</i>	AJ133124	Lachnospiraceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_068_6727	894	5	1	1	0,09	<i>Xylanibacter oryzae</i>	AB078826	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_122_6840	824	4	ND	1	0,17	<i>Caloramator indicus</i>	X75788	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_090_6656	848	4	3	ND	0,06	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	AF167711	Acidaminococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_103_6791	863	4	1	1	0,11	<i>Bacteroides stercoris</i>	X83953	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_331_6827	842	3	ND	ND	0,07	<i>Bacteroides uniformis</i>	AB050110	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_113_6813	877	3	ND	ND	0,12	<i>Paludibacter propionigenes</i>	AB078842	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_131_6858	873	3	ND	ND	0,14	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_114_6818	912	3	ND	ND	0,08	<i>Clostridium methylpentosum</i>	Y18181	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_100_6787	749	3	ND	ND	0,10	<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	AF022249	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_123_6843	847	3	ND	ND	0,01	<i>Enterococcus aquimarinus</i>	AJ877015	Enterococcaceae	Lactobacillales	Firmicutes
Bact_002_6809	843	3	15	1	0,13	<i>Prolixibacter bellariavorans</i>	AY918928	?	?	Bacteroidetes
Bact_062_6906	915	3	2	ND	0,05	<i>Eubacterium rectale</i>	L34627	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_072_6735	894	2	ND	ND	0,10	<i>Bacteroides nordii</i>	AY608697	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_119_6831	875	2	ND	ND	0,12	<i>Paludibacter propionigenes</i>	AB078842	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_097_6781	894	2	ND	ND	0,09	<i>Xylanibacter oryzae</i>	AB078826	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_182_7039	811	2	ND	ND	0,12	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	L35516	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_120_6832	886	2	ND	ND	0,03	<i>Sporobacter termitidis</i>	Z49863	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_176_7026	823	2	ND	ND	0,07	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	AJ251215	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_057_6709	894	2	ND	ND	0,11	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	AJ251215	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_014_6649	872	2	ND	ND	0,12	<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	EF529620	Lachnospiraceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_007_6642	882	2	ND	ND	0,10	<i>Thermicola carboxydiphila</i>	AY603000	Peptococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_124_6844	869	2	ND	ND	0,11	<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i>	AJ698859	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_003_6638	826	2	ND	1	0,02	<i>Clostridium gangwhense</i>	AY903294	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_017_6652	883	2	ND	1	0,17	<i>Treponema azotonutricum</i>	AF320287	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_140_6880	647	2	8	ND	0,00	<i>Wolinella succinogenes</i>	M88159	Helicobacteraceae	Campylobacteriales	Proteobacteria
Bact_147_7102	810	2	3	ND	0,07	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	AJ251215	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_050_6700	919	2	3	ND	0,00	<i>Proteus mirabilis</i>	DQ885256	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
Bact_018_6653	871	2	2	ND	0,18	<i>Rikenella microfusus</i>	L16498	Rikenellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_093_6775	825	2	1	ND	0,09	<i>Sporobacter termitidis</i>	Z49863	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_161_6978	831	2	1	ND	0,05	<i>Leptothrix mobilis</i>	X97071	?	Burkholderiales	Proteobacteria
Bact_236_7513	834	2	1	ND	0,02	<i>Salmonella enterica</i>	EU014685	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
Bact_129_6685	855	2	1	ND	0,25	<i>Acetobacter senegalensis</i>	AY883036	Acetobacteraceae	Rhodospirillales	Proteobacteria
Bact_086_6756	866	1	ND	1	0,06	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	AJ251215	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_066_6719	920	1	15	11	0,07	<i>Clostridium populeti</i>	X71853	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_106_6801	869	1	5	ND	0,06	<i>Ruminococcus callidus</i>	L76596	Lachnospiraceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_105_6793	778	1	3	8	0,09	<i>Acidaminococcus intestinali</i>	AF473835	Acidaminococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_013_6648	855	1	2	ND	0,06	<i>Paludibacter propionigenes</i>	AB078842	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_334_6992	842	1	2	ND	0,06	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	X95180	Desulfobulbaceae	Desulfobacteriales	Proteobacteria
Bact_069_7591	854	1	2	2	0,05	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_201_7109	860	1	1	ND	0,08	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	AY742226	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_104_6792	883	1	1	ND	0,20	<i>Flexibacter canadensis</i>	AB078046	Sphingobacteriaceae	Sphingobacteriales	Bacteroidetes
Bact_099_6785	798	1	1	ND	0,12	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	L35516	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_064_6717	844	1	1	ND	0,16	<i>Clostridium cellobioparum</i>	X71856	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_278_7750	870	1	1	ND	0,07	<i>Clostridium thermocellum</i>	CP000568	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_192_7082	861	1	1	ND	0,00	<i>Comamonas kerstersii</i>	AJ430347	Comamonadaceae	Burkholderiales	Proteobacteria
Bact_332_6863	793	1	1	2	0,17	<i>Spirochaeta asiatica</i>	X93926	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_223_7561	864	ND	7	1	0,19	<i>Calditrix abyssi</i>	AJ430587	?	?	Deferribacterales
Bact_220_7413	803	ND	7	1	0,12	<i>Synergistes jonesii</i>	L08066	?	?	Synergistetes
Bact_215_7580	847	ND	6	ND	0,15	<i>Alkaliflexus imshenetskyi</i>	AJ784993	Rikenellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_246_7566	826	ND	5	1	0,06	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	AJ251215	Eubacteriaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_226_7465	795	ND	4	ND	0,12	<i>Paenibacillus jamilae</i>	AJ271157	Paenibacillaceae	Bacillales	Firmicutes
Bact_241_7556	849	ND	4	ND	0,10	<i>Treponema primitia</i>	AF093252	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes
Bact_244_7564	796	ND	3	ND	0,12	<i>Atopobium vaginae</i>	Y17195	Coriobacterineae	Coriobacteriales	Actinobacteria
Bact_252_7595	800	ND	3	1	0,17	<i>Prevotella buccalis</i>	L16476	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_219_7412	797	ND	3	1	0,08	<i>Syntrophomonas zehnderi</i>	DQ898277	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_310_7984	803	ND	2	ND	0,19	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	DQ442559	Streptomycineae	Actinomycetales	Actinobacteria
Bact_235_7512	851	ND	2	ND	0,13	<i>Bacteroides salyersiae</i>	AY608696	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_212_7364	852	ND	2	ND	0,07	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	AJ496032	Fibrobacteraceae	Fibrobacteriales	Fibrobacteres
Bact_269_7689	849	ND	2	ND	0,11	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i>	AJ010962	Acidaminococcaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_240_7554	828	ND	2	ND	0,07	<i>Clostridium herbivorans</i>	L34418	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_237_7538	854	ND	2	ND	0,05	<i>Clostridium jejuense</i>	AY494606	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_302_8034	848	ND	2	ND	0,04	<i>Syntrophomonas cellicola</i>	DQ288691	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes
Bact_228_7753	847	ND	2	ND	0,15	<i>Spiroplasma floridola</i>	AY189131	Spiroplasmataceae	Entomoplasmatales	Firmicutes
Bact_281_7774	884	ND	2	ND	0,11	<i>Jonquetella anthropi</i>	EF436502	?	?	Synergistetes
Bact_213_7373	795	ND	2	ND	0,12	<i>Synergistes jonesii</i>	L08066	?	?	Synergistetes
Bact_210_7360	856	ND	2	5	0,06	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_301_9308	849	ND	2	1	0,05	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes
Bact_299_9246	837	ND	1	6	0,12	<i>Lentisphaera araneosa</i>	AJ431235	Lentisphaeraeae	Lentisphaerales	Lentisphaerae
Bact_284_7802	864	ND	1	3	0,19	<i>Desulfovibrio gigas</i>	DQ447183	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrionales	Proteobacteria

