

Bioindikatoren der Biogasfermentation

Entwicklung von molekularen Markern und
Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen PCR
für das Monitoring von prozessrelevanten
Mikroorganismen als Frühwarnsystem
für Prozessstörungen

GEFÖRDERT VOM

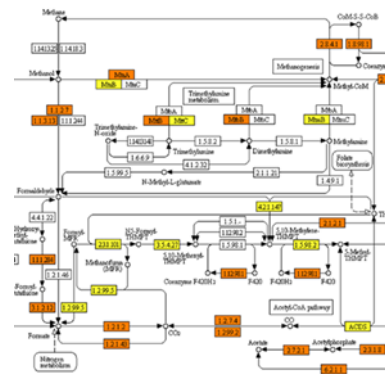
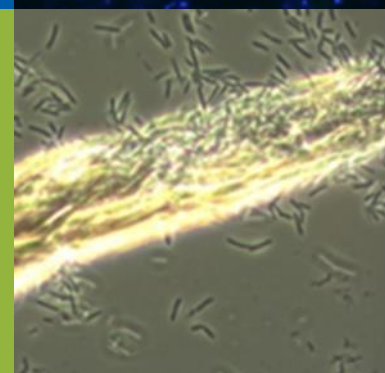
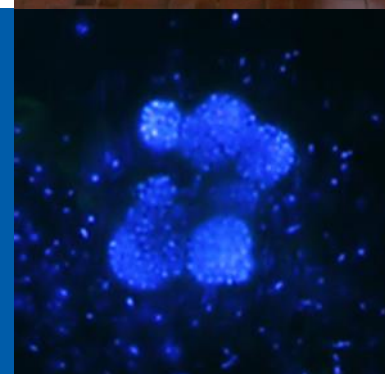


Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Bornimer Agrartechnische Berichte

Heft 95

Potsdam-Bornim 2017



Bioindikatoren der Biogasfermentation

**Entwicklung von molekularen Markern und
Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen PCR für das
Monitoring von prozessrelevanten Mikroorganismen als
Frühwarnsystem für Prozessstörungen**

**Schlussbericht
zum Forschungsverbund
BIOGAS-MARKER**

**Bornimer Agrartechnische Berichte
Heft 95**

Potsdam-Bornim 2017

Herausgeber:

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

August 2017

Redaktion:

Dr. Michael Klocke

Layout:

Andrea Gabbert

Quellennachweis der Umschlagfotos

(von oben nach unten)

- (1) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abt. Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
- (2) Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V., Abt. Bioverfahrenstechnik
- (3) Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V., Abt. Bioverfahrenstechnik
- (4) Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie
- (5) Beuth Hochschule für Technik Berlin, Fachbereich V
- (6) Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie

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

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) über den Projektträger Jülich - Forschungszentrum Jülich GmbH (PTJ) als Projektträger des BMBF für das Förderprogramm Bioenergie – Prozessorientierte Forschung und Innovation (BioProFi) unterstützt.

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

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

ISSN 0947-7314

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

BIOGAS-MARKER

Entwicklung von molekularen Markern und Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen PCR für das Monitoring von prozessrelevanten Mikroorganismen als Frühwarnsystem für Prozessstörungen

Teilprojekt 1: Mikrobielle Gemeinschaften in zweiphasigen Systemen

Teilprojekt 2: Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen

Teilprojekt 3: Mikroorganismen der Cellulolyse

Teilprojekt 4: Charakterisierung des Biogas-Transkriptoms

Teilprojekt 5: Pathogen-Diagnostik für Biogasreaktoren

Zuwendungsempfänger:

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

Teilprojekt 2: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Teilprojekt 3: Technische Universität München

Teilprojekt 4: Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie

Teilprojekt 5: Beuth Hochschule für Technik Berlin

Förderkennzeichen:

03SF0440A, 03SF0440B, 03SF0440C, 03SF0440D, 03SF0440E

Laufzeit:

01.04.2013 – 31.08.2016

Monat der Erstellung:

Oktober 2016

GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium
für Bildung
und Forschung**

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) über den Projektträger Jülich - Forschungszentrum Jülich GmbH (PTJ) als Projektträger des BMBF für das Förderprogramm Bioenergie – Prozessorientierte Forschung und Innovation (BioProFi) unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Verbundpartner

Dr. Antje Rademacher, Dipl.-Nat. Jaqueline Derenkó, Dipl.-Ing. (FH) Carsten Jost,
Dr. Michael Klocke (Verbundkoordination)

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik
Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam
Tel.: 0331/5699-113
Email: mklocke@atb-potsdam.de



Bernhard Munk, Elena Madge-Pimentel, **Dr. Michael Lebuhn**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Abt. Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
Vöttinger Str. 36, 85354 Freising
Tel.: 08161/71-3796
Email: michael.lebuhn@lfl.bayern.de



Dipl.-Biochem. Alexander Pechtl, Dr. Wolfgang H. Schwarz, **Prof. Dr. Wolfgang Liebl**

Technische Universität München (TUM)
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-5450
Email: wliebl@wzw.tum.de



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

Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)
Institut für Genomforschung und Systembiologie
Genomforschung Industrieller Mikroorganismen
Universitätsstr. 27, 33615 Bielefeld
Tel.: 0521/106-8757
Email: aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de



M.Sc. Susanne Helbig, M.Sc. Susanne Fischer, **Prof. Dr. Steffen Prowe**

Beuth Hochschule für Technik Berlin (Beuth-HS)
Fachbereich V - Studiengang Biotechnologie
Forum Seestrassse, Seestrassse 64, 13347 Berlin
Tel.: 030/4504-3903
Email: steffen.prowe@beuth-hochschule.de



Inhalt

Ziele und Arbeitsprogramm des Forschungsverbundes.....	6
Schlussbericht zu Teilprojekt 1: Mikrobielle Gemeinschaften in zweiphasigen Systemen	9
Schlussbericht zu Teilprojekt 2: Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen.....	71
Schlussbericht zu Teilprojekt 3: Mikroorganismen der Cellulolyse.....	147
Schlussbericht zu Teilprojekt 4: Charakterisierung des Biogas-Transkriptoms	193
Schlussbericht zu Teilprojekt 5: Pathogen-Diagnostik für Biogasreaktoren	259

Ziele und Arbeitsprogramm des Forschungsverbundes

Grundlegendes Problem der Biogaserzeugung ist, dass die hierbei stattfindenden biochemischen bzw. mikrobiologischen Stoffwandlungsprozesse bislang nur ansatzweise verstanden sind. Der Großteil der beteiligten Mikroorganismen ist nach wie vor unbekannt. Dementsprechend sind auch deren StoffwechsellLeistungen kaum wissenschaftlich untersucht. Die Kenntnis der Biogas-Mikrobiologie wird jedoch allgemein als Schlüssel für die weitere technologische Optimierung der Biogasproduktion angesehen.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, dass folgenden Gruppen von Mikroorganismen zentrale Bedeutung bei dem anaeroben Abbau von pflanzlicher Biomasse und landwirtschaftlichen Reststoffen zu Biogas bzw. Methan zukommt:

- cellulolytische und acidogene Bakterien wie z.B. Vertreter der taxonomischen Klassen *Clostridia*, *Bacteroidia* und *Bacilli*,
- chemoorganotrophe *Archaea* aus dem Phylum *Euryarchaeota*,
- syntrophe, die Intermediate oxidierende Bakterien (sog. „Acetogene“),
- acetoklastische methanbildende Archaeen der Ordnung *Methanosarcinales*,
- hydrogenotrophe methanbildende Archaeen vorrangig der Klassen *Methanobacteria* und *Methanomicrobia*.

Im Rahmen dieses Verbundvorhabens sollten molekulare Marker für solche Arten und Gruppen von Mikroorganismen entwickelt werden, die von zentraler Bedeutung für den anaeroben Abbau von Biomasse zu Biogas sind. Nach der Ermittlung besonders prozessrelevanter Mikroorganismen war zentrales Ziel dieses Verbundvorhabens die Entwicklung von kultivierungsunabhängigen molekularen Verfahren zur Beurteilung der Systemmikrobiologie von Biogasreaktoren.

Mittels dieser Arbeiten sollten grundsätzliche Hindernisse in der Entwicklung und Anwendung biologischer Sensorsysteme überwunden werden. Es wird erwartet, dass die Bereitstellung entsprechender Detektionssysteme eine verbesserte und zeitnahe Verfolgung der am Biogasprozess beteiligten mikrobiologischen Gemeinschaften sowie ihrer Dynamiken ermöglichen wird. Mittelfristiges Ziel ist die Entwicklung von Assays zur Früherkennung und Diagnose von Prozessstörungen.

Das Arbeitsprogramm der Verbundpartner umfasste folgende Teilbereiche:

- Aufbau und Betrieb von Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab,
- Optimierung und Standardisierung der Präparation von DNA und RNA aus Biogasreaktoren hinsichtlich Zellyse, Nukleinsäureextraktion und -reinigung,
- Ermittlung der metabolisch aktiven Gemeinschaft in Biogasfermentationen durch Analyse des mikrobiellen Metagenoms und Metatranskriptoms,
- Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern auf Basis des Nachweises bestimmter taxonomischer Gruppen und/oder auf Basis funktioneller Gene sowie Ableitung von proportionalen Größen,

- Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen (*realtime*) PCR (qPCR) insbesondere hinsichtlich der Prüfung der Alternativen DNA- und RNA- (bzw. cDNA-) basiertem Nachweis und der jeweiligen Komplementarität zur Bestimmung metabolisch aktiver Zellkonzentrationen,
- Entwicklung entsprechender Protokolle für eine Diagnostik von exemplarischen pathogenen Arten,
- Evaluierung der Marker gestützten Assays unter Praxis-Bedingungen.

Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung dieses Vorhabens war die spezielle Expertise jedes einzelnen Verbundpartners. Eine Darstellung der Interaktion der verschiedenen Arbeitspakete untereinander ist in **Abbildung 1** dargestellt.

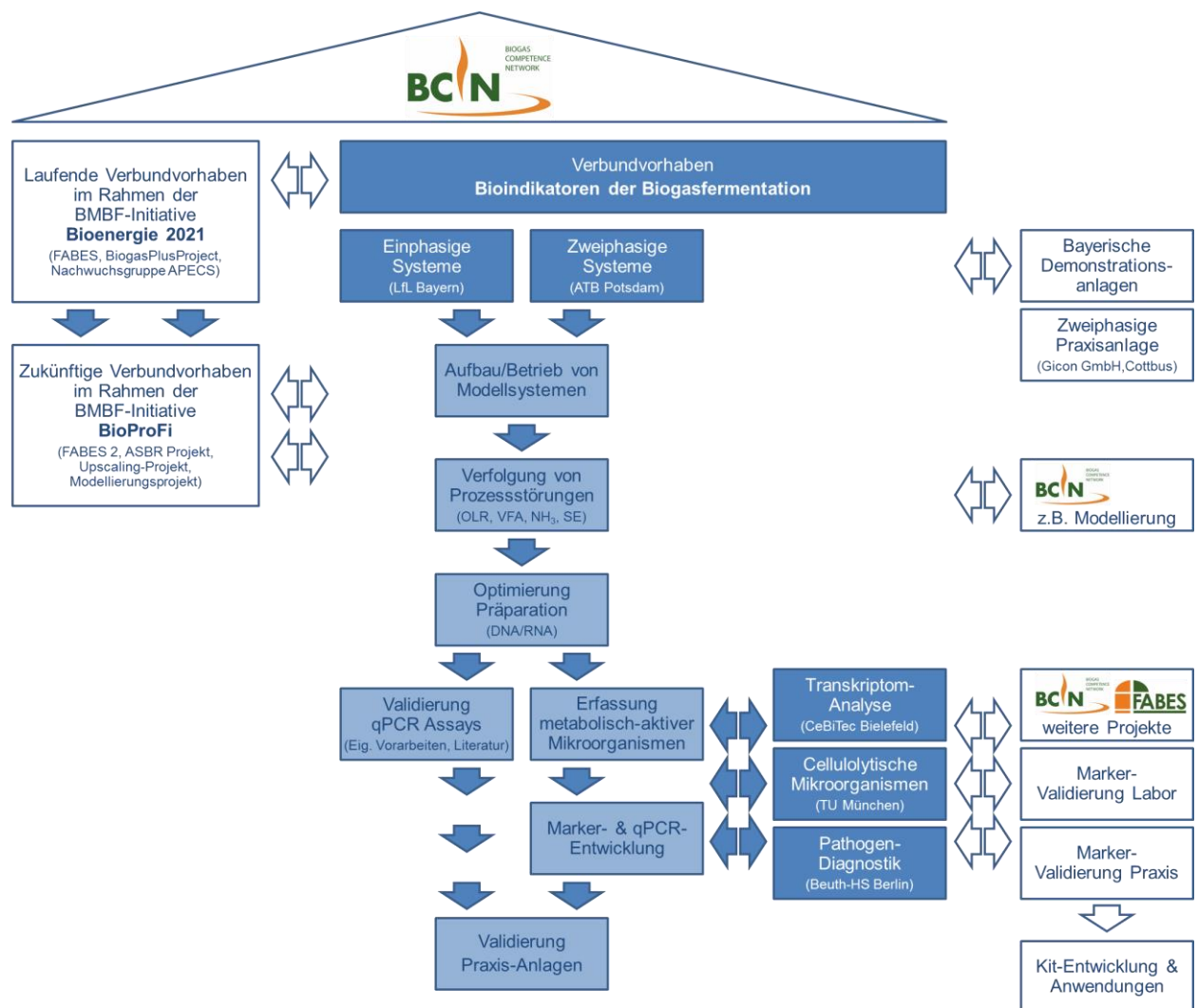


Abbildung 1: Übersicht über die Verbundstruktur und die Vernetzung der durchgeführten Arbeiten.

Die Ergebnisse dieses Forschungsverbundes wurden bislang in sechs Fachartikeln im Detail dargestellt:

- (1) **BREMGES A, MAUS I, BELMANN P, EIKMEYER F, WINKLER A, ALBERSMEIER A, PÜHLER A, SCHLÜTER A, SCZYRBA A (2015):** Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. *Gigascience* 4: article no. 33. DOI: 10.1186/s13742-015-0073-6
- (2) **KOECK DE, PECHTL A, ZVERLOV VV, SCHWARZ WH (2014):** Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 29: 171-183. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.07.002
- (3) **LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016):** DNA and RNA extraction and quantitative realtime PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison. *Bioengineering* 3: article no. 7. DOI: 10.3390/bioengineering3010007
- (4) **LEBUHN M, WEIß S, MUNK B, GUEBITZ GM (2015):** Microbiology and molecular biology tools for biogas process analysis, diagnosis and control. *In: Guebitz GM, Bauer A, Bochmann G, Gronauer A, Weiss S (Hrsg.): Biogas Science and Technology.* Springer International Publishing, pp. 1-40. DOI: 10.1007/978-3-319-21993-6_1
- (5) **MAUS I, KOECK DE, CIBIS KG, HAHNKE S, KIM YS, LANGER T, KREUBEL J, ERHARD M, BREMGES A, OFF S, STOLZE Y, JAENICKE S, GOESMANN A, SCZYRBA A, SCHERER P, KÖNIG H, SCHWARZ WH, ZVERLOV VV, LIEBL W, PÜHLER A, SCHLÜTER A, KLOCKE M (2016):** Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels* 9: article no. 171. DOI: 10.1186/s13068-016-0581-3
- (6) **STOLZE Y, BREMGES A, MAUS I, RUMMING M, PÜHLER A, SCZYRBA A, SCHLÜTER A (2016):** Identification and genome reconstruction of distinct taxa in microbiomes from four different production-scale biogas plants. *Biotechnology for Biofuels* 9: article no. 156. DOI: 10.1186/s13068-016-0565-3
- (7) **MUNK B, GUEBITZ GM, LEBUHN M (2017):** Influence of nitrogen-rich sub-strate on biogas production and the methanogenic community under meso-philic and thermophilic conditions. *Anaerobe, im Druck.*

Weitere Fachartikel befinden sich derzeit in Vorbereitung.

Die Darstellung ausgewählter Ergebnisse erfolgte darüber hinaus in Form von Vorträgen und Posterpräsentationen bei wissenschaftlichen Fachkonferenzen. Eine Übersicht dieser Arbeiten findet sich jeweils am Ende der Darstellung der Teilprojekte.

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema: **Bioindikatoren der Biogasfermentation**
Teilvorhaben 1: Mikrobielle Gemeinschaften
in zweiphasigen Systemen

Förderkennzeichen: 03SF0440A

Zuwendungsempfänger: Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.
Abt. Bioverfahrenstechnik
Max-Eyth-Allee 100
4469 Potsdam

Berichtverfasser: Dr. Antje Rademacher
Dipl.-Nat. Jaqueline Derenkó
Dipl.-Ing.(FH) Carsten Jost
Dr. Michael Klocke

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

Inhaltsverzeichnis

I	Ziele	11
I.1	Aufgabenstellung	11
I.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	11
I.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	12
I.4	Stand der Wissenschaft und Technik	12
I.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	15
II	Ergebnisse	16
II.1	Erzielte Ergebnisse	16
II.1.1	Aufbau und Betrieb von zweiphasigen Biogasreaktoren im Techni- kumsmaßstab (AP 1.1)	16
II.1.2	Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus zweiphasigen Biogasreaktoren (AP 2.1)	23
II.1.3	Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern für wichtige an der Biomethanisierung beteiligte taxonomische Einheiten (AP 3.1)	30
II.1.4	Bereitstellung von mikrobieller cDNA für die Transkriptomanalyse (AP 4.1)	50
II.1.5	Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen (<i>realtime</i>) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für taxonomische Einheiten und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem (AP 5.1)	51
II.1.6	Identifizierung von pathogenen Zielkeimen für die Diagnostik in Meta- genom- und Transkriptom-Datensätzen (AP 6.1)	64
II.1.7	Evaluierung der Marker unter Praxis-Bedingungen in der Analyse einer zweiphasigen Praxisanlage (AP 7.1)	65
II.2	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	67
II.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	67
II.4	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergeb- nisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	67
II.5	Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	67
II.6	Veröffentlichungen	69

I Ziele

I.1 Aufgabenstellung

Die Nutzung von erneuerbaren Ressourcen zur Erzeugung von Biogas stellt einen unerlässlichen Bestandteil innerhalb der Energiewende dar und trägt ebenfalls zur Erreichung der Klimaschutzziele bei.

Ein grundlegendes Optimierungspotential besteht bei vielen Biogasanlagen darin die Gasausbeute zu verbessern, die oftmals unterhalb des Möglichen liegt. Eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von vielversprechenden Verbesserungsansätzen ist die Vertiefung des Wissens über die Biogas-Mikrobiologie sowie eine konsequente und aussagekräftige Überwachung der am Prozess beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften.

Im Rahmen dieses Verbundvorhabens sollen mit dem Ziel einer Prozessüberwachung molekulare Marker für besonders prozessrelevante Gruppen von Mikroorganismen und entsprechende Protokolle zur Anwendung entwickelt werden. Es wird erwartet, dass mittels dieser Arbeiten grundsätzliche Hindernisse in der Entwicklung und Anwendung mikrobiologischer Detektionssysteme überwunden werden. Dies würde eine verbesserte und zeitnahe Verfolgung der am Biogasprozess beteiligten mikrobiologischen Gemeinschaften sowie ihrer Dynamiken ermöglichen. Insbesondere wird erwartet, dass sich die zu entwickelnden Assays zur Früherkennung und Diagnose von Prozessstörungen einsetzen lassen.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik (Leitung: Prof. Dr. B. Linke) am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) (Wiss. Direktor: Prof. Dr. R. Brunsch) betreibt seit 1992 anwendungsorientierte Grundlagenforschung zur Entwicklung neuer und zur Optimierung bestehender Verfahren zur stofflichen und energetischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe sowie zur Aufbereitung von organischen Reststoffen (www.atb-potsdam.de). Bearbeitet werden schwerpunktmäßig Themen zu den verfahrenstechnischen und mikrobiologischen Grundlagen von agrarbiotechnologischen Systemen. Die AG Systemmikrobiologie (Leitung: Dr. M. Klocke) untersucht die in solchen Systemen und Verfahren vorhandenen mikrobiellen Gemeinschaften, deren Einfluss auf die Produktqualität und -sicherheit sowie den Einfluss der Prozessgestaltung auf die Strukturen und StoffwechsellLeistungen der mikrobiellen Gemeinschaften. Einen langjährigen Schwerpunkt der Arbeiten bildet dabei die Biogas-Mikrobiologie.

Die Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde, haben sich auch während des Vorhabens gegenüber der Darstellung im Projektantrag nicht wesentlich geändert. Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) und landwirtschaftlichen Reststoffen haben seit Inkrafttreten des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahr 2000 und durch die Novellie-

rungen in den Jahren 2004, 2009, 2012 und 2014, insbesondere in der Landwirtschaft, erheblich zugenommen. Durch die Auflage der EEG-Novellierungen, bis zum Jahre 2050 den Anteil an erneuerbaren Energien an der Gesamtstromversorgung auf 80 Prozent zu erhöhen, gewinnt die Erzeugung und Nutzung von Bioenergie aus Biomasse an Bedeutung, da sie hierzu einen erheblichen Teil beitragen kann.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Fokus des Teilprojekts 1 stehen die Analyse zweistufiger, zweiphasiger Biogasreaktorsysteme und die Entwicklung von molekularen Markern für prozessrelevante Mikroorganismen. Hierfür sollen in enger Abstimmung mit den weiteren Teilprojekten des Verbundes folgende Arbeiten durchgeführt bzw. folgende Arbeitspakete (AP) umgesetzt werden:

- Aufbau und Betrieb von zweiphasigen Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab (AP 1.1, Verbundmeilenstein 1),
- Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus zweiphasigen Biogasreaktoren (AP 2.1, Verbundmeilenstein 3),
- Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern für wichtige an der Biomeathanisierung beteiligte taxonomische Einheiten (AP 3.1, Verbundmeilenstein 4),
- Bereitstellung von mikrobieller cDNA für die Transkriptomanalyse (AP 4.1, Verbundmeilenstein 4),
- Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für taxonomische Einheiten und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem (AP 5.1, Verbundmeilenstein 4),
- Identifizierung von pathogenen Zielkeimen für die Diagnostik in Metagenom- und Transkriptom-Datensätzen (AP 6.1, Verbundmeilenstein 2),
- Evaluierung der Marker unter Praxis-Bedingungen in der Analyse einer zweiphasigen Praxisanlage (AP 7.1, Verbundmeilenstein 5).

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik

I.4.1 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Die Arbeiten zum Teilprojekt beruhen auf Analysen eines am ATB entwickelten zweiphasigen, thermophilen Biogassystems bestehend aus einem vorgeschalteten *Leach-Bed*-Reaktor, einem zwischengeschalteten Prozessflüssigkeitsspeicher und einem nachgeschalteten Anaerobfilter. Dieses System wurde im Rahmen eines Vorgängerprojektes konzipiert und wird seit 2006 am ATB betrieben. Es basiert auf dem am Lehrstuhl Abfallwirtschaft der BTU Cottbus - Senftenberg entwickelten und von der Firma GICON GmbH patentierten zweistufige Trocken-Nass-Verfahren (DE 10 2004 053 615 B3). Die Fa. GICON fungiert als Ansprechpartner aus der Privatwirtschaft in diesem Verbundvorhaben.

Zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft wurden ausschließlich Verfahren optimiert bzw. genutzt, die für die öffentlich finanzierte Forschung freigegeben sind. Die genaue Darstellung der Methoden und Verfahren können der folgenden Ergebnisdarstellung in diesem Bericht sowie den entsprechenden Fachpublikationen entnommen werden. Schutzrechte Dritter wurden zu keiner Zeit berührt.

1.4.2 *Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste*

Für einzelne Themengebiete wird im Folgenden relevante Literatur angegeben. Weitere Literaturhinweise sind in der Ergebnisdarstellung dem entsprechenden Sachzusammenhang zu entnehmen.

Genutzte Literaturdatenbanken

- ISI web of Knowledge (URL: <http://apps.webofknowledge.com>)
- Digitaler Katalog der Universität Potsdam (URL: <http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBPO>)
- PubMed der US National Library of Medicine (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

Genutzte Informations- und Dokumentationsdienste

- **COLE JR, WANG Q, FISH JA, CHAI B, MCGARRELL DM, SUN Y, BROWN CT, PORRAS-ALFARO A, KUSKE CR, TIEDJE JM (2014):** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42: D633-D642
- **KANZ C, ALDEBERT P, ALTHORPE N et al. (2005):** The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research* 33: D29-D33
- **WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, COLE JR (2007):** Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261-5267
- **WHEELER DL, BARRETT T, BENSON DA et al. (2007):** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 35: D5-D12
- **QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO (2013):** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: D590-D596

Genutzte Fachliteratur

- **BACHOON DS, CHEN F, HODSON RE (2001):** RNA recovery and detection of mRNA by RT-PCR from preserved prokaryotic samples. *FEMS Microbiology Letters* 201: 127-132
- **BEKELE AZ, KOIKE S, KOBAYASHI Y (2010):** Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiology Letters* 305: 49-57

- **GOOD IJ (1953):** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237-264
- **HAHNKE S, MAUS I, WIBBERG D, TOMAZETTO G, PÜHLER A, KLOCKE M, SCHLÜTER A (2015):** Complete genome sequence of the novel Porphyromonadaceae bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 193: 34-36
- **HAHNKE S, LANGER T, KOECK DE, KLOCKE M (2016):** Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov. isolated from mesophilic lab-scale biogas reactors and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 66: 1466-1475
- **HECHT C, GRIEHL C (2009):** Investigation of the accumulation of aromatic compounds during biogas production from kitchen waste. *Bioresource Technology* 100: 654-658
- **MATSUKI T, WATANABE K, FUJIMOTO J, TAKADA T, TANAKA R (2004):** Use of 16S rRNA gene-targeted Group-specific primers for Real-Time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7220-7228
- **MUTTER GL, ZAHRIEH D, LIU C, NEUBERG D, FINKELSTEIN D, BAKER HE, WARRINGTON JA (2004):** Comparison of frozen and RNAlater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics* 5: article number 88
- **NOCKER A, CHEUNG C-Y, CAMPER AK (2006):** Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67: 6861-6862
- **NOCKER A, SOSSA-FERNANDEZ P, BURR MD, CAMPER AK (2007):** Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5111-5117.
- **VAN EIJSDEN RGE, STASSEN C, DAENEN L, VAN MULDERSE SE, BAPAT PM, SIEWERS V, GOOSSENS KVV, NIELSEN J, DELVAUX FR, VAN HUMMELEN P, DEVREESE B, WILLAERT RG (2013):** A universal fixation method based on quaternary ammonium salts (RNAlater) for omics-technologies: *Saccharomyces cerevisiae* as a case study. *Biotechnology Letters* 35: 891-900
- **VAN FRANKENHUYZEN JK, TREVORS JT, FLEMMING CA, LEE H, HABASH MB (2013):** Optimization, validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40: 1251-1261
- **WAGNER AO, MALIN C, KNAPP BA, ILLMER P (2008):** Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2537-2539
- **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
- **ZAKRZEWSKI M, GOESMANN A, JAENICKE S, JÜNEMANN S, EIKMEYER F, SZCZEPANOWSKI R, ABU AL-SOUD W, SØRENSEN S, PÜHLER A, SCHLÜTER A (2012):** Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *Journal of Biotechnology* 158: 248-258
- **ZOETENDAL EG, BOOIJINK CCGM, KLAASSENS ES, HEILIG HGHJ, KLEEREBEZEM M, SMIDT H, DE VOS WM (2006):** Isolation of RNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nature Protocols* 1: 954-959

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit innerhalb des Biogas-Marker-Verbunds erfolgte in Form von halbjährlichen Verbundtreffen unter Beteiligung der folgenden Projektpartner:

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Dr. Michael Lebuhn
- Universität Bielefeld, Center für Biotechnologie (CeBiTec), Dr. Andreas Schlüter
- Technischen Universität München (TUM), Lehrstuhl für Mikrobiologie, Prof. Dr. Wolfgang Liebl, Dr. Wolfgang Schwarz
- Beuth Hochschule für Technik Berlin (Beuth-HS), Prof. Dr. rer. nat. Steffen Prowe

Das Verbundvorhaben ist Teil des Biogas Competence Network e.V. (BCN) mit Koordination durch das Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin (IASP).

Die akademische Betreuung der im Rahmen des Teilvorhabens 1 durchgeführten Studienarbeiten und Graduierungsarbeiten erfolgte durch die Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Prof. Dr. Elke Dittmann:

- Promotionsvorhaben von Dipl.-Nat. Jaqueline Derenkó (01.05.2013 - lfd.)
- Praktikum von Dominik Bents (01. - 30.09.2014)
- Wissenschaftliche Mitarbeit von B. Sc. Jessica Behrend (01.09.2014 - 28.02.2015, 01.04. - 30.09.2015)
- Wissenschaftliche Mitarbeit von B. Sc. Kevin Herrmann (15.10. - 31.01.2015)

Im Rahmen des Teilvorhabens 1 fand ein Gastaufenthalt (DAAD Fellowship) von Prof. Dr. Cheerawit Rattanapan, ASEAN Institute for Health Development, Mahidol University, Thailand, statt (01.10. - 30.11.2013).

II Ergebnisse

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 Aufbau und Betrieb von zweiphasigen Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab (AP 1.1)

Die am ATB zu etablierenden vier Biogasreaktorsysteme wurden entsprechend der schematischen Darstellung (**Abbildung 1**) aufgebaut. Zwei der Reaktorsysteme wurden bei 37°C und zwei bei 55°C betrieben. Jedes dieser zweistufigen zweiphasigen Reaktorsysteme bestand aus einem Hydrolysereaktor (HR, auch Feststofffermenter, 10 l), einem Perkolatspeicher (10 l) und einem Anaerobfilter (AF, auch Festbettmethanreaktor, 10 l) mit Bioflow 40 Füllkörpern. Durch ein Perkolationsystem standen die einzelnen Reaktorkompartimente miteinander in Verbindung. Die Perkolation vom Perkolatspeicher in den Hydrolysereaktor erfolgte zweistündig mit 2 l ($140,5 \text{ ml min}^{-1}$) und vom Anaerobfilter in den Perkolatspeicher von Versuchsreihe (VR) 1-9 kontinuierlich mit $1,1 \text{ l h}^{-1}$ und ab VR10 alle 45 min mit $0,44 \text{ l (} 29,5 \text{ ml min}^{-1}\text{)}$. Die theoretische Verweilzeit lag beim HR bei ca. 9 h und beim AF ab VR10 bei ca. einem Tag.

Die Substratzugabe mittels Grassilage (Trockensubstanz bezogen auf Frischmasse (TS_{FM}) 35,87%, organische Trockensubstanz bezogen auf Frischmasse (oTS_{FM}) 31,97%), die von dem Projektpartner LfL bereitgestellt worden war, erfolgte im HR alle 28 Tage in Batch-Fahrweise. Während des kontinuierlichen Betriebs der Anlagen wurden verschiedene Prozessparameter, wie zum Beispiel der pH-Wert, analysiert. Des Weiteren wurden sowohl TS_{FM} und oTS_{FM} , die Gärsäuren als auch der vorhandene Ammoniumgehalt ermittelt. Zusätzlich wurden die Biogas- und Methanausbeuten für die einzelnen Reaktoren und Reaktorkompartimente erfasst.

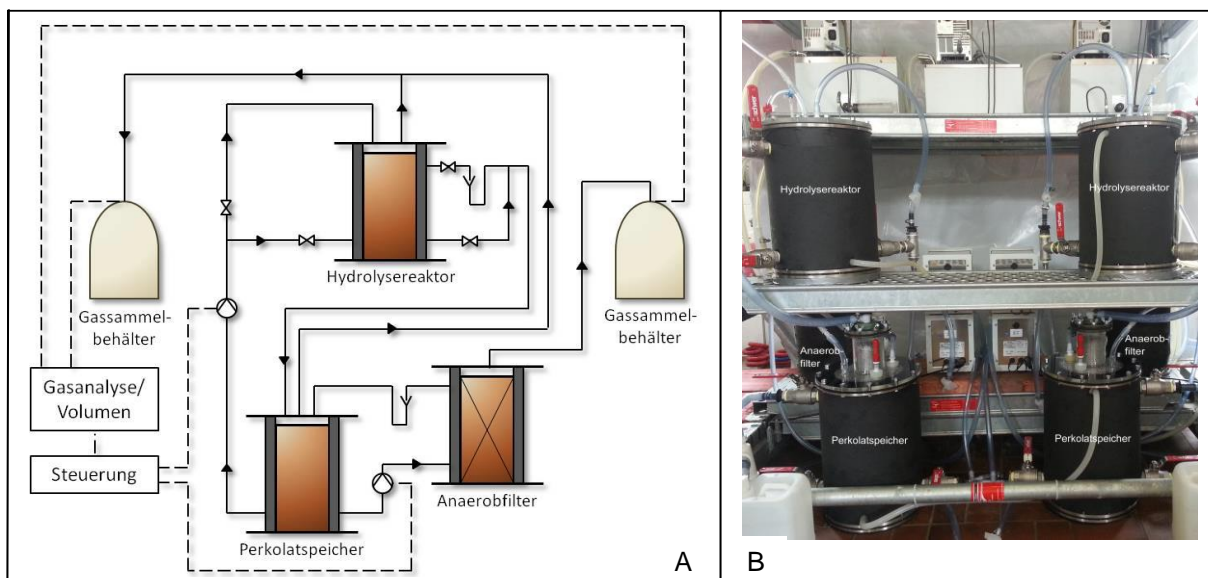
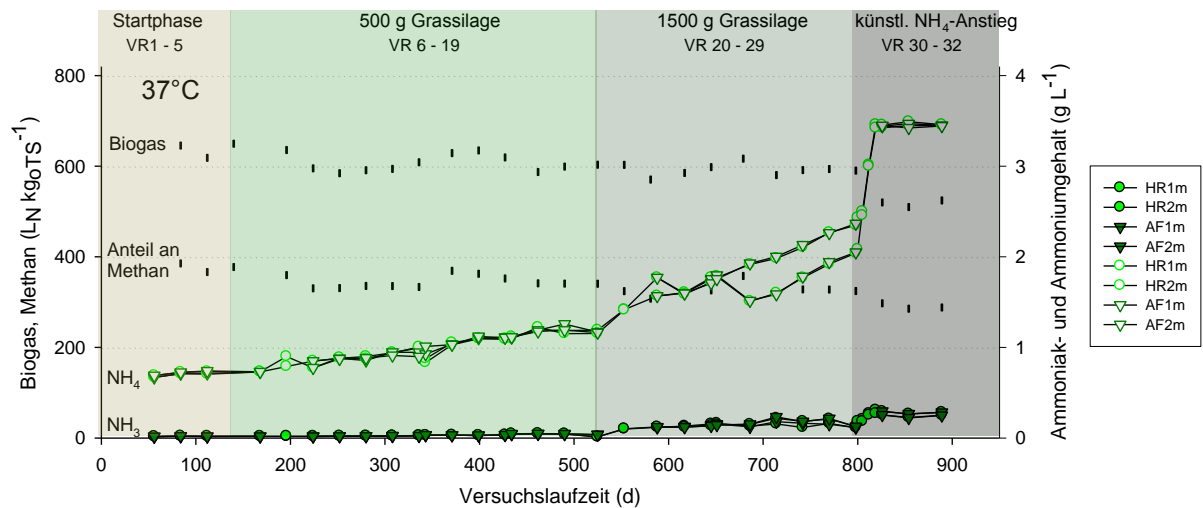


Abbildung 1: Schematischer Aufbau (A) und Abbildung (B) des zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktorsystems bestehend aus Hydrolysereaktor, Perkolatspeicher und Anaerobfilter

Die gesamte Versuchslaufzeit unterteilt sich in vier Abschnitte (**Abbildung 2**). Im ersten Abschnitt der Startphase (VR1 - VR5) wurde die Substratlast von 250 auf 500 g Frischmasse (FM) gesteigert. Im zweiten Abschnitt (VR6 - VR19) wurden jeweils 500 g_{FM} zugeführt um einen gleichbleibenden Betrieb und eine Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft zu gewährleisten. Im dritten Abschnitt (VR20 - VR29) wurde die Substratlast auf 1.500 g_{FM} gesteigert um eine Akkumulation von Ammonium und Gär-säuren im System zu induzieren. Konstruktionsbedingt führte diese Steigerung der Substratlast zu leichten, vorübergehenden technischen Problemen, wie zum Beispiel eine substratbedingte Verstopfung der Reaktoren verbunden mit einem verminderten Abfließen des Perkolats. Um ein besseres Abfließen des Perkolats zu ermöglichen, wurde die Zeit zwischen den Pumpvorgängen am Ende der ersten Versuchswoche auf 4 h erhöht.

A



B

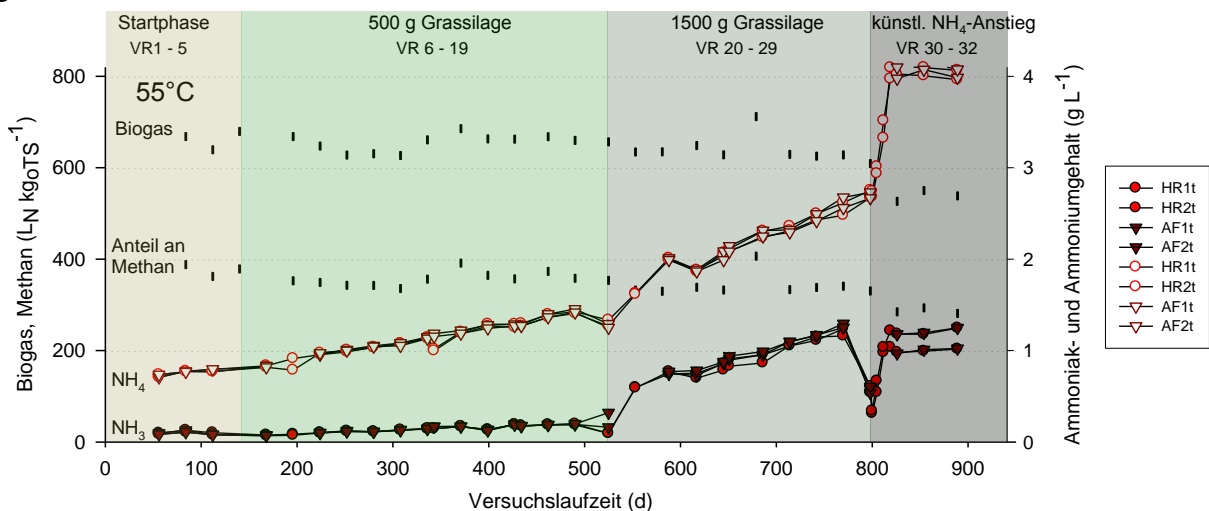


Abbildung 2: Darstellung der Biogas- und Methanausbeuten sowie der NH_4^+ - und NH_3 -Konzentrationen über die gesamte Versuchslaufzeit in den Reaktorsystemen bei 37°C (A) und 55°C (B). HR, Hydrolysereaktor; AF, Anaerobfilter.