Tab. 10, Forts.

16S rDNA clone		Number of clones in the 16S rDNA library				Uncorrected p-distance	Taxonomic classification				
Name	Length [bp]	Time of bioleaching					Reference species	NCBI acc.	Family	Order	Phylum
		2 days	4 days	14 days							
Bact_207_7345	828	ND	1	2	0,11	<i>Turcibacter sanguinis</i>	AF349724	Turcibacteraceae	Bacillales	Firmicutes	
Bact_283_7801	822	ND	1	2	0,15	<i>Thermosiphon africanus</i>	M83140	Thermotogaceae	Thermotogales	Thermotogae	
Bact_277_7744	849	ND	1	1	0,04	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_305_7951	797	ND	1	1	0,01	<i>Anaerofilum agile</i>	X98011	Lachnospiraceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_368_9321	859	ND	ND	8	0,16	<i>Sedimentibacter saalensis</i>	AJ404680	Peptostreptococcaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_352_9305	815	ND	ND	7	0,13	<i>Synergistes jonesii</i>	L08066	?	?	Synergistetes	
Bact_375_9366	898	ND	ND	5	0,13	<i>Caloramator fervidus</i>	L09187	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_359_9350	852	ND	ND	4	0,10	<i>Bacteroides eggerthii</i>	AB050107	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_416_9312	857	ND	ND	3	0,15	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_390_9216	844	ND	ND	3	0,11	<i>Clostridium aldrichii</i>	X71846	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_393_9249	862	ND	ND	3	0,14	<i>Dethiosulfovibrio russensis</i>	AF234543	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_406_9242	910	ND	ND	3	0,10	<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	AF022249	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_433_9363	860	ND	ND	2	0,09	<i>Bacteroides eggerthii</i>	AB050107	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_432_9359	867	ND	ND	2	0,13	<i>Bacteroides gallinarum</i>	AB253732	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_415_9267	835	ND	ND	2	0,10	<i>Bacteroides salyersiae</i>	AY608696	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_358_9041	592	ND	ND	2	0,14	<i>Prevotella zoogeleoformans</i>	L16488	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_425_9338	892	ND	ND	2	0,04	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_411_9288	852	ND	ND	2	0,10	<i>Paludibacter propionigenes</i>	AB078842	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_439_9379	827	ND	ND	2	0,06	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	AY570690	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_365_9336	785	ND	ND	2	0,08	<i>Prevotella brevis</i>	AJ011682	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	
Bact_430_9355	819	ND	ND	2	0,15	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	AF167711	Acidaminococcaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_460_9454	818	ND	ND	2	0,12	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	L35516	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_341_8970	842	ND	ND	2	0,17	<i>Caminicella sporogenes</i>	AJ320233	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_381_9108	834	ND	ND	2	0,17	<i>Clostridium alkaliscellum</i>	AY959944	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_345_8995	758	ND	ND	2	0,20	<i>Clostridium lituseburense</i>	M59107	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_354_9024	530	ND	ND	2	0,15	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	AY295777	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_426_9342	848	ND	ND	2	0,04	<i>Syntrophomonas curvata</i>	AY290767	Syntrophomonadaceae	Clostridiales	Firmicutes	
Bact_404_9221	844	ND	ND	2	0,08	<i>Schlegella thermodepolymerans</i>	AY152824	Comamonadaceae	Burkholderiales	Proteobacteria	
Bact_350_9407	856	ND	ND	2	0,08	<i>Campylobacter coli</i>	AF372092	Campylobacteraceae	Campylobacteriales	Proteobacteria	
Bact_379_9334	808	ND	ND	2	0,16	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	X90515	Verrucomicrobiaceae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobia	