Auf die Zugabe von weiteren Substraten, wie zum Beispiel Hühnermist als zusätzliche Stickstoffquelle, wurde während des dritten Versuchsabschnittes (VR20 - VR29) verzichtet, da die genutzte Grassilage bereits einen hohen Anteil an Ammonium ($0,63 \text{ g kg}_{\text{FM}}^{-1}$) aufwies. Es wurde erwartet, dass die Steigerung der Zugabe an Grassilage auch ohne zusätzliche Stickstoffquellen zu einer erhöhten Stickstoffkonzentration im Reaktorsystem führen würde. Entsprechend dieser Erwartungen stieg die Stickstoffkonzentration in den Reaktorsystemen stetig an (VR29: $2,23 \text{ g l}^{-1}$ bei 37°C ; $2,75 \text{ g l}^{-1}$ bei 55°C), führte jedoch nicht zu einem Einbruch in der Biogas- bzw. Methanproduktion. Deshalb wurde in einem vierten Abschnitt (VR30 - VR33) die Ammoniumkonzentration pro Reaktorsystem um ca. $1,3 \text{ g l}^{-1}$ auf Werte von ca. $3,5 \text{ g l}^{-1}$ (37°C) und 4 g l^{-1} (55°C) erhöht. Die Einstellung dieser Konzentrationen erfolgte entsprechend den Ammoniumwerten der Reaktoren des Projektpartners LfL durch eine dreifache Zugabe von Ammoniumcarbonat über einen Zeitraum von vier Wochen.

Während der Versuchslaufzeit (VR1 - VR29) bis zur künstlichen NH_4 -Erhöhung wurden vergleichsweise konstante Biogas- und Methanerträge detektiert (**Abbildung 2**). Die Biogasausbeuten lagen in den Reaktorsystemen bei 55°C mit mehr als $600 \text{ l}_\text{N} \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ meist etwas höher als bei 37°C . Die Methanausbeuten lagen zwischen 315 und $343 \text{ l}_\text{N} \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$, wobei die bei 55°C betriebenen Reaktoren ebenfalls leicht höhere Werte erzielten. Im Vergleich dazu erzielten die VDI-Referenzgärtests (VDI-Norm 4630, Ausgabe April 2006), die mit Hilfe des Automatic Methane Potential Test-Systems (AMPTS) durchgeführt worden waren, Methanwerte von maximal $370 \text{ l}_\text{N} \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$, im Schnitt jedoch um $353 \text{ l}_\text{N} \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$. Es ist somit deutlich, dass die in den Reaktorsystemen erzielten Methanausbeuten in den Versuchsreihen VR6 bis VR29 nicht mehr als 10% unterhalb der VDI-Referenzwerte lagen.

Ab Versuchsreihe VR30 (künstlich induzierter Ammoniumanstieg) wurde dagegen ein deutlicher Rückgang der Biogas- und Methanausbeuten festgestellt. Bei den Reaktoren, die bei 37°C betrieben wurden, sanken die Ausbeuten um durchschnittlich 10% und bei denen, die bei 55°C betrieben wurden, um 15% im Vergleich zu den Ergebnissen vor der künstlich herbeigeführten Erhöhung der Ammoniumkonzentration.

Bis zur Versuchsreihe VR29 konnten die Reaktoren stabil und miteinander vergleichbar betrieben werden, obwohl eine stetige Anreicherung von Ammonium zu beobachten war. Die Ammoniumwerte lagen zu Beginn der gesamten Versuchslaufzeit unterhalb von 1 g l^{-1} , stiegen aber zum Ende der Versuchsreihe VR19 auf ca. $1,2$ (37°C) und $1,3 \text{ g l}^{-1}$ (55°C) an. Die Ammoniakkonzentrationen lagen in diesem Zeitraum zwischen $0,02$ - $0,20 \text{ g l}^{-1}$, wobei die thermophilen Reaktoren hier erwartungsgemäß höhere als die mesophilen, aber dennoch unkritische Werte aufwiesen. Im Zuge der erhöhten Substratzugabe von $1.500 \text{ g}_{\text{FM}}$ Grassilage ab VR20 stiegen die Ammoniumkonzentrationen zum Ende der Versuchsreihe VR28 auf $2,1 \text{ g l}^{-1}$ (37°C) bzw. $2,5 \text{ g l}^{-1}$ (55°C) an. Die Ammoniakkonzentrationen lagen zum gleichen Zeitpunkt bei $0,19$ (37°C) bzw. $1,20 \text{ g l}^{-1}$ (55°C). Nach der künstlichen Erhöhung der Ammoniumkonzentration ab VR30 kam es bei den bei 55°C betriebenen Reaktoren zu einer vorübergehenden Absenkung im pH. In diesem Zeitraum nahmen die pH-abhängigen Ammoniakkonzentrationen ebenfalls

ab. Zum Ende der Versuchsreihe VR32 zeigten sich jedoch wieder Ammoniakkonzentrationen von durchschnittlich $0,27 \text{ g l}^{-1}$ (37°C) und $1,13 \text{ g l}^{-1}$ (55°C).

Ebenso wie Ammonium lagen auch die Gärssäuren nach Zugabe von 1.500 g Grassilage im Vergleich zu den vorherigen Versuchsreihen in höheren Konzentrationen vor (**Abbildung 3**). Die maximale Konzentration der Gesamtessigsäureäquivalente lag in VR20 mit durchschnittlich $6,1 \text{ g l}^{-1}$ (37°C) bzw. $4,7 \text{ g l}^{-1}$ (55°C) deutlich höher als in VR11 mit $1,3 \text{ g l}^{-1}$ (37°C) bzw. $2,0 \text{ g l}^{-1}$ (55°C). Der größte Anteil entfiel dabei auf Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure, während die i-Buttersäure und i-Valeriansäure einen deutlich geringeren Anteil ausmachten. Weiterhin war zu beobachten, dass die jeweils höchsten Konzentrationen an Gärssäuren innerhalb der ersten sieben Tage einer Versuchsreihe vorlagen. Die Essigsäure erreichte bereits meist an Tag 2 die höchste Konzentration. Ab dem vierten Versuchstag sank die Essigsäurekonzentration wieder deutlich ab, was auf eine zeitnahe Verwertung durch die bakterielle Gemeinschaft hindeutet.

Eine Ausnahme stellte hierbei die Versuchsreihe VR32 dar. In dieser Versuchsreihe zeigte sich sowohl in den bei 37°C als auch in den bei 55°C betriebenen Reaktoren eine Verschiebung der höchsten Säurekonzentration um wenige Tage. Die Gärssäuren waren im Gegensatz zu vorherigen Versuchsreihen erst ab Tag 14 weitestgehend abgebaut und nicht bereits an Tag 7. Besonders deutlich war dieser Unterschied bei den Reaktorsystemen, die bei 55°C betrieben wurden. Hier wurde eine deutliche Akkumulation an Essigsäure, Propionsäure und i-Valeriansäure festgestellt. Die gemessenen Säurekonzentrationen verdoppelten sich zum Teil und stiegen auf Werte von bis zu $7,8 \text{ g l}^{-1}$ Essigsäure bzw. $1,3 \text{ g l}^{-1}$ Propionsäure. Auffällig ist auch, dass insbesondere bei der Propionsäure, aber auch bei der i-Valeriansäure, keine Abnahme der hohen Konzentrationen im Verlauf der 28-tägigen Versuchszeit zu verzeichnen war. Dies deutet auf eine deutliche Störung im bakteriellen anaeroben Abbau der Grassilage hin, was sich schlussendlich in den zuvor dargestellten verminderten Methanerträgen wieder spiegelt.

Zusätzlich der Analyse hinsichtlich der Gärssäurekonzentrationen wurde die Prozessflüssigkeit der einzelnen Reaktoren zum Ende der Gesamtversuchslaufzeit auch auf die Anwesenheit folgender organischer Säuren hin untersucht: Ferulasäure, Vanillinsäure und Phenyllessigsäure. Es sollte geprüft werden, ob eine mögliche Akkumulation dieser Verbindungen nachweisbar ist, da sich dies negativ auf die am Biogasprozess beteiligten Mikroorganismen auswirken könnte. Vanillinsäure und Ferulasäure zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen. Ferulasäure spielt eine Rolle bei der Synthese von Lignin und kommt in verschiedenen Gräsern vor. Phenyllessigsäure wurde bereits als Frühindikator für Prozesshemmungen in Biogassystemen vorgeschlagen (HECHT & GRIEHL 2009). Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl Ferulasäure als auch Phenyllessigsäure im Perkolat der Reaktoren nicht nachweisbar waren. Vanillinsäure wurde in Konzentrationen von bis zu $1,6 \text{ mg l}^{-1}$ nachgewiesen, einer verglichen mit anderen Gärssäuren sehr geringen Konzentration.

Die deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten zeigen sich auch in den Methanbildungsraten (**Abbildung 4**). Beim Vergleich der Versuchsreihen VR11 und VR23 ist zu erkennen, dass bei einer Substratlast von 1.500 g erwartungsgemäß höhere Methanbildungsraten zu verzeichnen waren. Bei beiden Versuchsreihen wurde zeitnah nach dem Start Methan gebildet. Bereits ab dem vierten Versuchstag sanken die Methanbildungsraten insbesondere innerhalb der VR23 wieder ab. Im Vergleich dazu zeigte sich bei VR32 (1.500 g Grassilage und NH_4^+ -Erhöhung) sowohl bei 37°C als auch bei 55°C ein geringerer Anstieg der Methanbildungsraten mit maximalen Werten zwischen Tag 7 bis 9 (37°C) bzw. Tag 11 bis 14 (55°C). Die Methanbildung fand somit zeitlich verzögert und insgesamt in geringeren Umfang statt. Dies ist insbesondere bei den Reaktorsystemen, die bei 55°C betrieben wurden, besonders deutlich zu erkennen.

Mittels AMPT- System wurde in separaten Vergärungen das verbleibende Methanpotential der Gärreste nach Fermentationsende evaluiert. Die Hemmung des Fermentationsprozesses hatte zur Folge, dass gegenüber den Gärresten der VR 23, vom Gärrest der VR32 bis hin zur 2-fachen (37°C) bzw. 1,3-fachen (55°C) Menge Methan freigesetzt wurde.

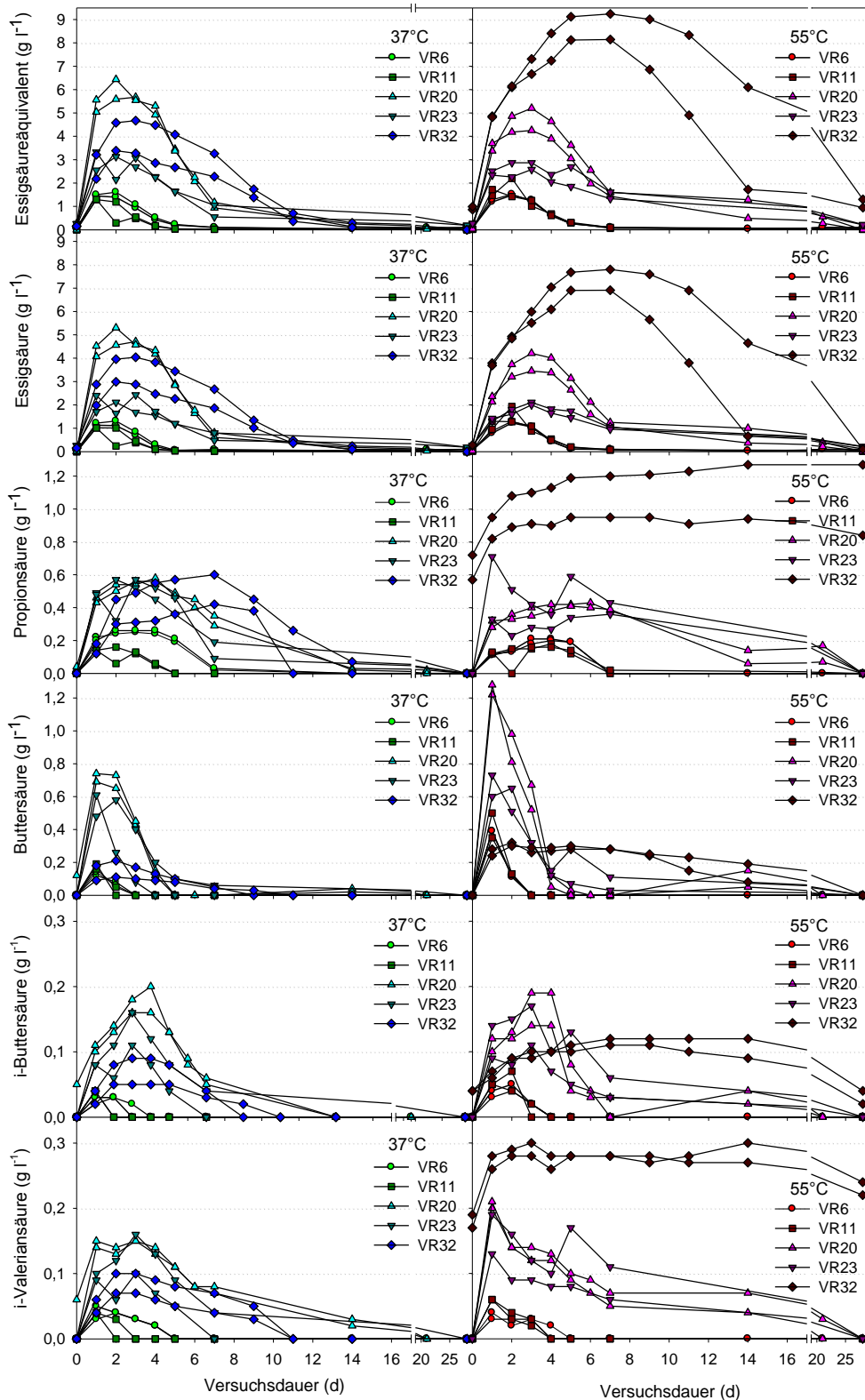


Abbildung 3: Darstellung der Konzentrationen der wichtigsten Gär säuren (inkl. Gesamtesigsäureäquivalent) über den Verlauf verschiedener Versuchsreihen (VR): VR6, Tag 168 - 196 (500 g Grassilage); VR11, Tag 308 - 336 (500 g Grassilage); VR20, Tag 525 - 553 (1.500 g Grassilage); VR23, Tag 617 - 645 (1.500 g Grassilage); VR32, Tag 861 - 889 (1.500 g Grassilage und NH_4^+ -Erhöhung); jeweils bezogen auf die Gesamtreaktorlaufzeit. Dargestellt sind jeweils die Messwerte für das Perkolat der Hydrolysereaktoren der mesophilen (37°C) (linke Spalte) und thermophilen (55°C) (rechte Spalte) Reaktoren.

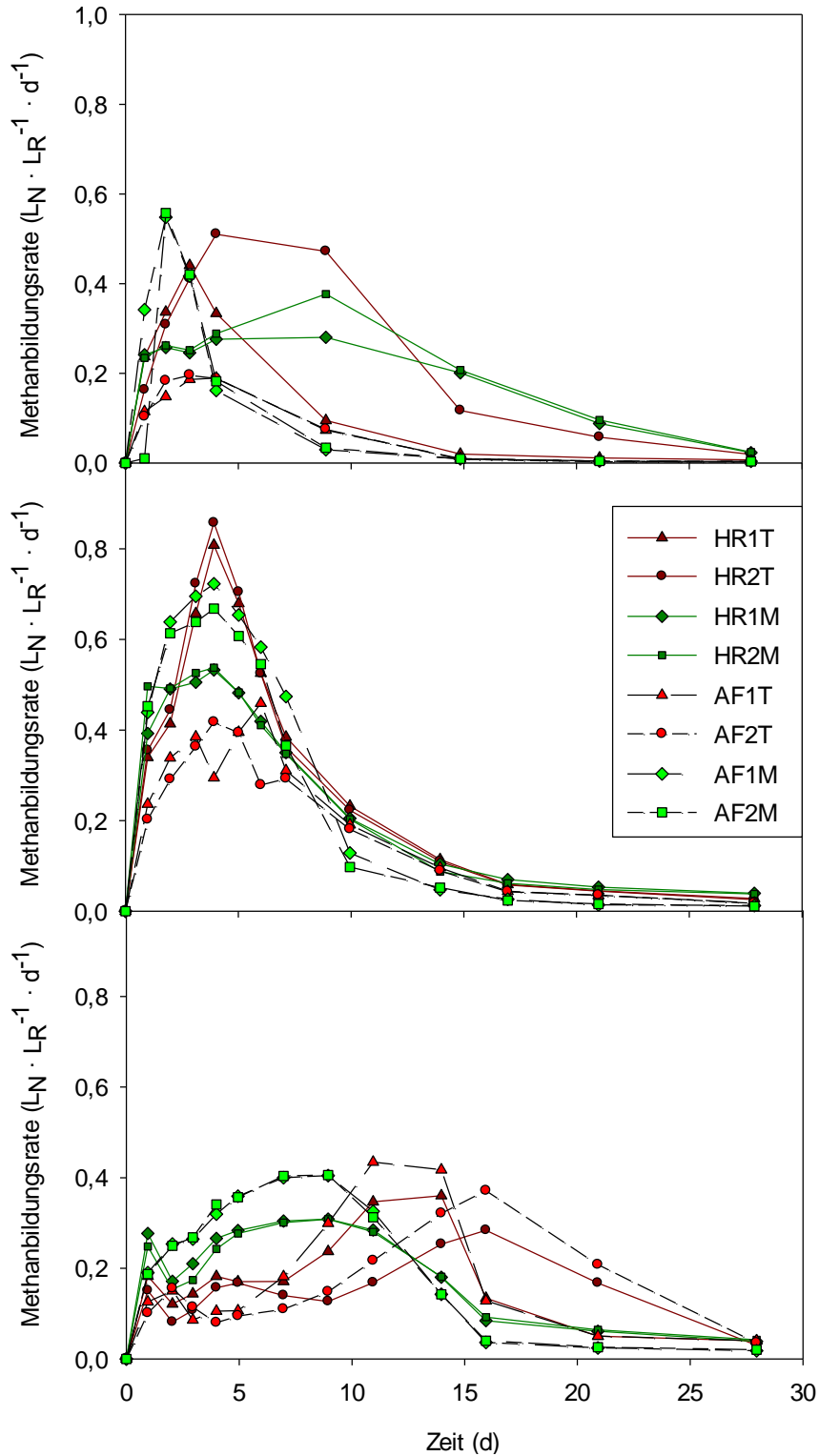


Abbildung 4: Exemplarische Methanbildungsraten für drei ausgewählte Versuchsreihen (VR): VR11, Tag 308 - 336 bei Zugabe von 500 g Grassilage (obere Abbildung); VR23, Tag 617 - 645 bei Zugabe von 1.500 g Grassilage (mittlere Abbildung); VR32, Tag 861 - 889 bei Zugabe von 1.550 g Grassilage und NH_4^+ -Erhöhung (untere Abbildung). HR1T, HR2T, Hydrolysereaktor 1 und 2 (55°C); HR1M, HR2M, Hydrolysereaktor 1 und 2 (37°C); AF1T, AF2T, Anaerobfilter 1 und 2 (55°C); AF1M, AF2M, Anaerobfilter 1 und 2 (37°C).

II.1.2 Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus zweiphasigen Biogasreaktoren (AP 2.1)

Zur Optimierung und Standardisierung der Extraktion mikrobieller DNA und RNA wurden im Rahmen dieses Forschungsverbundes zwei Ringversuche durchgeführt. Insbesondere sollte hierbei der Einfluss der angewandten Extraktionsmethode auf die Quantifizierung der 16S rRNA Genkopien und auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft abgeschätzt werden.

Im Vorfeld wurden hierzu vier verschiedene DNA-Extraktionsmethoden verglichen. Drei dieser vier Methoden basierten auf einem DNA-Extraktionskit (**Tabelle 1**). Ein Protokoll wurde ohne ein entsprechendes Kit angewandt. Neben den vier verschiedenen Extraktionsmethoden wurde zusätzlich auch der Einfluss einer DNA-Aufreinigung mittels illustra™ MicroSpin™ S-400 HR Columns (GE Healthcare), die sich an die DNA-Extraktion anschloss, untersucht.

Für den Vorversuch wurden ein thermophiler wissensbasierter Horizontalfermenter (WHF) und ein mesophiler Schwimmbettfermenter (SBF) im Versuchsmaßstab sowie eine mesophile Praxisanlage (B06) beprobt. Diese Proben wurden im Hinblick auf die Effizienz der Zellyse (Quantifizierung des 16S rRNA Gens mittels qPCR), die Gleichmäßigkeit des Zellaufschlusses bei verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen (TRFLP-Fingerprintanalyse), die Abwesenheit von PCR-inhibierenden Substanzen (Aufreinigung der DNA-Extrakte) und die Einfachheit des Protokolls untersucht.

Tabelle 1: Zusammenfassung der vier untersuchten Methoden zur Extraktion von mikrobieller DNA

	PS	noK (kein Kit)	FPv (vorgewaschen)	FPov (ohne vorgewaschen)
Verwendetes Kit	PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)	-	FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)	
Vorwuschritt	-	Natrium-Phosphat	Kaliumchlorid	-
Zellyse	Mechanisch, chemisch	Mechanisch, chemisch, enzymatisch	Mechanisch, ggf. chemisch	
Mechanisch	FastPrep-Instrument: 2x 20 s, Speed 5	Vortexen mit Glaskugeln, 5 min, max. Speed	FastPrep-Instrument: 40 s, Speed 6	FastPrep-Instrument: 2x 20 s, Speed 5
Chemisch	SDS (Tensid)		Oberflächenaktive Substanz wahrscheinlich	
Enzymatisch	-	Lysozym	-	-

Die Ergebnisse zeigten, dass für die DNA-Extraktionsmethoden, die auf dem FastDNA® SPIN Kit for Soil basierten, die Anzahl der erhaltenen 16S rRNA Genkopien am höchsten war (**Abbildung 5**). Diese lässt auf eine effiziente Zellyse schließen und trifft sowohl für die Quantifizierung der archaeellen als auch der bakteriellen 16S rRNA Genkopien zu (Ausnahme Probe WHF, **Abbildung 5** und **6**).

Ein weiterer Vorteil des FastDNA® SPIN Kit for Soil ist seine einfache und zeiteffiziente Aufarbeitung des Probenmaterials, besonders im Vergleich zur DNA-Extraktionsmethode ohne Kit. Diese Methode zeigte ebenso wie die PS-Methode meist eine geringere Anzahl an 16S rRNA Genkopien und auch ein geringeres Verhältnis von archaeellen zu bakteriellen 16S rRNA Genkopien (**Abbildung 6**), was auf einen schlechteren Aufschluss der archaeellen Zellen hindeuten könnte. Eine Ausnahme stellte hierbei die Probe SBF dar (**Abbildung 6**).

Der Einfluss der DNA-Aufreinigung mittels Illustrat™ MicroSpin™ S-400 HR Columns (GE Healthcare) war nicht eindeutig. Es ließen sich sowohl positive als auch negative Effekte beobachten (**Abbildung 5**, **Abbildung 6**). Eine grundsätzliche Verwendung einer zusätzlichen DNA-Aufreinigung um PCR-Inhibierungseffekte zu vermeiden konnte von den Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

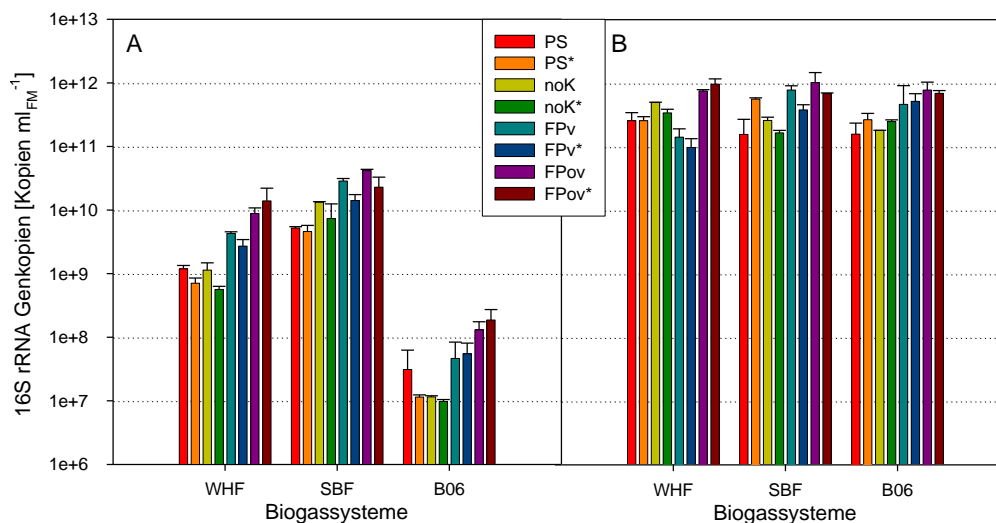


Abbildung 5: Quantifizierung des archaeellen (A) und bakteriellen (B) 16S rRNA Gens mittels qPCR (nach Yu *et al.* 2005) basierend auf vier verschiedenen DNA-Extraktionsprotokollen. PS, PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories); noK, DNA-Extraktion ohne Kit; FPv, FastDNA® SPIN Kit for Soil mit Vorwaschschritt; FPov, FastDNA® SPIN Kit for Soil ohne Vorwaschschritt; *, aufgereinigte DNA-Extrakte; WHF, wissenschaftlicher Horizontalfermenter (thermophil); SBF, Schwimmbettfermenter (mesophil); B06, Praxisanlage (mesophil).

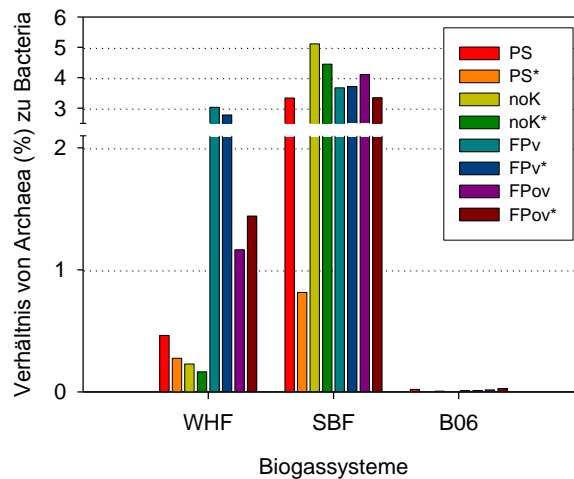


Abbildung 6: Prozentuales Verhältnis der *Archaea* zu *Bacteria* basierend auf den 16S rRNA Genkopien der **Abbildung 5**. Weitere Beschriftung der Proben entsprechend **Abbildung 5**.

Um einen Überblick über die Gleichmäßigkeit des Zellaufschlusses bei verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen zu erhalten, wurde die bakterielle Gemeinschaft mittels 16S rRNA Gen basierter TRFLP-Fingerprintmethode untersucht (**Abbildung 7**). Während die Fingerprintprofile der SBF-Proben große Ähnlichkeit unabhängig des Extraktionsprotokolls aufwiesen, konnte man bei den WHF- und B06-Proben größere Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden erkennen. Besonders das FPv-Protokoll zeigte eine erhöhte Anzahl an TRF-Fragmenten, was ggf. auf die erhöhte mechanische Belastung während des Zellaufschlusses zurückzuführen ist.

Es lässt sich somit nicht nur ein Einfluss in Abhängigkeit der Extraktionsmethode sondern auch in Abhängigkeit des untersuchten Reaktormaterials feststellen. Demzufolge kann eine Optimierung und Standardisierung der DNA-Extraktionsmethode spezifisch für bestimmtes Probenmaterial notwendig sein.

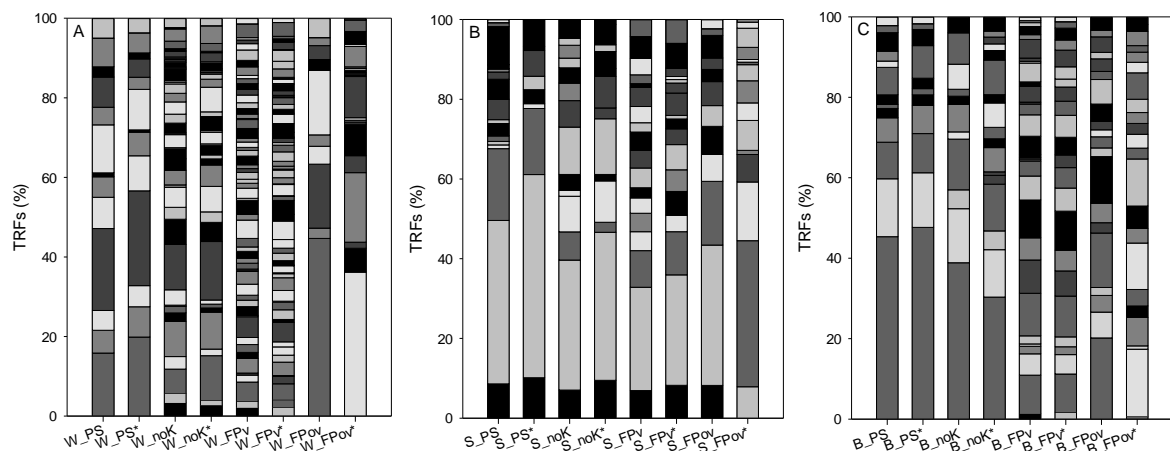


Abbildung 7: TRFLP-Fingerprints für die Domäne *Bacteria* auf Basis von Probenmaterial aus den Biogaserfermentern WHF (A), SBF (B) und B06 (C). Die dargestellten Balkendiagramme sind Mittelwerte für zwei DNA-Extrakte. Beschriftung der Proben entsprechend **Abbildung 5**.

Die höchste Anzahl an 16S rRNA Genkopien konnte unter Verwendung des FastDNA[®] SPIN Kit for Soil nachgewiesen werden, was auf eine effiziente Zelllyse schließen lässt. Deshalb wurde diese Methode anschließend für den interlaboratorischen DNA-Ringversuch genutzt (LEBUHN *et al.* 2016). Die Proben für den DNA-Ringversuch wurden aus den Biogasreaktoren der Verbundpartner LfL und ATB (je 37°C und 55°C) entnommen und an alle Verbundpartner verschickt. Von den Verbundpartnern wurde jeweils genomische DNA entsprechend dem jeweiligen laborinternen Protokoll isoliert (**Tabelle 2**) und diese anschließend allen Verbundpartnern für qPCR-Analysen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Überblick über die fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden der einzelnen Verbundpartner (DNA-Ringversuch, weitere Details zur Durchführung in LEBUHN *et al.* 2016)

	A	B	C	D	E
Verwendetes Kit	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)				Kein Kit verwendet.
Vorwaschschritt	-	Kaliumchlorid	-	-	PBS
Zelllyse	Mechanisch, ggf. chemisch				Chemisch, enzymatisch
Mechanisch	FastPrep-Instrument: 2x 20 sec, Speed 5	FastPrep-Instrument: 40 sec, Speed 6 (MP Biomedicals)	Disruptor (Scientific Industries, Inc.)	-	-
Chemisch	Oberflächenaktive Substanz wahrscheinlich				SDS
Enzymatisch	-	-	-	-	CTAB/ Pronase ϵ

Die Ergebnisse der qPCR-Analysen zeigten, dass die höchste Anzahl an Genkopien für die bakterielle 16S rRNA weitestgehend aus den Biogasreaktorproben resultierten, die mittels den Protokollen A und B aufgearbeitet wurden (**Abbildung 8**). Entsprechende qPCR-Analysen der archaeellen Gemeinschaft führten zu vergleichbaren Ergebnissen (**Abbildung 9**). Auch hier wurde die höchste Anzahl an 16S rRNA Genkopien bei Verwendung der Protokolle A und B festgestellt.

Beide Protokolle basierten auf dem FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (Hersteller MP Biomedicals), zeigten jedoch zum Teil effektive probenspezifische Optimierungsschritte, wie Vorwaschen, verschiedene Einsatzvolumina oder eine unterschiedlich starke mechanische Lyse. Aus diesem Grund wurden basierend auf dem gleichen DNA-Extraktionskit (FastDNA[®] SPIN Kit for Soil) separate Vorbehandlungs- bzw. Lyseschritte für feste, dickflüssige und flüssige Biogasproben in das standardisierte DNA-Extraktionsprotokoll (mittels FastDNA[®] SPIN Kit for Soil) integriert.

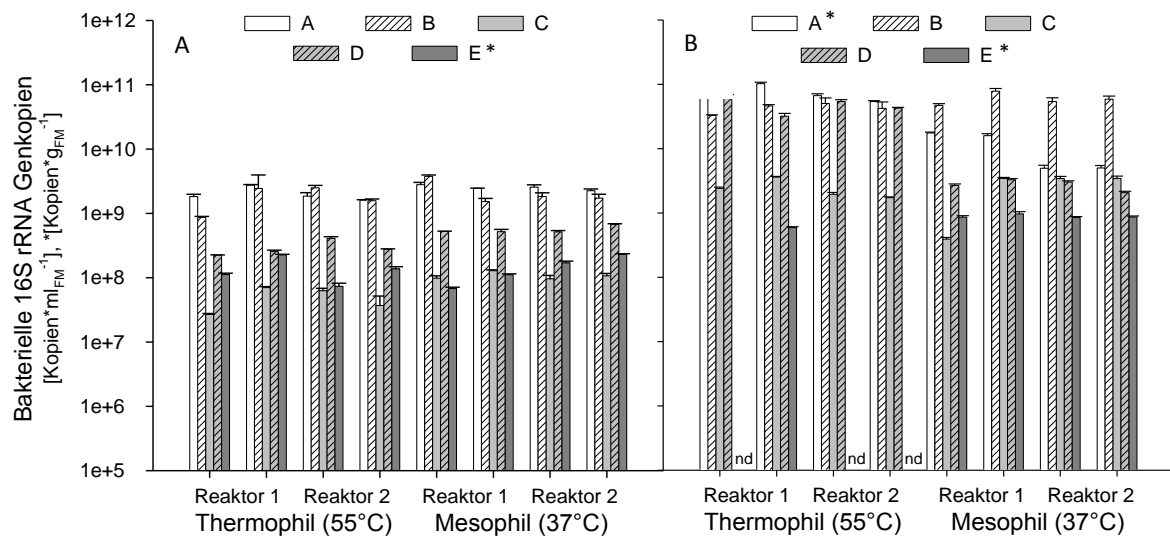


Abbildung 8: Einfluss verschiedener DNA-Extraktionsmethoden (A - E, Details siehe **Tabelle 2**) auf die Detektion der bakteriellen 16S rRNA Genkopien mittels qPCR (nach YU *et al.* 2005). Untersucht wurde Probenmaterial (je Duplikate) aus zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktoren (Verbundpartner ATB, A) und aus CSTRs (Verbundpartner LfL, B). nd, DNA-Extraktion nicht erfolgreich.

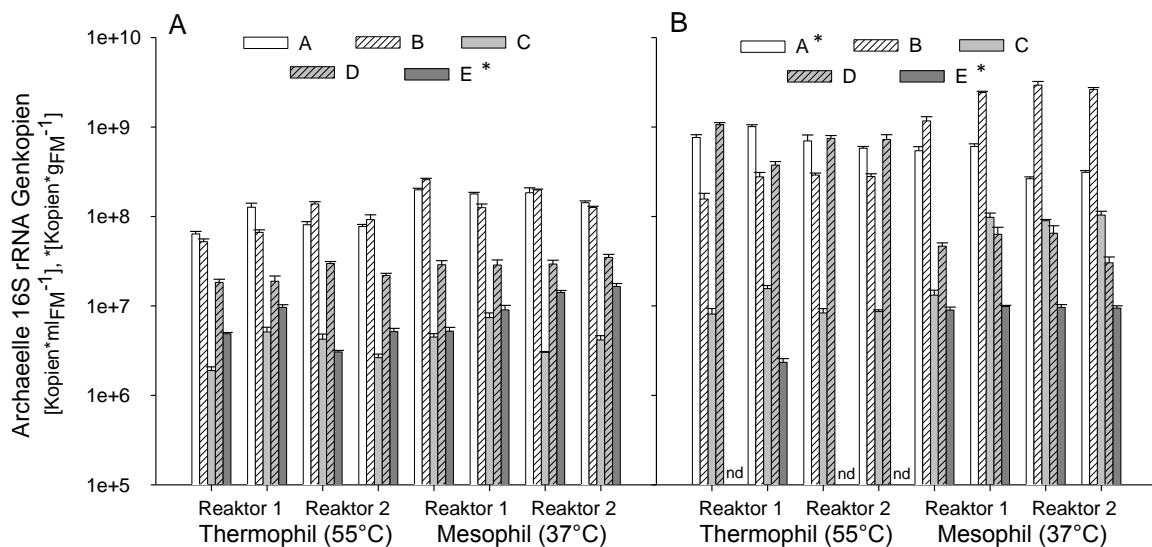


Abbildung 9: Einfluss verschiedener DNA-Extraktionsmethoden (A - E, Details siehe **Tabelle 2**) auf die Detektion der archaeellen 16S rRNA Genkopien mittels qPCR (nach YU *et al.* 2005). Untersucht wurde Probenmaterial (je Duplikate) aus zweistufigen, zweiphasigen Biogasreaktoren (Verbundpartner ATB, A) und aus CSTRs (Verbundpartner LfL, B). nd, DNA-Extraktion nicht erfolgreich.