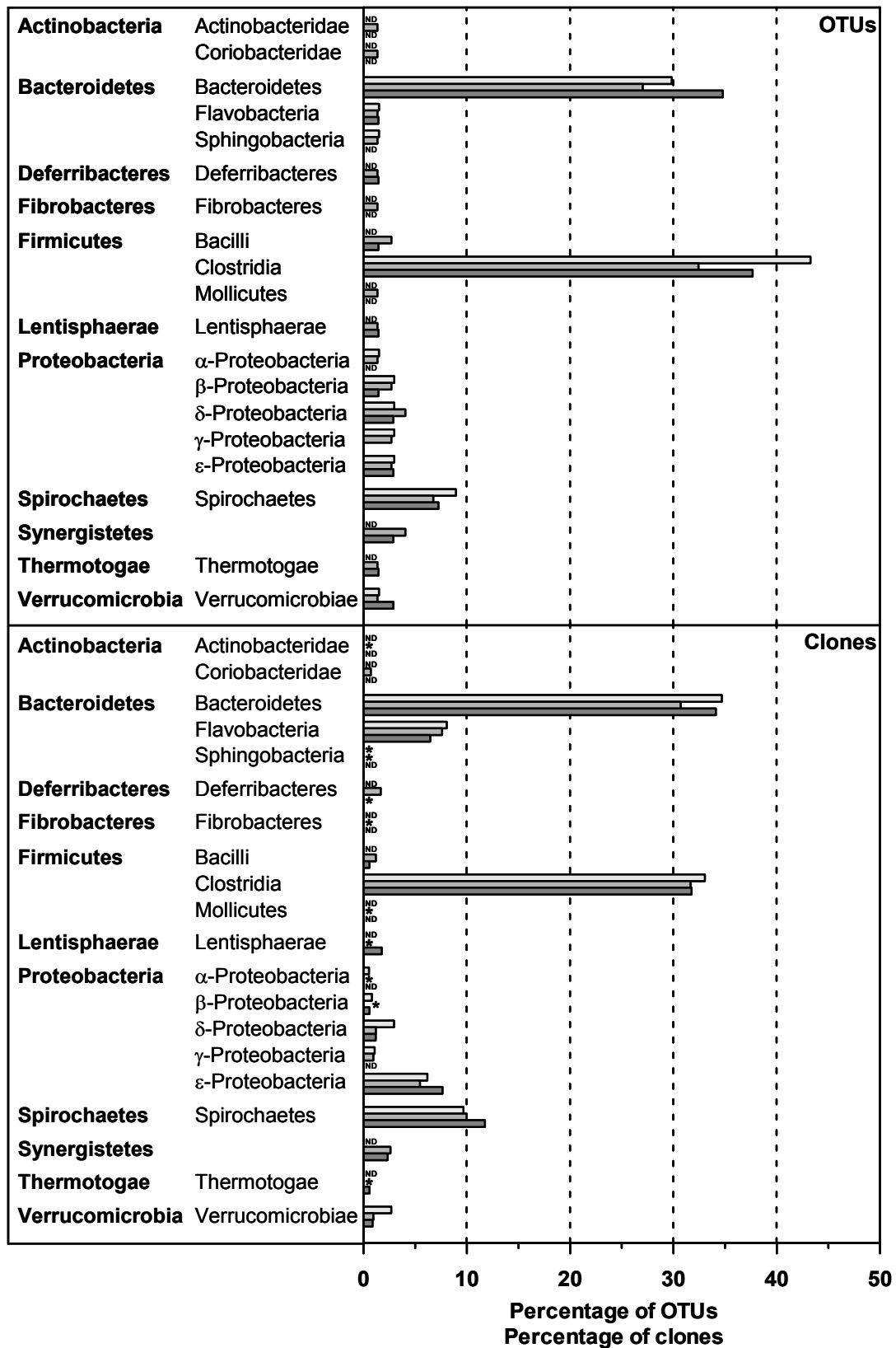


Abb. 12: Verteilung der in der Hydrolysestufe (*bioleaching*) nachgewiesenen Bacteria in den 16S rDNA Klonbibliotheken aus System 3b. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen OTUs bzw. Klone bezogen auf die jeweilige Gesamtzahl. In die Analysen wurden nur solche OTUs einbezogen, welche wiederholt in den 16S rDNA Bibliotheken nachgewiesen wurden.

* = Anteil unter 1%, ND= Nicht nachgewiesen.

Zweiphasige, einstufige Biogasfermentation von Mais-Silage - Analyse der Entwicklung der methanogenen Archaea Gemeinschaft während Startphase, kontinuierlichem Betrieb und Übersäuerung

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Entwicklung der Mikrobiologie während einer andauernden Fermentation verfolgt werden. Aufgrund der Erfahrungen aus den vorangegangenen Versuchen wurde in diesem Ansatz primär die methanogene Archaea Gemeinschaft betrachtet. Hierzu wurde ein Verfahren auf Basis der quantitativen PCR (Q-PCR) verwendet [modifiziert nach Yu et al. 2005, 2006]. Weitere Details zu der Methodik finden sich in Klocke et al. 2008 und Nettmann et al. 2008.

Das untersuchte einstufige Reaktorsystem (Rührkesselreaktor, CSTR; **System 6**) wurde über einen Zeitraum von 67 Tagen semi-kontinuierlich ausschließlich mit Maissilage in steigenden Belastungsraten (*organic loading rate*, OLR) beschickt (Abb. 12). Die Ausbeuten an Biogas und Methan sowie die Konzentration an organischen Säuren wurden laufend erfasst (Abb. 13, 14). Ab Tag 56 wurde die OLR forciert um eine Übersäuerung des Reaktors zu provozieren, welche ab Tag 65 vorlag. Weitere Details zu dem Prozessverlauf finden sich in Blume 2009 [Diplomarbeit TU Berlin] und Blume et al. [Manuskript eingereicht zum Review].