Im Detail sahen die Änderungen wie folgt aus: Während dickflüssiges Probenmaterial, wie das aus den CSTRs des Verbundpartners LfL, vorgewaschen und nur in geringen Volumina (hier: 50 μ l) genutzt wurde, konnten für flüssige Proben aus zweiphasigen zweistufigen Anlagen (ATB) höhere Volumina eingesetzt werden (hier: 2 ml). Festes Probenmaterial, wie Gärrestmaterial aus zweiphasigen, zweistufigen Anlagen, konnte dagegen direkt (hier: 200 - 300 mg) und ohne Vorbehandlung eingesetzt werden.

Eine weitere Anpassung stellte die Reduzierung der Intensität der mechanischen Zellyse bei den flüssigen und festen Proben dar (von 40 s bei Intensität 6.0 auf 2 x 20 s bei Intensität 5.0) um eine physische Scherung der mikrobiellen DNA zu vermindern. Zusätzlich wurde der im Protokoll vorhandene Waschschrift mit Puffer SEWS zweimal durchgeführt um den Reinheitsgrad der Proben zu erhöhen. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (FastDNA® SPIN Kit for Soil, Hersteller MP Biomedicals). Diese Änderungen in den Protokollen führten zu DNA-Extraktionsergebnissen, die hinsichtlich der Quantität und Qualität den Ansprüchen der nachgeschalteten Analysen genügten.

In einem weiteren Ringversuch wurde die Effizienz von verschiedenen Konservierungsmethoden für eine nachgeschaltete RNA-Extraktion untersucht. Dies ist besonders dann von Interesse, wenn es um die Beprobung und Analyse von Praxisbiogasanlagen geht. Hier ist es oftmals nicht möglich unmittelbar nach der Probenahme mit der Aufbereitung der Proben zu beginnen, so dass eine geeignete Konservierung, besonders im Falle einer anschließenden RNA-basierten Analyse, zwingend notwendig ist.

Für diesen Ansatz wurde Material aus den beim Verbundpartner ATB betriebenen zweiphasigen zweistufigen Biogasreaktorsystemen (mesophil und thermophil) entnommen und mit vier verschiedenen Methoden konserviert: (1) Schockgefrierung in Flüssigstickstoff (N₂), (2) Gefrieren bei -80°C, (3) Konservierung mittels RNAlater® und (4) Fixierung mittels Formaldehyd. Die Proben wurden anschließend auf Trockeneis zu dem Verbundpartner LfL versendet um dort die mikrobielle RNA mit Hilfe des FastRNA Pro™ Soil - Direct Kits (MP Biomedicals) zu extrahieren und eine cDNA-Synthese mittels eines Kits von Agilent Technologies (AffinityScript™ Multiple Temperature Reverse Transcriptase Kit) durchzuführen (weitere Details zur Durchführung siehe LEBUHN *et al.* (2016)). Die so gewonnene cDNA wurde anschließend dem ATB für nachfolgende Analysen zur Verfügung gestellt.

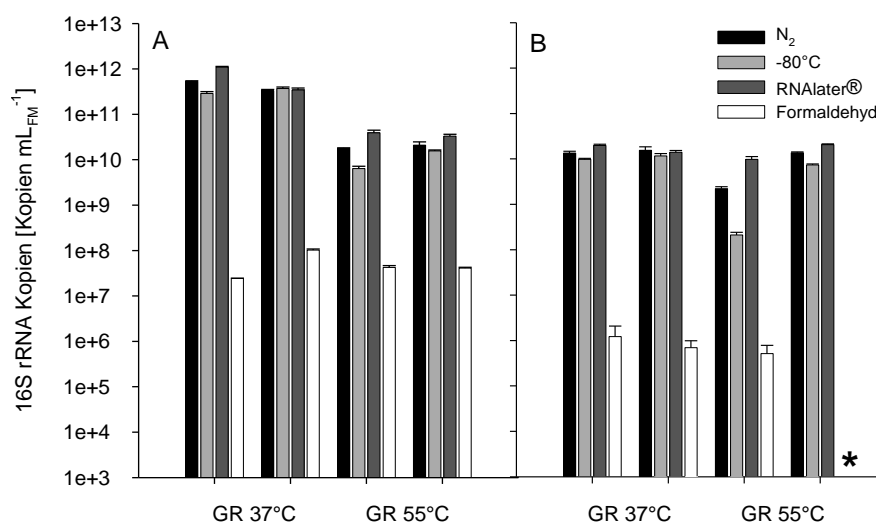


Abbildung 10: Einfluss der RNA-Konservierung auf die RNA-Stabilität ermittelt durch Quantifizierung der Kopienzahl für das bakterielle (A) und archaeelle (B) 16S rRNA Gen mittels qPCR. GR, Gärrest der Fermentation bei 37°C und 55°C (Bestimmung jeweils in Duplikaten); *, Kopienzahl unterhalb des Detektionslimits.

Die Ergebnisse der Bestimmung der bakteriellen und archaeellen 16S rRNA Genkopienzahl zeigten deutlich, dass die Fixierung mit Formaldehyd für eine Wahrung der RNA-Stabilität, unabhängig vom Probenmaterial, nicht geeignet ist (**Abbildung 10**).

Die drei anderen Konservierungsmethoden zeigten dagegen deutlich bessere Ergebnisse. Die Fixierung mit RNAlater[®] führte in den meisten Fällen zu einer erhöhten Anzahl an detektierten 16S rRNA Kopien, insbesondere im Falle des Probenmaterials aus den Biogasreaktoren, die bei 55°C betrieben wurden. Auch andere Studien belegen, dass die Verwendung von RNAlater[®] zur RNA-Konservierung gut geeignet ist (BACHOON *et al.* 2001, MUTTER *et al.* 2004, VAN EIJSDEN *et al.* 2013). Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Konservierung mit RNAlater[®] für Biogasproben zu empfehlen, sofern eine zeitversetzte RNA-Extraktion vorgesehen ist. Im Rahmen dieses Vorhabens wurde dementsprechend diese Konservierungsmethode auch für alle Proben, die für eine spätere RNA-Analyse herangezogen werden sollten, angewandt.

Neben den Versuchen zur RNA-Konservierung wurden im Zuge der Bereitstellung von RNA für die Transkriptomanalyse (AP 4.1) verschiedene Strategien zur RNA-Extraktion aus Biogasproben getestet. Für die Extraktion der RNA musste das beim Verbundpartner CeBiTec etablierte Protokoll für große Probenvolumina (RNeasy[®] Midi Kit, Hersteller: Qiagen) speziell an das vorhandene Probenmaterial von Verbundpartner ATB angepasst bzw. variiert werden. Zur Optimierung wurden in Zusammenarbeit mit dem Partner CeBiTec u.a. folgende Ansätze verfolgt: (1) Tests weiterer Extraktions-Kits, wie zum Beispiel RNeasy[®] Mini Kit (Hersteller: Qiagen) und FastRNA ProTM Soil-Direct Kit (Hersteller MP Biomedicals), (2) Variation der Probeneinsatzmenge sowie Filtration des Probenmaterials zur Reduzierung von Verunreinigungen, (3) Optimierung des mechanischen Aufschlusses für eine optimale Zellyse ohne RNA-Degradation. Des Weiteren wurden nach Abschluss der RNA-Extraktion verschiedene DNasen getestet um einen optimalen Verdau der restlichen in der RNA-Probe enthaltenen DNA zu gewährleisten.

Abschließend wurde die RNA mittels des RNeasy[®] Mini Kits (Hersteller Qiagen) mit direkter Probenzugabe in Lysing Matrix E Tubes (Hersteller MP Biomedicals) extrahiert (verändert nach ZOETENDAL *et al.* (2006) und ZAKRZEWSKI *et al.* (2012)). Hierfür wurde das Probenmaterial (300 mg Gärrest) mit saurem Phenol im Lysing Matrix E Tube für 2 x 20 s (Speed 5) im FastPrep Instrument aufgeschlossen. Nach der Extraktion wurde die ggf. verbliebene DNA mittels des Turbo DNA-free[®] Kits (Hersteller Ambion, Thermo Fisher Scientific) entfernt.

Das oben beschriebene, verwendete RNA-Extraktionsprotokoll funktionierte für dickflüssiges Probenmaterial aus CSTRs leider nicht zufriedenstellend, weshalb kein für alle Projektpartner bzw. Probentypen einheitliches RNA-Extraktionsprotokoll etabliert werden konnte.

II.1.3 Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern für wichtige an der Biomethanisierung beteiligte taxonomische Einheiten (AP 3.1)

Für dieses Arbeitspaket sollten bestehende molekulare Markersysteme für die Quantifizierung von Bakterien und methanogenen Archaea (nach Yu *et al.* 2005) optimiert sowie weitere Marker auf Basis des 16S rRNA Gens für besonders prozessrelevante Mikroorganismen entwickelt werden.

Zunächst wurde mit der Optimierung und Anwendung der qPCR-Ansätze nach Yu *et al.* (2005) begonnen. Hierfür wurden zum Teil die bestehenden Amplifikationszeiten verkürzt, Volumina des Ansatzes reduziert sowie der Einsatz neuer Chemikalien (zum Beispiel Mastermix) geprüft. Die Details der entwickelten bakteriellen und archaeellen qPCR-Assays sind in einer Veröffentlichung des Verbundvorhabens dargestellt (LEBUHN *et al.* 2016).

Des Weiteren wurde im Hinblick auf die spätere Entwicklung von Markern eine Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Biogasreaktorsystemen durchgeführt. Diese Informationen bildeten eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von Markern für prozessrelevante Mikroorganismen im zweiphasigen zweistufigen Biogassystem bei 37°C und 55°C. Besonders im Fokus standen hierbei die am anaeroben Abbau von Grassilage beteiligten bakteriellen Gruppen wie *Clostridia*, *Bacteroidetes* und *Bacilli*.

Um zunächst einen Überblick über die bakterielle Gemeinschaft und deren dynamische Veränderung bzw. Entwicklung zu erhalten, wurde sowohl das Inokulum als auch das Perkolat aus verschiedenen Versuchsreihen (VR1 - VR32, **Abbildung 11** und **12**) untersucht. Hierfür wurden folgende Versuchsreihen innerhalb der verschiedenen Abschnitte der Gesamtversuchslaufzeit ausgewählt: (1) Startphase VR1 - VR5, (2) Einsatz von 500 g Grassilage VR6 - VR19, (3) Einsatz von 1.500 g Grassilage VR20 - VR29, (4) NH₄⁺-Erhöhung VR30 - VR32.

Für den Temperaturbereich von 37°C zeigten sich innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft über die Versuchslaufzeit von ca. 900 Tagen zum Teil deutliche Veränderungen (**Abbildung 11**). Erste deutliche Unterschiede im Vergleich zum Inokulum (= Startzeitpunkt) waren bereits nach vier Wochen (**Abbildung 11**, VR1) zu erkennen. Dieses spiegelte vermutlich die Anpassung der im Inokulum vorhandenen bakteriellen Gemeinschaft an die im Reaktorsystem vorherrschenden Bedingungen wieder.

Im weiteren Verlauf der Startphase über einen Gesamtzeitraum von 140 Tagen zeigten sich weitere Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft. Während der sich anschließenden Phase mit gleichbleibender Substratlast von 500 g Grassilage veränderte sich die bakterielle Gemeinschaft weniger deutlich. Erst bei erneuter Steigerung der Substratlast zeigte sich eine weitere Veränderung in der bakteriellen Gemeinschaft. Besonders deutlich wurde dies ab Versuchsreihe VR23.

Trotz der Verschiebung in der bakteriellen Gemeinschaft sanken die Methanerträge über den gesamten Zeitraum nicht ab und lagen zwischen 300 - 356 L_N kg_{OTS}⁻¹. Ab VR30 zeitgleich mit der Erhöhung des NH₄⁺-Gehalts sanken die Methanausbeuten um ca. 10% im Vergleich zur letzten Versuchsreihe ohne künstliche NH₄⁺-Anreicherung

(= VR29) ab, was auf eine Störung der Stoffwechselfvorgänge im Biogasreaktorsystem hindeutet. Trotz dessen waren die Veränderungen in den TRFLP-Profilen der bakteriellen Gemeinschaft der VR30 noch gering. Deutlichere Unterschiede zeigten sich zeitverzögert erst ab VR32.

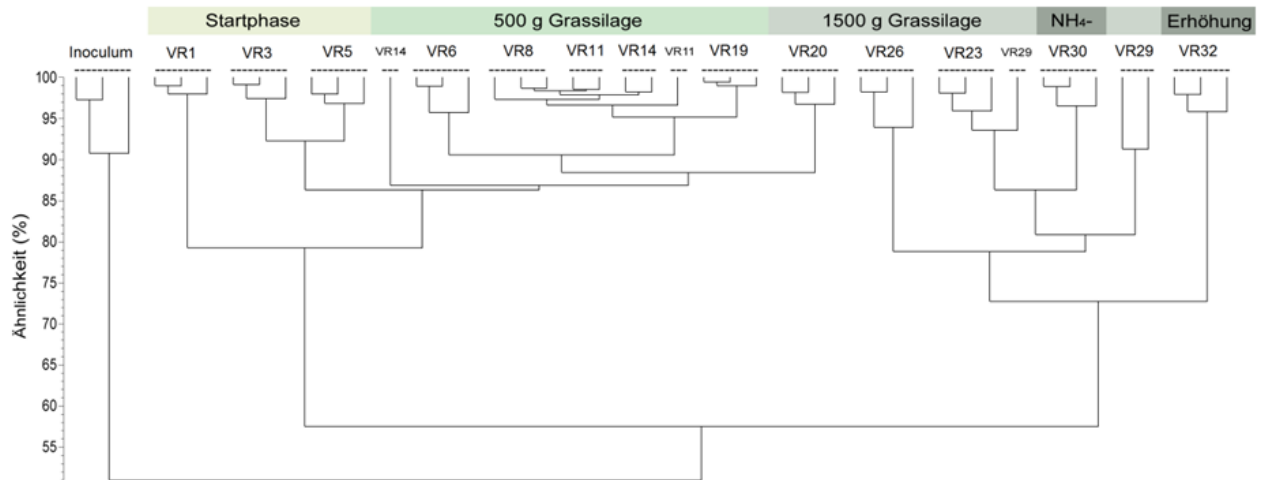


Abbildung 11: Prozentuale Ähnlichkeiten der bakteriellen TRFLP-Profile über die gesamte Versuchslaufzeit (VR1 - VR32) des bei 37°C betriebenen Reaktorsystems. Beprobte wurde jeweils das Perkolat des Hydrolysereaktors am Ende der jeweiligen Versuchsreihe (Tag 28). Ähnlichkeiten der TRFLP-Profile wurden mittels einer Pearson-Korrelation (Ähnlichkeitskoeffizient, Optimierung 0,5%) und UPGMA Clusteranalyse bestimmt (BioNumerics, Applied Math).

Für den bei 55°C betriebenen thermophilen Biogasreaktor zeigten sich ebenfalls über einen Zeitraum von ca. 900 Tagen, vor allem zu Beginn und am Ende dieses Zeitraums, deutliche Veränderungen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft (**Abbildung 12**). Während der Startphase ließ sich dies ebenfalls auf die Anpassung der im Inokulum (37°C) vorhandenen bakteriellen Gemeinschaft an die im Reaktorsystem vorherrschende im Vergleich zu mesophilen Reaktoren deutlich höhere Temperatur (55°C) zurückführen. Zum Ende des Versuchszeitraums war vermutlich die erhöhte Konzentration von NH_4^+ im System ursächlich.

Zwischenzeitlich, d. h. bei einer gleichbleibenden Substratlast von 500 g Grassilage, sowie darüber hinaus bis Versuchsreihe VR 26 stellte sich im Reaktorsystem bei 55°C eine vergleichsweise konstante bakterielle Gemeinschaft ein. Wie bei 37°C waren über diesen Zeitraum relativ konstante Methanausbeuten mit 321 bis 356 $\text{L}_\text{N} \text{ kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ zu verzeichnen. Diese sanken jedoch ebenfalls im Vergleich zu VR29 ab VR30 und zeitgleich mit der Erhöhung des NH_4^+ -Gehalts um ca. 15% ab. Deutlich war dies auch bei den Methanbildungsraten zu A

erkennen, die bei 55°C im Gegensatz zu vorherigen Versuchsreihen deutlich verzögert erst nach ca. 11 bis 16 Tagen ihr Maximum erreichten. Bei vorherigen Versuchsreihen lag das Maximum dagegen innerhalb der ersten 10 Tage (**Abbildung 4**). Zudem kam es im letzten Abschnitt der Gesamtversuchslaufzeit (ab VR30) zu einer Akkumulation

von Propionsäure, die auch über einen Zeitraum von 28 Tagen nicht mehr von den Mikroorganismen vollständig abgebaut bzw. umgewandelt werden konnte.

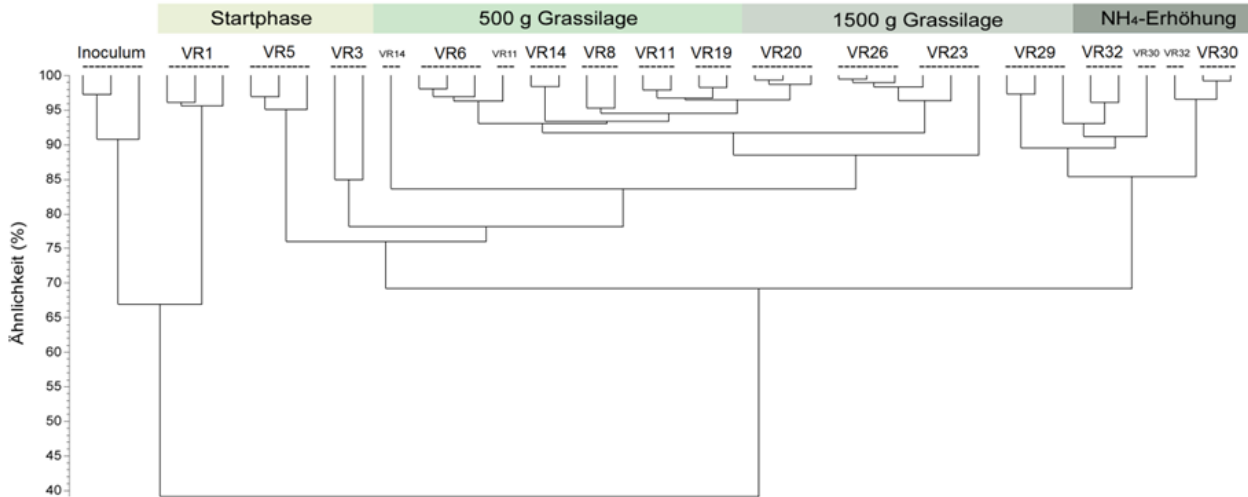


Abbildung 12: Prozentuale Ähnlichkeiten der bakteriellen TRFLP-Profile über die gesamte Versuchslaufzeit (VR1 - VR32) des bei 55°C betriebenen Reaktorsystems. Beprobte wurde jeweils das Perkolat des Hydrolysereaktors am Ende der jeweiligen Versuchsreihe (Tag 28). Ähnlichkeiten der TRFLP-Profile wurde mittels einer Pearson-Korrelation (Ähnlichkeitskoeffizient, Optimierung 0,5%) und UPGMA Clusteranalyse bestimmt (BioNumerics, Applied Math).