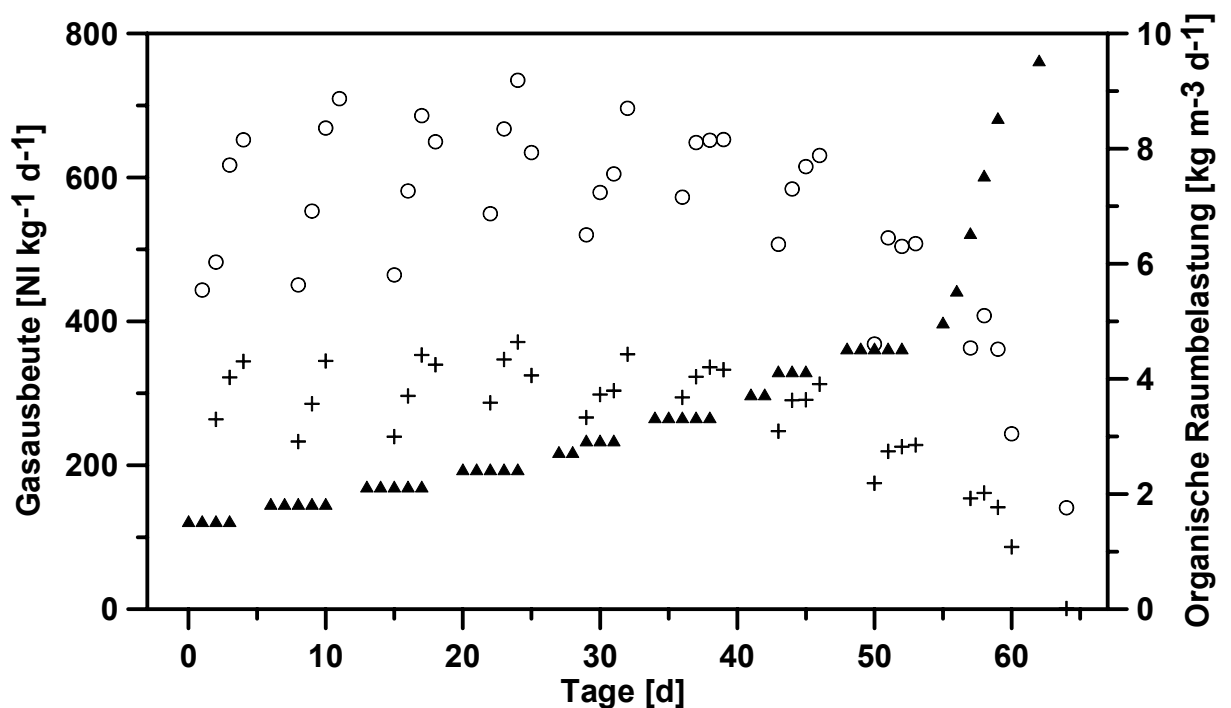


Abb. 13: Biogasproduktion und OLR für den einstufigen, zweiphasigen Biogasreaktor betrieben mit Maissilage (System 6).

○ = tägliche Ausbeute an Biogas, + = tägliche Ausbeute an Methan, ▲ = OLR [veränd. nach Blume et al. Manuskript eingereicht].

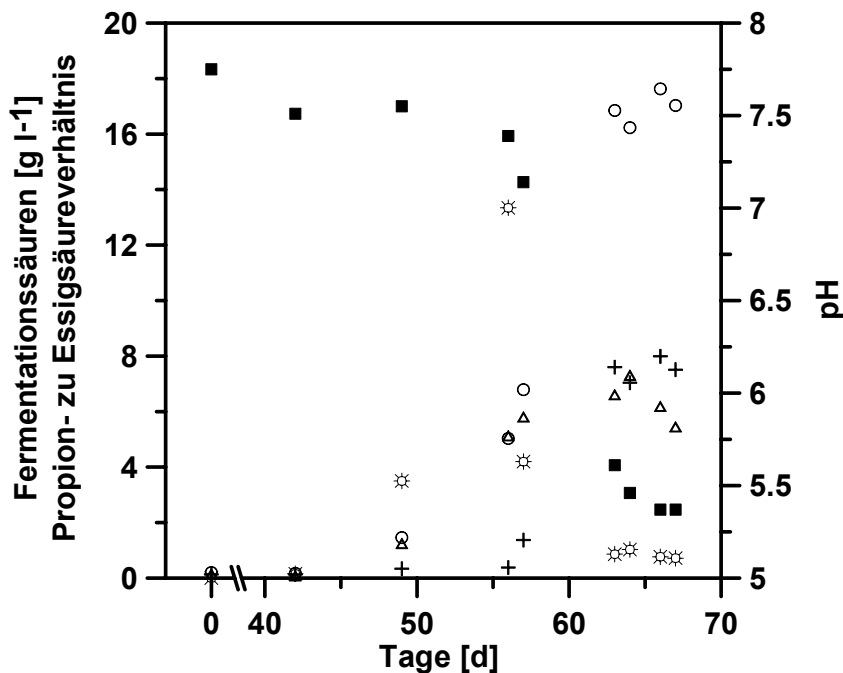


Abb. 14: Ergebnisse der Analyse der Zusammensetzung der Prozessflüssigkeit von System 6.

○ = Konzentration an organischen Säuren, + = Konzentration Acetat, △ = Konzentration Propionat, ⊗ = Verhältnis Propionat zu Acetat, ■ = pH Wert [veränd. nach Blume et al. Manuskript eingereicht].

Zur Analyse der Mikrobiologie in dem System 6 wurde eine gruppenspezifische Q-PCR verwendet (Abb. 15). Während der Startphase besteht die mikrobielle Gemeinschaft in dem System zum überwiegenden Teil aus verschiedensten Bacteria. Lediglich ca. 1% der 16S rDNA Kopienzahl wird von Archaea gestellt. Dies ist verglichen mit anderen Reaktoren ein sehr geringer Anteil. So lag z.B. das Verhältnis Archaea 16S rDNA zu Bacteria 16S rDNA in System 1 und 2 bei ca. 24% [Klocke et al. 2008]. Trotzdem wurde eine als normal einzustufende Biogas- und Methanausbeute beobachtet.

Zu Beginn der Fermentation setzt sich die methanogene Population zu ungefähr gleichen Teilen zusammen aus Methanobacteriales, Methanosaetaceae und Methanosarcinaceae. Methanomicrobiales sind nicht vorhanden. Dieses steht im Kontrast zu den bisherigen Untersuchungen, wobei in laufenden Reaktoren einerseits ein Übergewicht an Methanomicrobiales und andererseits ein Übergewicht an hydrogenotrophen Species beobachtet wurde.

Bei andauernder Fermentation traten zwei Effekte auf: (1) hydrogenotrophe Methanogene, insbesondere Methanobacteriales nahmen kontinuierlich zu, (2) acetotrophe Methanogene konnten ab Tag 49 nicht mehr nachgewiesen werden. Die acetotrophen Methanogene verschwanden damit lange vor der Überlastung des Reaktors.

Methanomicrobiales ließen sich in dem System erst ab Tag 35 und immer in geringeren Anteilen als Methanobacteriales nachweisen. In den untersuchten zweistufigen Systemen konnte mittels der 16S rDNA Klonbibliotheken kein entsprechendes Verhältnis gefunden werden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Klonanteile in 16S rDNA Bibliotheken nicht mehr als einen Hinweis auf die DNA Verteilung *in vivo* geben. Eine genaue Quantifizierung ist mittels Klonbibliotheken experimentell bedingt nicht möglich, wohl aber mittels Q-PCR.

Auch während der durch die Belastungssteigerung provozierten Übersäuerung des Systems kam es zu keinem Rückgang in der 16S rDNA Kopienzahl für Methanomicrobiales. Obwohl kaum noch Methan gebildet wurde, schien diese Gruppe von methanogenen Archaea auch noch in dem übersäuerten Reaktor in nennenswerten Anteilen enthalten zu sein. Ob allerdings diese Methanogenen noch physiologisch aktiv waren, konnte mittels der angewandten Methode nicht festgestellt werden. Zur Beantwortung dieser Frage müsste die Q-PCR auf Basis der mRNA (an Stelle von chrDNA) durchgeführt werden. Ein entsprechendes Assay ist jedoch bislang nicht verfügbar.