Für eine detaillierte Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Biogasreaktorsystemen wurden außerdem bakterielle und archaeelle 16S rRNA Gensequenzbibliotheken von verschiedenen Versuchsreihen erstellt. Mit Hilfe der vorangegangenen TRFLP-Analysen wurden die Versuchsreihen ausgewählt, die ein repräsentatives Bild für den Zeitraum mit geringer Substratlast (Einsatz von 500 g Grassilage, VR11) und hoher Substratlast (Einsatz von 1.500 g Grassilage, VR23) darstellen. Zusätzlich dazu wurde als Vergleich das Start-inokulum untersucht. Dieses Inokulum stammt aus einer Pilotanlage des Projektpartners LfL, die mit Rindergülle und einer totalen Mischration (hauptsächlich Gras- und Maissilage mit Heu, Stroh, Soja und Kraffutter) operiert.

Im Inokulum, welches vom Verbundpartner LfL bereitgestellt wurde, wurden vor allem Vertreter der *Firmicutes* (88%) und der *Bacteroidetes* (10%) detektiert (**Abbildung 13 A**). Für den Stamm *Firmicutes* wurden vor allem *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae* und *Ruminococcaceae* nachgewiesen. Darüber hinaus fanden sich aber auch viele Sequenzen, die keiner Familie innerhalb der *Firmicutes* zugeordnet werden konnten.

Die archaeelle Gemeinschaft im Inokulum bestand vor allem aus *Euryarchaeota* (93%) sowie aus einem kleinen Anteil an *Crenarchaeota* (7%, **Abbildung 13 B**). Innerhalb der *Euryarchaeota* wurden vor allem *Methanobacteriaceae* sowie *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*) und *Methanomicrobiaceae*, aber auch weitere Familien identifiziert.

Beide 16S rRNA Gensequenzbibliotheken wiesen eine ausreichend hohe bakterielle und archaeelle Diversität auf, so dass das untersuchte Inokulum als eine gute Grundlage für den Start der vier Reaktorsysteme angesehen wurde.

Nach der Startphase wurde sowohl während des konstanten Betriebs bei einer Substratlast von 500 g Grassilage (VR11) sowie während des Betriebs mit einer erhöhten Substratlast von 1.500 g Grassilage (VR23) Perkolat aus dem HR am zweiten Versuchstag entnommen und die darin enthaltene bakterielle Gemeinschaft untersucht. Das Perkolat des zweiten Versuchstages wurde ausgewählt, weil hier die Konzentration der gebildeten Gärsäuren am höchsten war, was einen aktiven anaeroben Abbauprozess der Grassilage vermuten lässt.

Im Reaktorsystem betrieben bei 37°C zeigte sich bei einer Substratlast von 500 g (VR11), dass 50% der Sequenzen den *Firmicutes*, 25% den *Bacteroidetes*, 11% den Proteobacteria und 6% den *Cloacimonetes* zugeordnet wurden (**Abbildung 14 A**). Innerhalb der *Firmicutes* dominierten die Familien *Clostridiaceae* (13%), *Ruminococcaceae* (10%), *Lachnospiraceae* (9%) und *Peptostreptococcaceae* (5%). Innerhalb der *Bacteroidetes* dominierten neben einer hohen Anzahl an nicht klassifizierbaren Sequenzen die Familien *Prevotellaceae* (6%) und *Porphyromonadaceae* (4%).

Bei einer erhöhten Substratlast von 1.500 g Grassilage (VR23) verschob sich das Verhältnis deutlich zugunsten der *Bacteroidetes*, die mit einem prozentualen Anteil von 43% detektiert wurden (**Abbildung 14 B**). Der Anteil an *Firmicutes* sank im Vergleich zu den Ergebnissen der VR11 auf 44%. Weiterhin dominierten innerhalb dieses Phylums die *Clostridiaceae* (9%), *Lachnospiraceae* (8%) und *Ruminococcaceae* (5%). Innerhalb der *Bacteroidetes* nahmen neben den nicht klassifizierbaren Sequenzen die prozentualen Anteile der *Prevotellaceae* (13%) und *Porphyromonadaceae* (12%) deutlich zu.

Im Gegensatz zum Reaktorsystem bei 37°C wurden in dem thermophilen System bei 55°C keine Vertreter der *Bacteroidetes* detektiert. Hier dominierten sowohl bei geringer (500 g, VR11) als auch bei höherer Substratlast (1.500 g, VR23) Vertreter der *Firmicutes* mit einem prozentualen Anteil von 93% (VR11) bzw. 89% (VR23, **Abbildung 15**). Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Versuchsreihen war jedoch innerhalb der *Firmicutes* zu erkennen. Während bei geringer Substratlast vor allem *Defluviitaleaceae* (37%), *Ruminococcaceae* (15%) und nicht näher klassifizierbare *Firmicutes* dominierten, zeigte sich bei höherer Substratlast ein deutlicher Rückgang des Anteils an *Defluviitaleaceae* auf 2% und an *Ruminococcaceae* auf 10%. Ein deutlicher Anstieg hingegen ergab sich für die nichtklassifizierbaren Sequenzen auf einen prozentualen Anteil von 39%. Weitere Familien innerhalb der *Firmicutes*, die an Dominanz gewannen, waren zum Beispiel *Clostridiaceae* (von 8% auf 11%) und *Lachnospiraceae* (von 6% auf 9%).

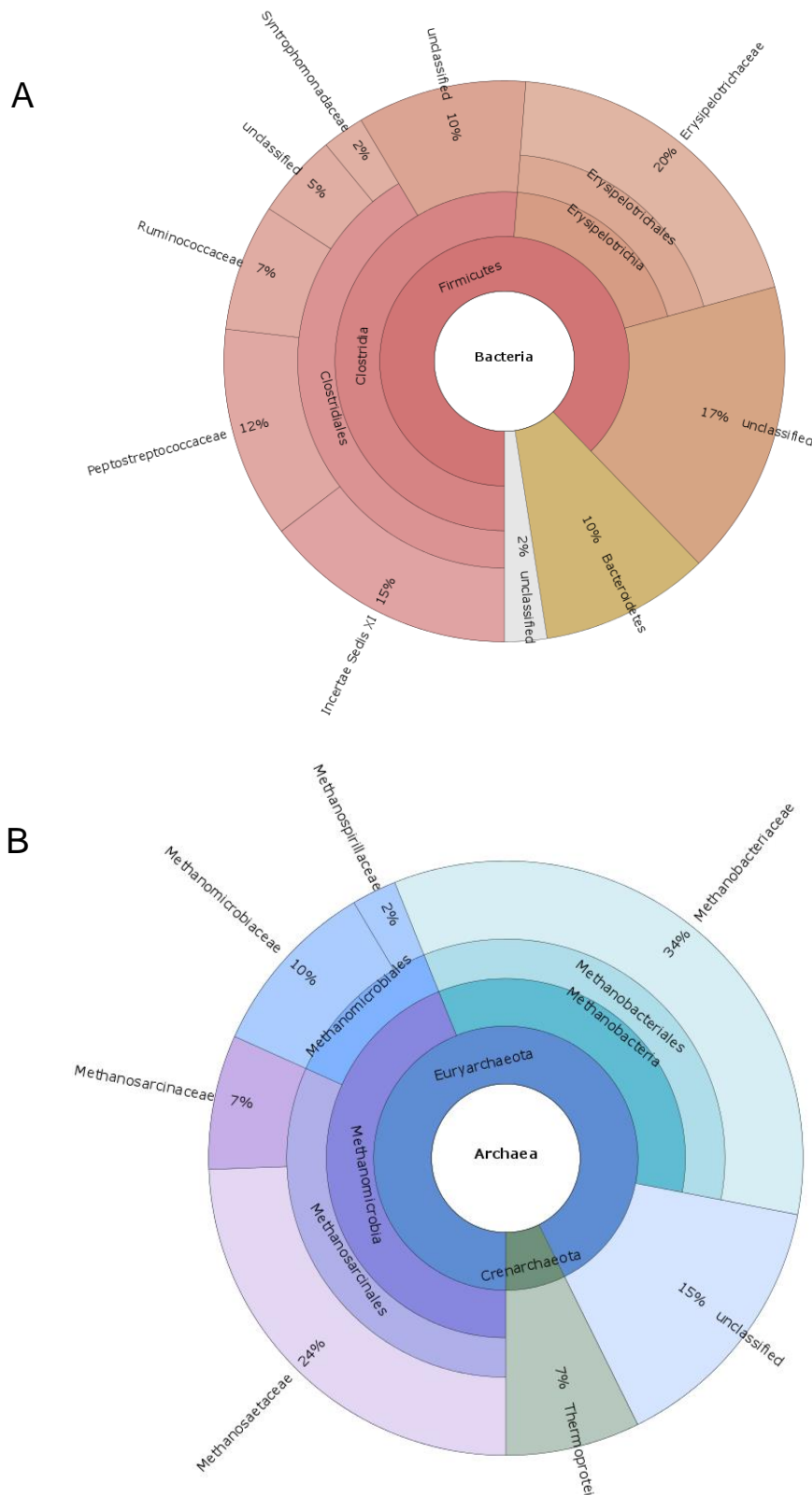


Abbildung 13: Vergleich der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Gemeinschaft im Inokulum, welches als Perkolat in den zweiphasigen zweistufigen Biogasreaktoren eingesetzt wurde. Die Ergebnisse basieren auf einer bakteriellen und archaeellen 16S rRNA Gensequenzbibliothek mit jeweils 41 ausgewerteten Sequenzen (Coverage: 88% Bacteria bzw. 90% Archaea (GOOD 1953)).

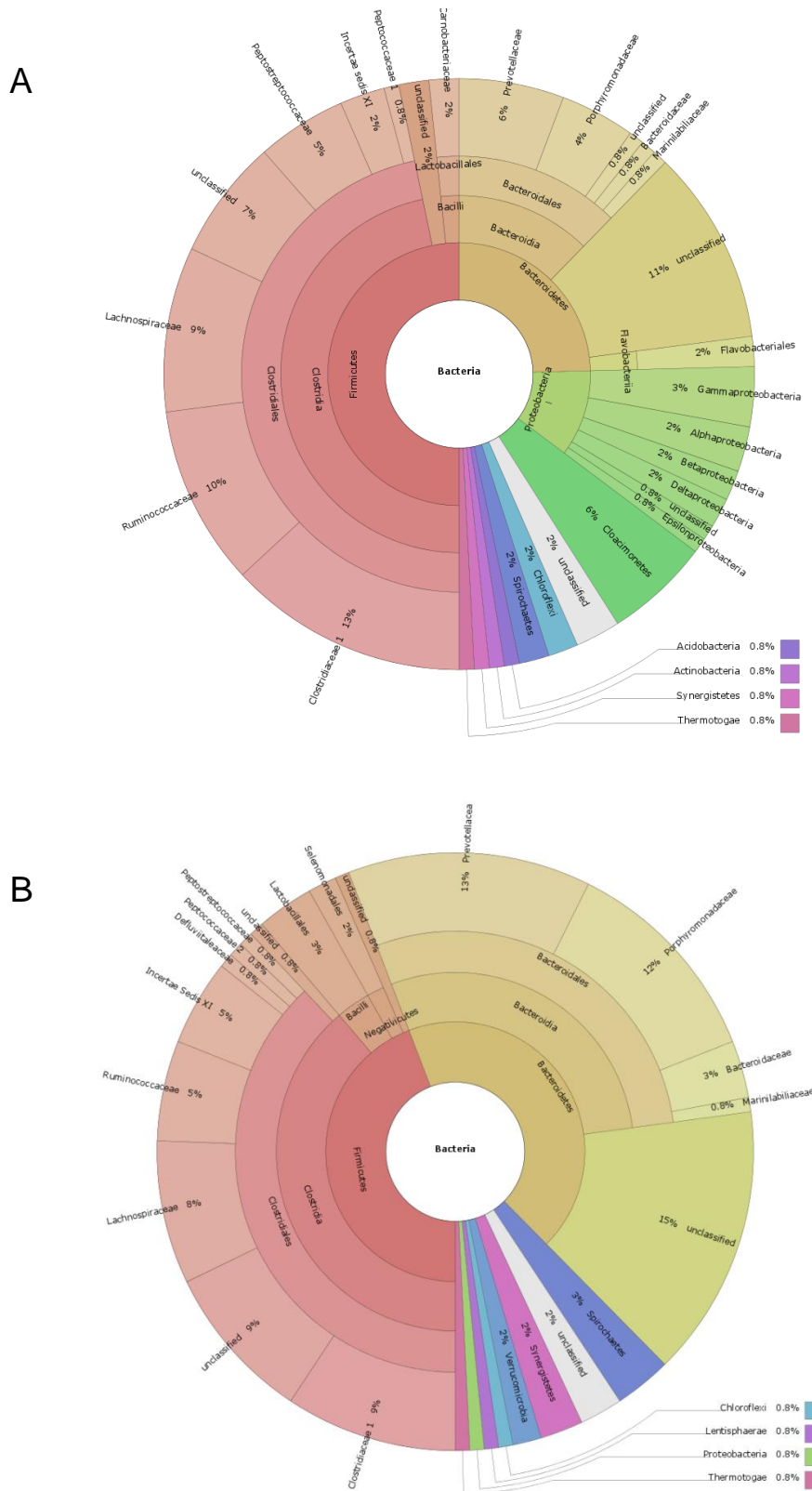


Abbildung 14: Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft (37°C) bei konstanter Fermentation von 500 g Grassilage (A; VR11, Tag 310 der Gesamtversuchslaufzeit) und 1.500 g (B; VR23, Tag 619 der Gesamtversuchslaufzeit). Untersucht wurde die Prozessflüssigkeit jeweils am zweiten Fermentationstag. Die Ergebnisse basieren auf bakteriellen 16S rRNA Gensequenzbibliothek mit 122 (VR11) bzw. 129 (VR23) Sequenzen (Coverage: 54% VR11 bzw. 63% VR23 (GOOD 1953)).

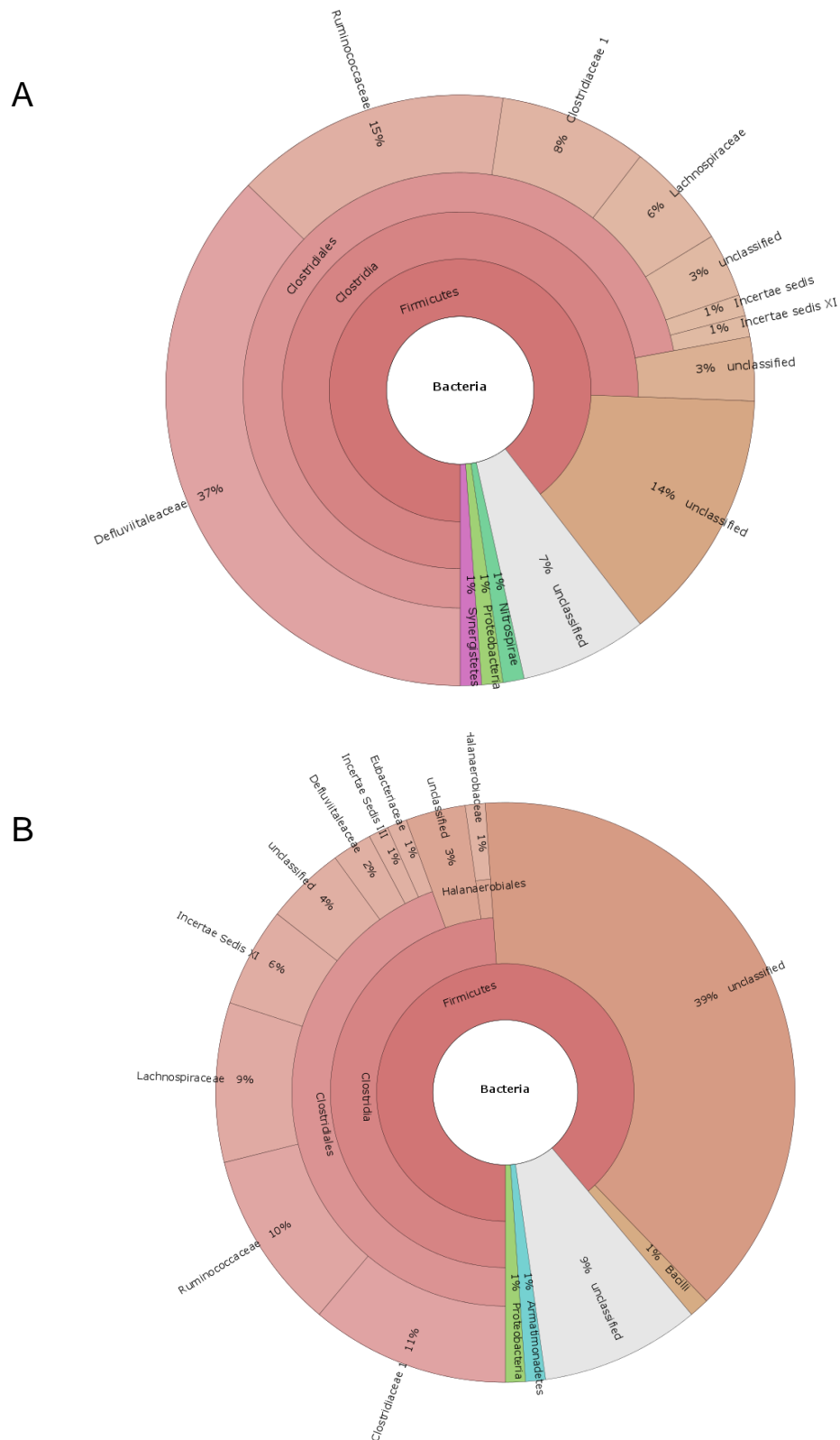


Abbildung 15: Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft (55°C) bei konstanter Fermentation von 500 g (A; VR11, Tag 310 der Gesamtversuchslaufzeit) und 1.500 g Grassilage (B; VR23, Tag 619 der Gesamtversuchslaufzeit). Untersucht wurde die Prozessflüssigkeit jeweils am zweiten Fermentationstag. Die Ergebnisse basieren auf bakteriellen 16S rRNA Gensequenzbibliothek mit 86 (VR11) bzw. 90 (VR23) Sequenzen (Coverage: 85% VR11 bzw. 63% VR23 (Good 1953)).