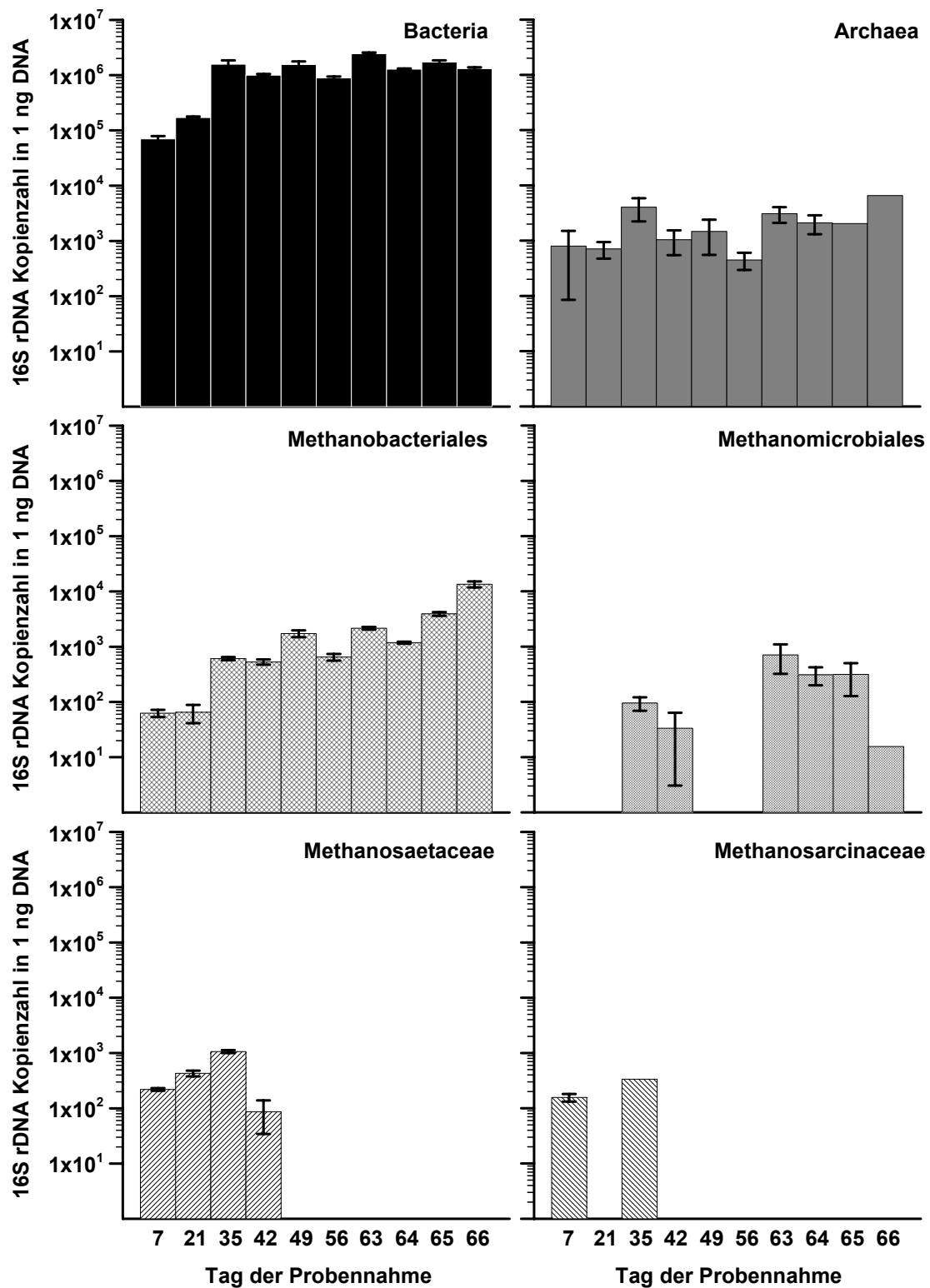


Abb. 15: Entwicklung der Mikrobiologie im Verlauf der Fermentation von Maissilage während Startphase, kontinuierlichem Betrieb und Übersäuerung hervorgerufen durch eine Belastungssteigerung (System 6). Die einzelnen Gruppen von Mikroorganismen wurden mittels quantitativer PCR und gruppenspezifischer Primer [Yu et al. 2005] auf Basis der jeweiligen Kopienzahl der 16S rDNA erfasst [veränd. nach Blume et al. Manuskript eingereicht].

Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes erfolgte die Analyse der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften in verschiedenen ein- und zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktorsystemen während der Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen. Hierzu wurden vorwiegend kulturunabhängige, molekulargenetische Ansätze auf Basis der Analyse der mikrobiellen 16S rDNA Nukleotidsequenz verwendet.

Es wurden folgende technische Arbeitsziele erreicht:

- Ein detailliertes Laborprotokoll für die molekulargenetische Analyse von Probenmaterial wurde etabliert.
- Ein Verfahren zur computergestützten Analytik von ARDRA Fragmentmustern wurde entwickelt und zum Aufbau einer Datenbank genutzt.
- Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur gruppenspezifischen Quantifizierung von Archaea und Bacteria in Biogasreaktor-Proben mittels visueller Erfassung per Fluoreszenzmikroskopie wurde am ATB etabliert.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Insgesamt wurden drei zweistufige, zweiphasige Biogasreaktoren (zwei Labormodelle, eine Praxisanlage) betrieben mit verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen (Roggen- und Triticale-Silage) untersucht. Ergänzend wurden zu speziellen Fragestellungen drei einstufige, zweiphasige Laborreaktoren betrieben mit Mais- bzw. Futterrüben-Silage beprobt. Alle untersuchten Reaktoren wurden mesophil betrieben.
- Mittels molekulargenetischer Verfahren (16S rDNA Analytik) war die Inventarisierung sowohl der methanogenen Archaea wie auch der hydrolytisch aktiven Bacteria in nur einem Ansatz möglich. Allerdings erwies sich die bakterielle Biodiversität als wesentlich größer als die der Archaea, so dass in einer universellen Klonbibliothek nur vergleichsweise selten archaeelle 16S rDNA detektiert wird. Als Alternative empfiehlt sich die Konstruktion Archaea bzw. Bacteria spezifischer 16S rDNA Klonbibliotheken.
- Die methanogene Archaea Lebensgemeinschaft in zweiphasigen Biogasfermentationen von nachwachsenden Rohstoffen besteht aus verschiedenen Vertretern der Methanomicrobiales, Methanobacteriales und Methanosarcinales sowie einer Reihe bislang nicht taxonomisch beschriebenen Euryarchaeota (Abb. 16).
- Die Anteile der einzelnen Gruppen methanogener Archaea variieren zwischen den einzelnen Fermentationsansätzen und Prozesszuständen (Abb. 16).

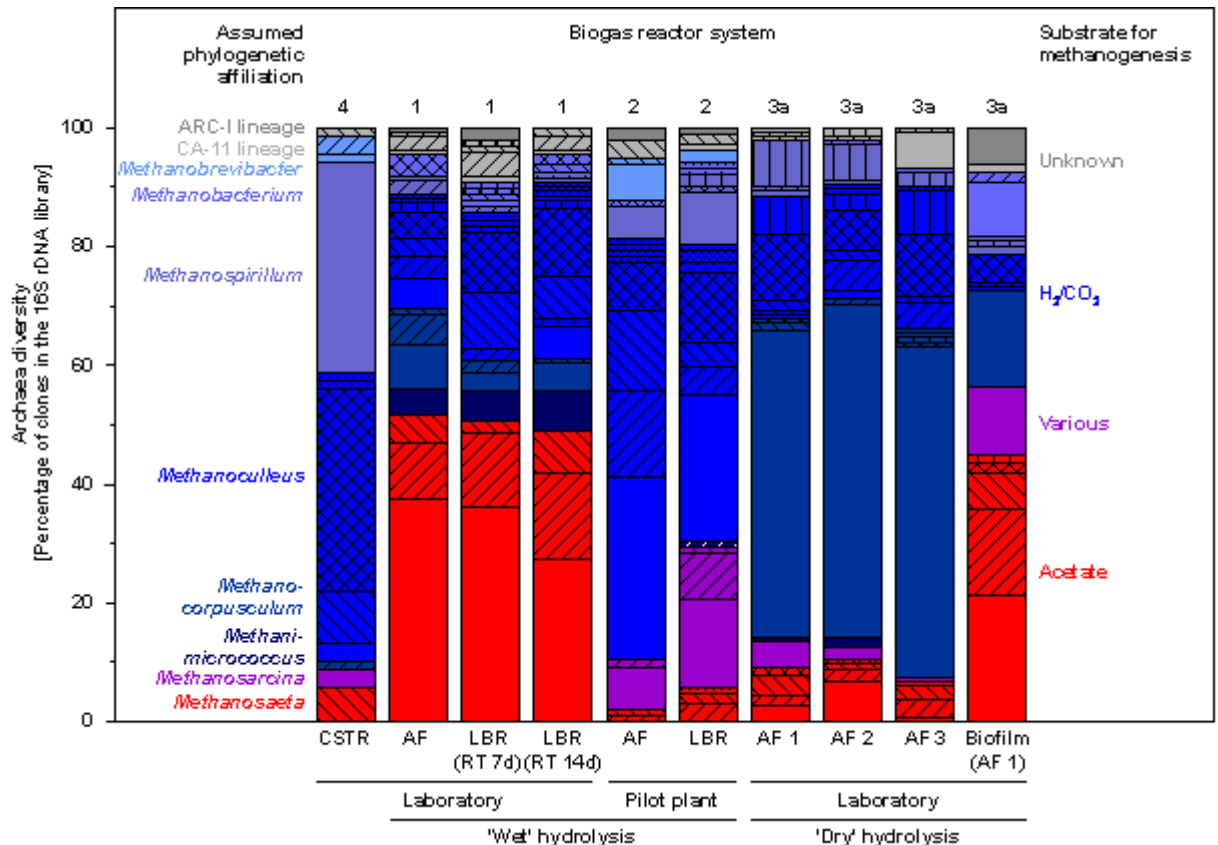


Abb. 16: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Analyse der Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in den drei untersuchten zweiphasigen zweistufigen Biogasreaktoren auf Basis verschiedener nachwachsender Rohstoffe mittels Archaea spezifischen 16S rDNA Klonbibliotheken. Die Reaktortuordnung erfolgte entsprechend Tab. 1 (Zahlen über den jeweiligen Balken).

„Wet“ hydrolysis= Die Hydrolyse erfolgte im Einstauverfahren. „Dry“ hydrolysis= Die Hydrolysestufe wurde im Perkulationsverfahren betrieben.

- Das Verhältnis zwischen Acetat und CO_2/H_2 verwertenden Methanbildnern variierte je nach untersuchtem Reaktorsystem. Dieses könnte ein Indiz für unterschiedliche Stoffflüsse innerhalb des Biogasreaktors sein.
- Die molekulargenetische Analyse der Archaea Gemeinschaft ergab unterschiedliche Befunde für das Labormodell und einer Praxisanlage einer zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktors. Dieses ist ein Indiz dafür, dass die Mikrobiologie in Modellsystemen nicht zwingend mit den Biozönosen in industriellen Anlagen übereinstimmt.
- In parallel betriebenen Anaerobfiltern einer zweistufigen Biogasanlage etablierte sich eine ähnlich strukturierte Archaea Gemeinschaft. Dieses ist die Voraussetzung für Reihenversuche zur statistischen Absicherung.
- Der Biofilm auf den Oberflächen in den Anaerobfiltern einer zweistufigen Biogasanlage enthielt hohe Anteile an Acetat verwertenden *Methanosaeta* sp. In der Prozessflüssigkeit fanden sich dagegen vorrangig hydrogenotrophe Methanbildner der Gattung *Methanocorpusculum* und *Methanoculleus*. Die Ausbildung und der Erhalt von Biofilmen scheint somit einen wesentlichen Einfluss auf die Substratverwertung in dem Biogasreaktor zu haben.

- Die Bacteria Gemeinschaft in der Hydrolyse pflanzlicher Biomasse wies eine sehr hohe Artenvielfalt auf. In den untersuchten Systemen fand sich die größte Biodiversität innerhalb des Stammes Firmicutes, und hierbei vorrangig in der Klasse Clostridia, sowie in dem Stamm bzw. der Klasse Bacteroidetes. Diese Gruppen wurden gleichfalls mit den höchsten Anteilen an Klonen in den Klonbibliotheken detektiert.
- In einem zweistufigen System blieb während eines vierzehntägigen Hydrolyseverlaufs die methanogene Archaea Gemeinschaft vergleichsweise konstant, während die Bacteria Gemeinschaft deutlich stärkeren Änderungen unterlag. Es gab jedoch Anzeichen, dass auch innerhalb der Bacteria die dominierenden Arten relativ konstant bleiben.
- Über 90% der in dieser Studie gefunden 16S rDNA Nukleotidsequenzen bakteriellen Ursprungs wiesen deutliche Unterschiede zu den bisher bekannten Typenstämmen auf. Dieses lässt auf einen hohen Anteil unbekannte Bakterien in der Hydrolysestufe schließen.
- Die Entwicklung der Mikrobiologie in einer zweiphasigen Fermentation von Maissilage wurde mittels quantitativer PCR (Q-PCR) verfolgt. Während zu Beginn der Fermentation die Acetat verwertenden Methanogenen den Prozess dominierten, wurde im Verlauf einer andauernden Fermentation die Durchsetzung hydrogenotropher Arten beobachtet.
- Mittels Q-PCR waren auch während einer Übersäuerung des Reaktors noch nennenswerte Anteile an 16S rDNA für Methanobacteriales und Methanomicrobiales nachweisbar. In wie weit es sich hierbei um physiologisch aktive Organismen handelte, konnte mittels der angewandten Methodik jedoch nicht ermittelt werden.

II.2 Verwertbarkeit

Im Rahmen dieses Projektes wurden wesentliche Arbeiten zur Analyse der methanogenen Lebensgemeinschaften in ein- und zweistufigen Biogasanlagen auf Basis nachwachsender Rohstoffe durchgeführt. Insbesondere wurden in diesem Zusammenhang erstmals umfangreiche Arbeiten zur Analyse der mikrobiellen Biodiversität mittels Klonbibliotheken und DNA-Sequenzierungen vorgenommen.

Diese Ergebnisse wurden bislang in 20 wissenschaftlichen Veröffentlichungen publiziert (s. II.4). Eine weitere Publikation befindet sich derzeit in Vorbereitung. Zusammen mit der TU Berlin wurden zwei Studiumsarbeiten (1 Praktikum, 1 Diplomarbeit) durchgeführt. Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Dissertation an der HU Berlin eingereicht und erfolgreich verteidigt.

Alle im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Nukleotidsequenzen wurden bzw. werden an die NCBI GenBank zur allgemeinen Verfügung übermittelt.