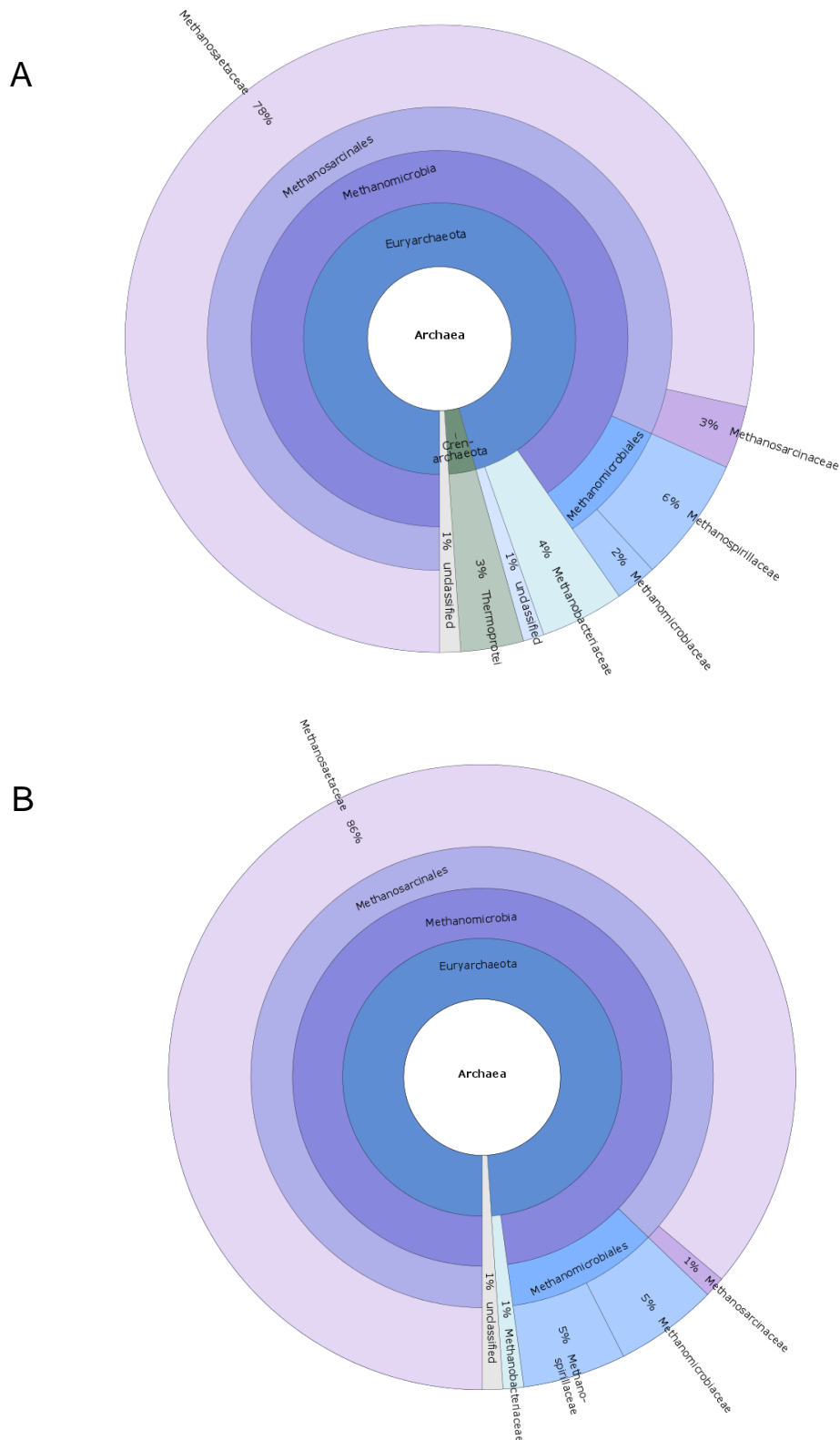


Abbildung 16: Vergleich der archaeellen Gemeinschaft auf Füllköpern des Anaerobfilters (37°C) bei konstanter Fermentation von 500 g (A; VR11, Tag 336 der Gesamtversuchslaufzeit) und 1.500 g Grassilage (B; VR23, Tag 645 der Gesamtversuchslaufzeit). Untersucht wurden jeweils Proben von Versuchstag 28. Die Ergebnisse basieren auf archaeellen 16S rRNA Gensequenzbibliothek mit 93 (VR11) bzw. 95 (VR23) Sequenzen (Coverage: 90% VR11 bzw. 92% VR23 (GOOD 1953)).

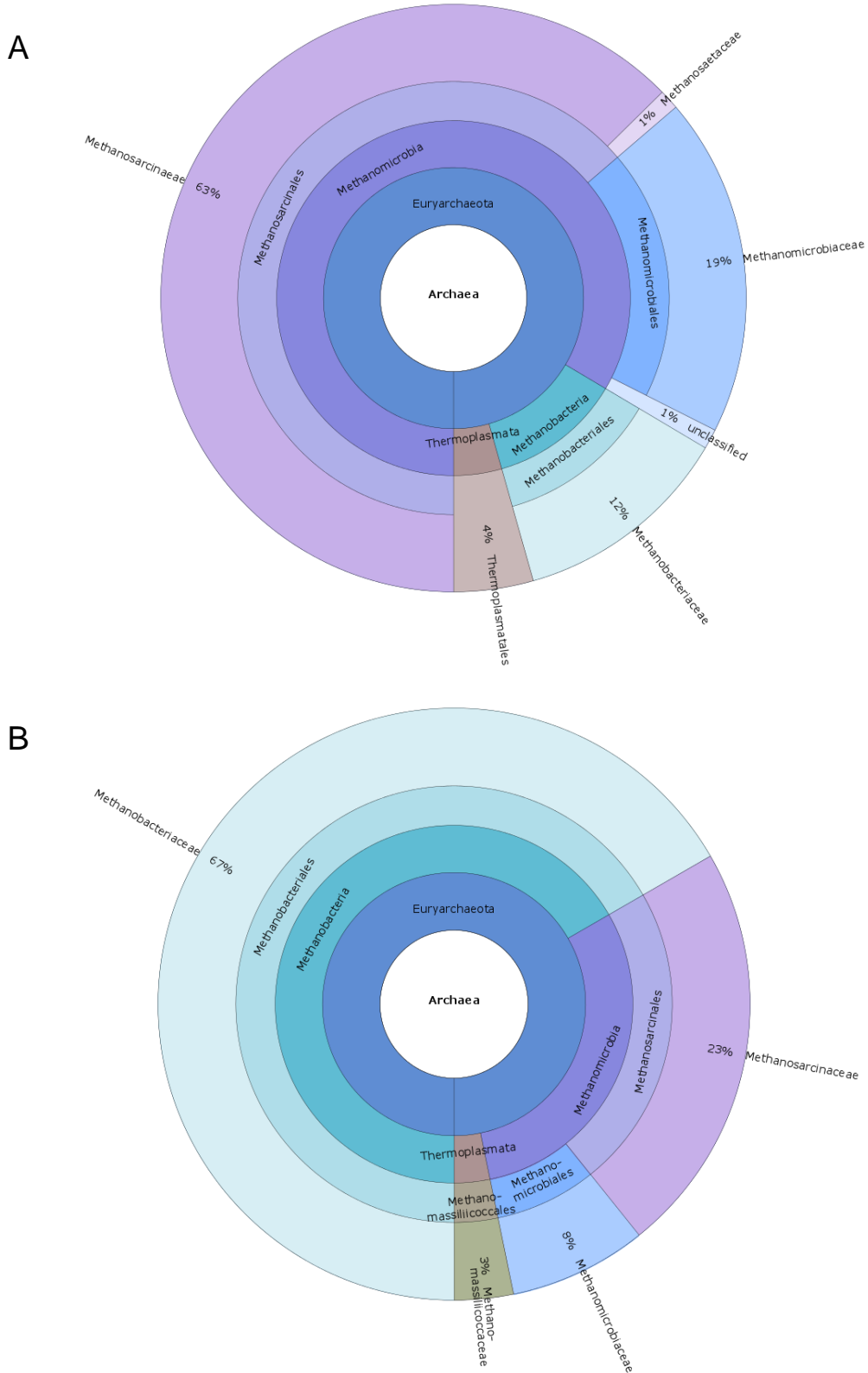


Abbildung 17: Vergleich der archaeellen Gemeinschaft auf Füllköpern des Anaerobfilters (55°C) bei konstanter Fermentation von 500 g (A; VR11, Tag 336 der Gesamtversuchslaufzeit) und 1.500 g Grassilage (B; VR23, Tag 645 der Gesamtversuchslaufzeit). Untersucht wurden jeweils Proben von Versuchstag 28. Die Ergebnisse basieren auf archaeellen 16S rRNA Gensequenzbibliothek mit 91 (VR11) bzw. 93 (VR23) Sequenzen (Coverage: 92% VR11 bzw. 97% VR23 (GOOD 1953)).

Zusätzlich zu der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft wurde auch die Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft charakterisiert. Hierfür wurde jeweils ein Füllkörper zum Ende einer Versuchsreihe bei einer Substratlast von 500 g (VR11) und 1.500 g Grassilage (VR23) entnommen und untersucht. Die Füllkörper im Anaerobfilter wurden für diese Analyse ausgewählt, da sich hier der methanogene Biofilm etabliert hatte, der wesentlich für das im Anaerobfilter generierte Methan verantwortlich war.

Für die Füllkörper des Reaktorsystems bei 37°C ergab sich sowohl bei VR11 als auch bei VR23 eine starke Dominanz der *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*) mit prozentualen Anteilen von 78% (VR11) bzw. 86% (VR23, **Abbildung 16**). Daneben traten mit deutlich kleineren Anteilen in beiden Versuchsreihen auch Vertreter der *Methanospirillaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae* und *Methanosarcinaceae* auf. Zusätzlich hierzu wurden bei der VR11 Vertreter der *Thermoprotei* (*Crenarchaeota*) detektiert, was zu einem späteren Versuchszeitpunkt (VR23) nicht mehr möglich war.

Im Reaktorsystem bei 55°C zeigte sich dagegen ein deutlich anderes Bild (**Abbildung 17**). Während bei geringer Substratlast (500 g, VR11) Vertreter der *Methanosarcinaceae* mit 63%, gefolgt von *Methanomicrobiaceae* (19%) und *Methanobacteriaceae* (12%), dominierten, waren bei höherer Substratlast (1.500 g, VR23) vor allem Vertreter der *Methanobacteriaceae* (67%), gefolgt von *Methanosarcinaceae* (23%) und *Methanomicrobiaceae* (8%), zu finden. Damit fand eine deutliche Verschiebung von einem *Methanosarcina* dominierten Biofilm hin zu einem *Methanothermobacter* dominierten Biofilm statt. Zusätzlich wurden in beiden Analysen Sequenzen den *Thermoplasmata* zugeordnet, bei VR11 den *Thermoplasmatales* und bei VR23 den *Methanomassiliicocaceae*.

Die bakterielle Gemeinschaft zeigte jedoch nicht nur Veränderungen über den gesamten Versuchszeitraum, sondern auch innerhalb einer 28-tägigen Fermentation einer Charge Grassilage (500 g bzw. 1.500 g). Dies wurde durch Untersuchungen der Dynamiken der bakteriellen Gemeinschaft der VR6 und VR20 mittels TRFLP-Methode bestätigt.

Bei einer Reaktortemperatur von 37°C und geringer Substratlast (VR6) zeigte sich, dass sich die TRFLP-Profile am Beginn und Ende der Versuchsreihe (Tag 0, 14, 21 und 28) am stärksten von denen zur Mitte der Fermentation (Tag 2 - 5 und 7) unterschieden, also dem Zeitraum, in dem der Abbau der Grassilage hauptsächlich stattfand und dementsprechend die höchste Konzentration an Gärsäuren gemessen wurde (**Abbildung 18 A**). Bei einer höheren Substratlast (VR20, 37°C) zeigten dagegen die TRFLP-Profile vom Start der Fermentation (Tag 0 - 3) größere Unterschiede zu den nachfolgenden und am Ende der Fermentation gemessenen TRFLP-Profilen (Tag 4 - 5, 7, 14, 21 und 28). Ab Tag 4 sank die Konzentration der Gesamtsäure langsam ab (**Abbildung 18 B**).

Mit Bezug auf die einzelnen terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) zeigte sich, dass sowohl bei geringer (VR6, 500g Grassilage) als auch bei höherer Substratlast (VR20, 1.500g Grassilage) TRFs mit identischer Basenpaarlänge detektierbar waren (**Abbil-**

dung 18), sich jedoch zum Teil deutlich im prozentualen Anteil innerhalb der unterschiedlichen TRFLP-Profilen der Versuchsreihen unterschieden.

Im Detail zeigte sich zum Beispiel für die bakterielle Gemeinschaft in der VR6, dass TRF 90 an Tag 1 von einem prozentualen Anteil von ca. 22% auf unter 15% sank und an Tag 7 wieder auf über 20% anstieg. Dies ist gegenläufig zu der erhöhten Konzentration der Gesamtessigsäure an den Versuchstagen 1 bis 4. Ein ähnliches Bild zeigte sich für das TRF 90 der VR20. Hier sank der prozentuale Anteil von ca. 33% auf ca. 11% an Tag 2, schwankte im weiteren Verlauf zwischen 9 bis 15% und stieg zum Ende der Versuchsreihe auf einen Wert von 19% an. TRF 93, welches einen prozentualen Anteil am TRFLP-Profil von ca. 4 bis 10% (VR6) bzw. von ca. 2 bis 10% (VR20) zeigte, sank zum Teil deutlich an Tag 1 bis 2 ab und stieg zum Ende der 28-tägigen Fermentation wieder an.

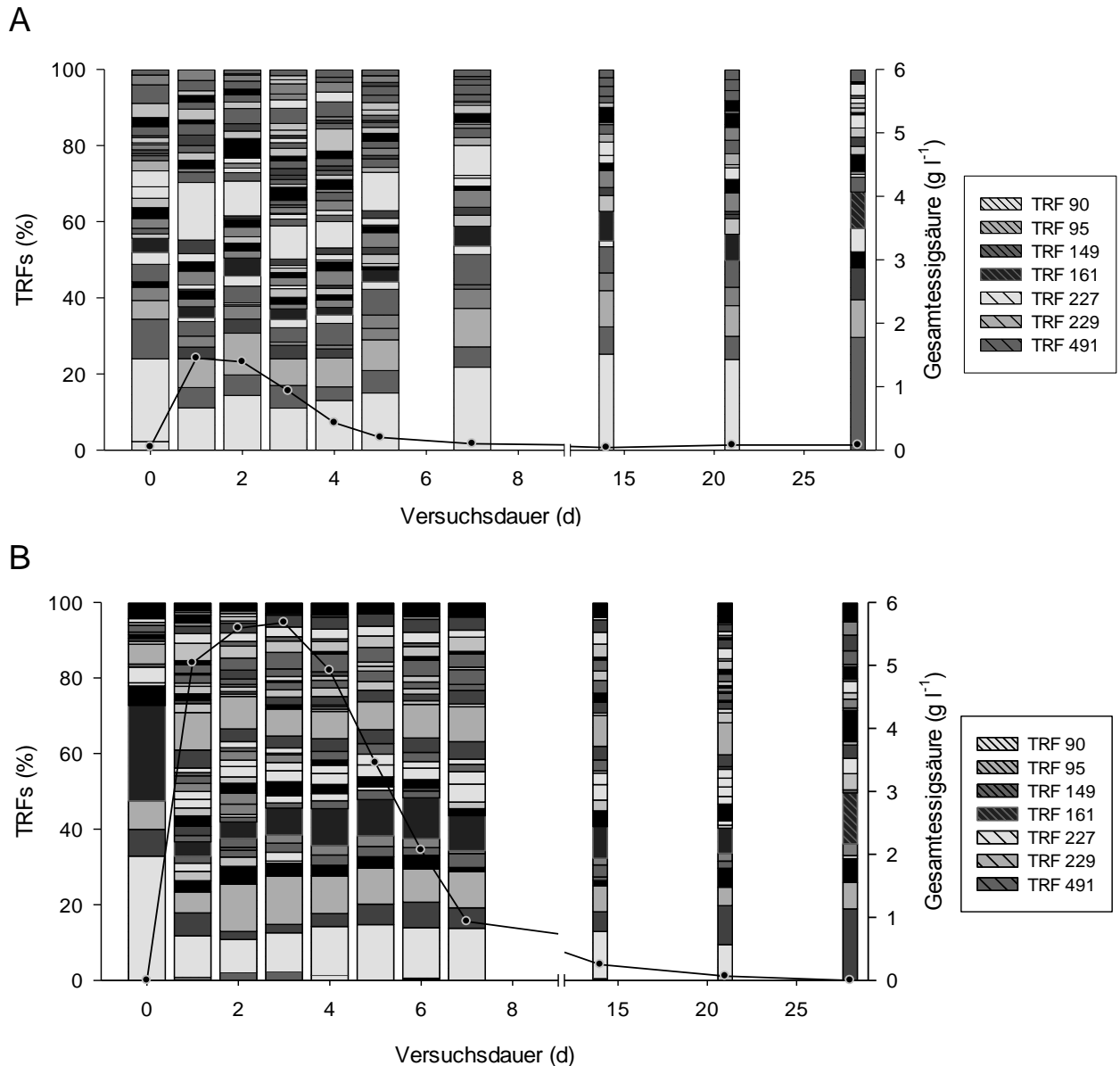


Abbildung 18: Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft im Reaktorsystem (37°C, Hydrolysereaktor) für den Verlauf einer Versuchsreihe mit einer Substratlast von 500 g Grassilage (A; VR6; Tag 168 - 196 der Gesamtversuchslaufzeit) bzw. 1.500 g Grassilage (B; VR20; Tag 525 - 553 der Gesamtversuchslaufzeit) mit zusätzlicher Darstellung der Gesamtsäuren als Essigsäureäquivalent (schwarze Linie). Percolate des jeweils ersten Hydrolysereaktors wurden mittels TRFLP-Methode und GC-Messung analysiert. Zuordnung der terminalen Restriktionsfragmente (TRFs): TRF 90, *Bacteroidetes*; TRF 95, *Bacteroidetes* (u.a. *Porphyromonadaceae*); TRF 149, *Firmicutes* (u.a. *Sedimentibacter*); TRF 161, *Cloacimonetes* (u.a. *Cand. Cloacamonas*); TRF 227, 229, *Firmicutes* (u.a. *Clostridium sensu stricto*); TRF 491, unklassifizierte *Bacteria*.

Im Gegensatz zu den TRFs, die während der ersten Woche der Fermentation an Dominanz verloren, gab es auch TRFs, die in diesem Zeitraum mit höheren prozentualen Anteilen vertreten waren. Ein Beispiel hierfür ist TRF 95, dessen prozentualer Anteil im Verlauf der Fermentation der VR6 von 5% auf 11% an Tag 2 anstieg, danach absank und im weiteren Verlauf zwischen Werten von 7 bis 10% schwankte. In VR20 stieg der Anteil von TRF 95 an Tag 2 von ca. 7% auf ca. 13% an, sank ebenfalls danach auf ca. 10% ab. Zum Ende der Fermentation betrug dessen Anteil dagegen nur noch ca. 6%.

Ein ähnlicher Verlauf ergab sich auch für TRF 227 (VR6), welches von ca. 4% auf ca. 15% an Tag 1 anstieg, danach bei Werten zwischen 7 bis 10% schwankte und an Tag 14 auf Werte unter 4% sank. TRF 227 war in VR20 weniger stark vertreten, stieg aber ebenfalls an Tag 2 von 0 auf 5%, sank danach leicht ab und schwankte dann zwischen Werten von 3 bis 5% und war an Tag 28 wieder nahe der Detektionsgrenze.