II.3 Fortschritte anderer Stellen

Fortschritte anderer Stellen zur Analyse der Mikrobiologie in zweiphasigen, zweistufigen Biogasreaktoren auf Basis von Nachwachsenden Rohstoffen außerhalb des BCN sind nicht bekannt.

Von Yu et al. wurden seit Projektbeantragung mehrere Publikationen zur Entwicklung einer Q-PCR basierten Nachweisteknik für Methanbildner veröffentlicht.

- YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. (2005): Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science and Technology* 52 (1-2): 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. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6): 670-679.

Im Rahmen dieses Projektes wurde das Verfahren von Yu et al. in Ergänzung zu der 16S rDNA Sequenzanalyse genutzt um die relative Entwicklung von Archaea und Bacteria im Verlauf der Fermentation von Maissilage zu verfolgen.

II.4 Veröffentlichungen

An diesem Projekt unmittelbar beteiligte Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter sind **fett** gedruckt. BCN-Partner anderer Teilprojekte sind *kursiv und fett* gedruckt.

Referierte Fachartikel

1. **Blume, F.; Bergmann, I.**; Nettmann, E.; Schelle, H.; Rehde, G.; Mundt, K.; **Klocke, M.** (-): Quantitative analysis of methanogenic population dynamics in a continuous operated mesophilic biogas fermenter during over-acidification. *Manuskript eingereicht zum Review.*
2. **Klocke, M.**; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; Mundt, K.; **Soudi, K.**; Mumme, J.; **Linke, B.** (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor

systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31 (3): 190-205.

3. **Soudi, K.**; Mumme, J.; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; **Linke, B.**; **Klocke, M.** (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agrartechnische Forschung / Agricultural Engineering Research* 13 (6): 197-206.
4. **Klocke, M.**; Mähnert, P.; Mundt, K.; **Soudi, K.**; **Linke, B.** (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology* 30 (2): 139 - 151.

Beiträge zu Sammelwerken

5. **Klocke, M.**; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Soudi, K.**; **Bergmann, I.**; Mumme, J.; **Schönberg, M.**; **Linke, B.** (2008): Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. *In: European Society of Agricultural Engineers [Ed.]: Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Kreta, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008. Book of abstracts: P-144, Conference Proceedings CD: 1143216 (13 S.).*
6. **Klocke, M.**; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; **Soudi, K.**; **Linke, B.** (2008): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. *Biospektrum* 2008S: 96.
7. **Klocke, M.**; Nettmann, E.; Mundt, K.; **Soudi, K.**; **Bergmann, I.**; **Linke, B.** (2007): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. *Journal of Biotechnology* 131 (2S): S123-S124.

Poster-Präsentationen auf Fachtagungen

8. **Klocke, M.**; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Soudi, K.**; **Bergmann, I.**; Mumme, J.; **Schönberg, M.**; **Linke, B.** (2008): Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. *International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Hersonissos, Crete, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008.*
9. **Klocke, M.**; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; **Soudi, K.**; **Linke, B.** (2008): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. *VAAM-/GBM-Jahrestagung, Frankfurt am Main, 9. - 11. März 2008.*
10. **Klocke, M.**; Nettmann, E.; Mundt, K.; **Soudi, K.**; **Bergmann, I.**; **Linke, B.** (2007): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. *13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, Spanien, 16. - 19. September 2007.*
11. **Klocke, M.**; Mumme, J.; Mundt, K.; **Soudi, K.**; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; **Linke, B.** (2007): Methanbildende Archaea in zweistufigen Biogasreaktoren bei der Vergärung von Triticale-Silage. *Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.*
12. **Schönberg (ehm. Winkler), M.**; **Klocke, M.**; Mundt, K.; **Linke, B.** (2007): Vergärung von Roggen-GPS in einer zweistufigen Prozessführung mit Bioleaching. *Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.*

13. **Souidi, K.**; Mumme, J.; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Bergmann, I.**; **Linke, B.**; **Klocke, M.** (2007): Analyse der mikrobiellen Diversität in Biogasreaktoren. Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.
14. **Scherer, P.A.**; **Klocke, M.**; Unbehauen, M. (2005): Anaerobic digestion of beet silage by non-aceticlastic methanogenesis. 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Copenhagen, Denmark, 31. August - 2. September 2005.

Fachvorträge

15. **Klocke, M.** (2008): Diversity and abundance of methanogenic Archaea in biogas reactors. Solar Bio-Fuels 2008, Bielefeld, Germany, 12. - 14. August 2008.
16. **Klocke, M.** (2007): Production of methane in biogas fermentations: microbiology and physiology of methanogenesis. EU Marie Curie Training Course II - Agricultural Technologies for Sustainable and Efficient Production, Processing and Use of Biomass. Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, Deutschland, 19. - 23. November 2007.
17. **Klocke, M.** (2007): Stand und Perspektiven der Agrarbiotechnologie. Fachkolloquium des Fachbereichs Agrarwirtschaft. Fachhochschule Südwestfalen, Soest, Deutschland, 29. Oktober 2007.
18. **Klocke, M.** (2007): Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Biogasreaktoren - Molekulare Ansätze zur Analyse eines komplexen Ökosystems. LfL Fachkolloquium. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, Deutschland, 2. Oktober 2007.
19. **Klocke, M.** (2006): Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Biogasreaktoren: Neue Ansätze zur Analyse eines komplexen Ökosystems. New Energy Husum / International Biogas Workshop, Husum, Deutschland, 23. - 26. März 2006.

Dissertationen

20. **Souidi, K.** (2008): Mikrobielle Diversität in Biogasanlagen. Promotion zum Dr. rer. agr. (08.02.2008). Landwirtschaftlich-gärtnerische Fakultät. Humboldt-Universität zu Berlin.

Diplomarbeiten

21. **Blume, F.** (2009): Characterization of the methanogenic community structure in a laboratory scale biogas reactor using group specific real-time PCR. Diplomarbeit. Technische Universität Berlin.