Im Vergleich zu dem Reaktorsystem bei 37°C zeigte sich in dem bei 55°C und einer geringen Substratlast betriebenen Reaktorsystem (VR6), dass sich die bakteriellen TRFLP-Profile an Tag 0 und 1 stark von denen an Tag 2 und 3, aber auch von den danach folgenden Tagen (Tag 4 - 5, 7, 14, 21 und 28) unterschieden (**Abbildung 19 A**). Die höchsten Gesamteessigsäurekonzentrationen wurden hier an den Tagen 1 bis 3 gemessen. Für das System bei 55°C und einer höheren Substratlast (VR20) zeigte sich ein einheitlicheres Bild der TRFLP-Profile, trotz einer deutlich höheren Gesamtsäurekonzentration zwischen Tag 1 und 6 (**Abbildung 19 B**). Über die gesamte Dauer der 28-tägigen Fermentation dominierten die TRFs 150 und 229, welche neben weiteren TRFs (zum Beispiel TRF 227, 303) auch bei geringerer Substratlast bereits deutlich vertreten waren.

TRF 229 stieg an Tag 1 deutlich von 11 auf 28% (VR6) bzw. von 22 auf 32% (VR20) an, verlief dann unregelmäßig und sank zum letzten Tag der Fermentation wieder ab. TRF 150 zeigte einen gegenläufigen Verlauf, in dem es in beiden Versuchsreihen von 18 auf 7% (VR6) bzw. von 22 auf 16% zunächst deutlich absank, um im weiteren Verlauf langsam wieder bis auf Werte von 21% (VR6) bzw. 40% (VR20) anzusteigen.

Die TRFs 227 (taxonomische Zuordnung nicht möglich) und 303 (*Defluviitaleaceae*), die bei VR6 noch eine wichtige Rolle spielten, waren bei der VR20 nicht oder nur noch an vereinzelten Tagen mit Anteilen unterhalb von 10% vertreten. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen der Analyse einer 16S rRNA Gensequenzbibliothek, wo eine deutliche Abnahme der Vertreter der *Defluviitaleaceae* bei einer höheren Substratlast zu verzeichnen war (**Abbildung 15**).

Sowohl bei den mesophilen als auch bei den thermophilen TRFLP-Ergebnissen sind TRFs mit einer Größe von 227 und 229 bp detektiert worden, hierbei scheint es sich jedoch nach Abgleich der entsprechenden 16S rRNA Gensequenzbibliotheken (Sequenzen von VR11 und VR23 mit *in silico* Restriktionsfragmentgrößen von 225 bis 231 bp) um unterschiedliche OTUs zu handeln (*Firmicutes*, u.a. *Clostridium sensu stricto*).

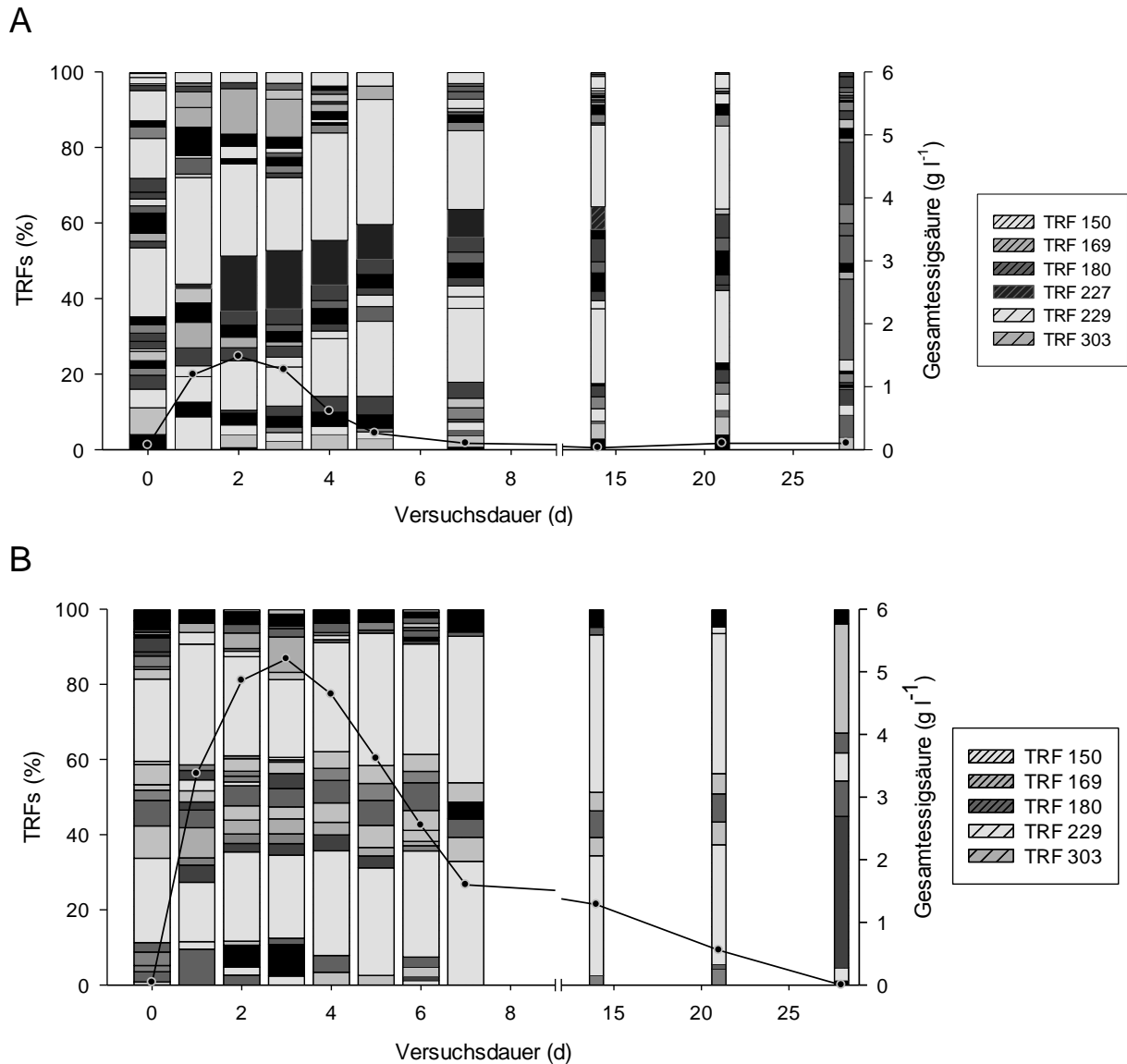


Abbildung 19: Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft im Reaktorsystem (55°C, Hydrolysereaktor) für den Verlauf einer Versuchsreihe mit einer Substratlast von 500 g Grassilage (A; VR6; Tag 168 - 196 der Gesamtversuchslaufzeit) bzw. 1.500 g Grassilage (B; VR20; Tag 525 - 553 der Gesamtversuchslaufzeit). Perkolatproben des jeweils ersten Hydrolysereaktors wurden mittels TRFLP-Methode analysiert. Zuordnung der terminalen Restriktionsfragmente (TRFs): TRF 150, *Firmicutes*; TRF 169, *Firmicutes* (u.a. *Tepidimicrobium*), TRF 180, *Bacteria*; TRF 227, unbekannt; TRF 229, *Firmicutes* (u.a. *Clostridium sensu stricto*); TRF 303 - *Firmicutes* (u.a. *Defluviitaleaceae*).

Im Vergleich zu den Veränderungen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft im Verlauf einer 28-tägigen Fermentation von einer Charge Grassilage wies die mikrobielle Gemeinschaft zusätzlich Anpassungen an die in den verschiedenen Kompartimenten der zweiphasigen zweistufigen Biogasanlage vorherrschenden Bedingungen auf (**Abbildung 20** und **21**). Dies bestätigten Analysen der einzelnen Kompartimente bzw. Oberflächen bestehend aus dem Gärrest, den Perkolaten aus HR und AF und dem Füllkörper. Hierfür wurden die jeweils vorliegenden bakteriellen Gemeinschaften mittels

TRFLP und die weniger komplex strukturierten archaeellen Gemeinschaften mittels qPCR untersucht.

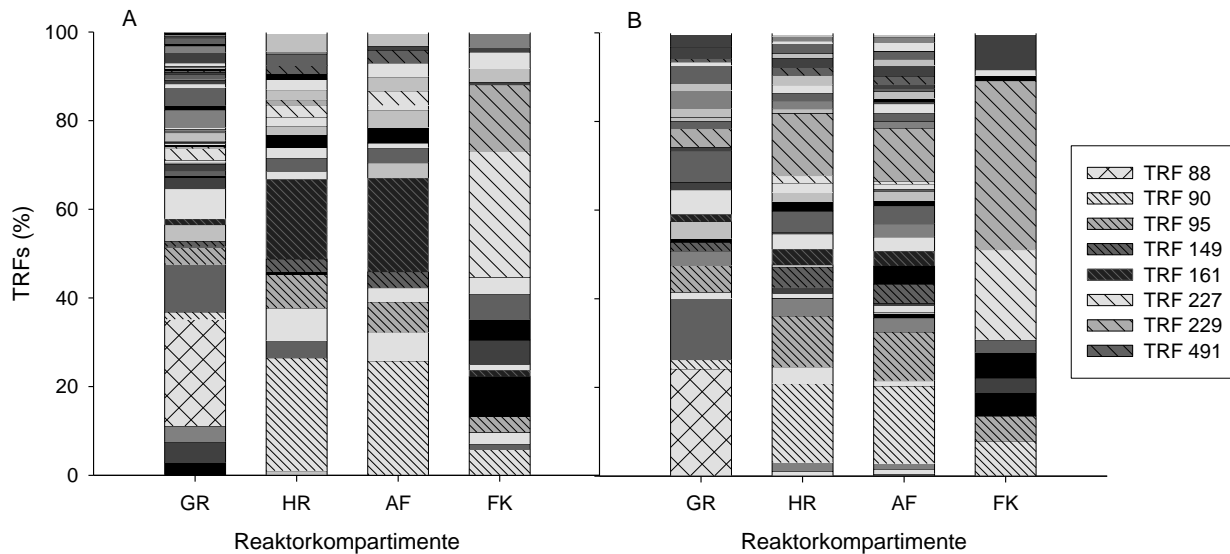


Abbildung 20: Überblick über die bakterielle Gemeinschaften in den einzelnen Kompartimenten des Reaktorsystems (37°C) bei Vergärung von 500 g (A; VR11) und 1.500 g Grassilage (B; VR23). Proben wurden jeweils aus dem ersten Reaktorsystem entnommen und mittels TRFLP-Methode untersucht. GR, Gärrest; HR, Hydrolysereaktor; AF, Anaerobfilter; FK, Füllkörper. Zuordnung der terminalen Restriktionsfragmente (TRFs): TRF 88, unbekannt; TRF 90, *Bacteroidetes*; TRF 95, *Bacteroidetes* (u.a. *Porphyromonadaceae*); TRF 149, *Firmicutes* (u.a. *Sedimentibacter*); TRF 161, *Cloacimonetes* (u.a. *Cand. Cloacamonas*); TRF 227, 229, *Firmicutes* (u.a. *Clostridium sensu stricto*); TRF 491, unklassifizierte *Bacteria*.

Für die bakterielle Gemeinschaft zeigten sich bei einer Reaktortemperatur von 37°C in den einzelnen Kompartimenten zum Teil deutlich Unterschiede (**Abbildung 20**). Lediglich in den Perkolaten des HR und AF zeigte die bakterielle Gemeinschaft große Übereinstimmungen, was in dem Konstruktionsprinzip des Reaktorsystems und der damit verbundenen Zirkulation des Perkolats zwischen den einzelnen Reaktorkompartimenten begründet war. In den Perkolaten dominierten bei geringer Substratlast (VR11) die TRFs 90 und 161 und bei höherer Substratlast die TRFs 90, 95 und 229. Im Gärrest überwog dagegen das TRF 88 mit einem prozentualen Anteil von jeweils 24%. Auf der Oberfläche des Füllkörpers waren dagegen die TRFs 227 und 229 mit höheren Anteilen zwischen 15 und 38% vertreten. Dies deutet auf eine klare Spezialisierung der bakteriellen Gemeinschaft an die jeweils vorherrschenden Bedingungen hin. Weitere Ursachen könnten in der Lebensweise der Mikroorganismen (planktonisch oder sessil) und in der ggf. vorhandenen Interaktion der Mikroorganismen untereinander (*Bacteria* und *Archaea*) liegen.

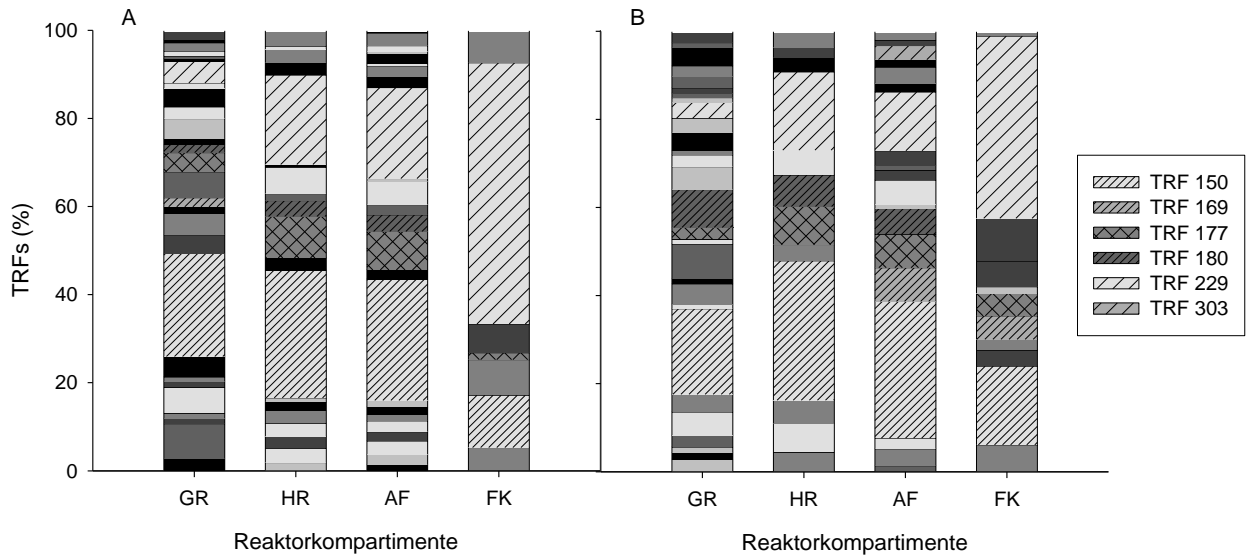


Abbildung 21: Überblick über die bakterielle Gemeinschaften in den einzelnen Kompartimenten des Reaktorsystems (55°C) bei Vergärung von 500 g (A; VR11) und 1.500 g Grassilage (B; VR23). Proben wurden jeweils aus dem ersten Reaktorsystem entnommen und mittels TRFLP-Methode untersucht. GR, Gärrest; HR, Hydrolysereaktor; AF, Anaerobfilter; FK, Füllkörper. Zuordnung der terminalen Restriktionsfragmente (TRFs): TRF 150, *Firmicutes*; TRF 169, *Firmicutes* (u.a. *Tepidimicrobium*); TRF 177, 180, *Bacteria*; TRF 229, *Firmicutes* (u.a. *Clostridium sensu stricto*); TRF 303, *Firmicutes* (u.a. *Defluviitaleaceae*).

Bei einer Reaktortemperatur von 55°C hingegen waren die Unterschiede in der bakteriellen Gemeinschaft zwischen den einzelnen Kompartimenten nicht so stark ausgeprägt (**Abbildung 21**). Entsprechend dem Reaktorsystem betrieben bei 37°C wies die bakterielle Gemeinschaft auch bei 55°C die größten Übereinstimmungen innerhalb der Perkolate auf. Hier dominierte sowohl bei geringer (VR11) als auch bei hoher Substratlast (VR23) TRF 150 mit prozentualen Anteilen von 28 bis 32%. Die TRFs 229 und 177 waren ebenfalls mit bis zu 21 bzw. 9% deutlich vertreten. Im Gärrest dagegen war der prozentuale Anteil dieser TRFs zum Teil deutlich geringer, während der von TRF 150 nur leicht geringfügiger ausfiel (19 bis 23%).

Das TRFLP-Profil des Füllkörperaufwuchs zeigte dagegen ein gegenläufiges Bild. TRF 229 wurde hier mit sehr hohen prozentualen Anteilen (59 und 41%) detektiert, während TRF 150 (und auch TRF 177 bp) mit geringeren Anteilen vertreten war. Auch diese Unterschiede zwischen den Kompartimenten deuten auf eine Spezialisierung der bakteriellen Gemeinschaft an die jeweils vorherrschenden Bedingungen der Reaktorkompartimente (55°C) hin.

Neben der bakteriellen Gemeinschaft wurde ebenfalls auch die archaeelle Gemeinschaft mittels der quantitativen real-time PCR untersucht. Diese wies zum Teil deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Reaktorkompartimenten bzw. -oberflächen als auch zwischen den Reaktorsystemen bei 37°C bzw. 55°C auf (**Abbildung 22** und **23**).

Für das Reaktorsystem, das bei einer Temperatur von 37°C betrieben wurde, zeigte sich bei geringer Substratlast von 500 g Grassilage (**Abbildung 22 A**) im Gärrest eine Dominanz der *Methanomicrobiales* (54%), während im Biofilm auf der Füllkörperober-

fläche Vertreter der *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*) mit einem Anteil von 58% der *Archaea* dominierten. Im Perkolat des Hydrolysereaktors (HR) und des Anaerobfilters (AF) waren *Methanomicrobiales* und *Methanosaetaceae* nahezu mit gleichen Anteilen (20 bis 26%) vertreten. Gruppen wie *Methanosarcinaceae* und *Methanobacteriales* wurden nur in geringen Anteilen nachgewiesen und schienen somit eine untergeordnete Rolle in der Methanproduktion bei 37°C zu spielen. Auffällig war jedoch, dass vor allem im Perkolat nur ca. 50% der *Archaea* (= Differenz der relativen Kopienzahlen für das archaeelle 16S rRNA Gen) einer der vier untersuchten methanogenen Gruppen zuzuordnen waren. Dies könnte darauf hindeuten, dass besonders im Perkolat noch andere taxonomische Gruppen der *Archaea* vorhanden waren, die allerdings nicht mit Hilfe der angewandten qPCR-Assays nach Yu *et al.* (2005) erfasst werden konnten. Dies könnten zum Beispiel Vertreter *Crenarchaeota* oder auch andere Gruppen innerhalb der *Euryarchaeota* wie zum Beispiel *Methanococci* oder *Thermoplasmata* sein. Ausgehend von den Ergebnissen der Analyse der 16S rRNA Gensequenzbibliotheken erscheint es wahrscheinlich, dass zumindest anteilig *Crenarchaeota* beteiligt sind.

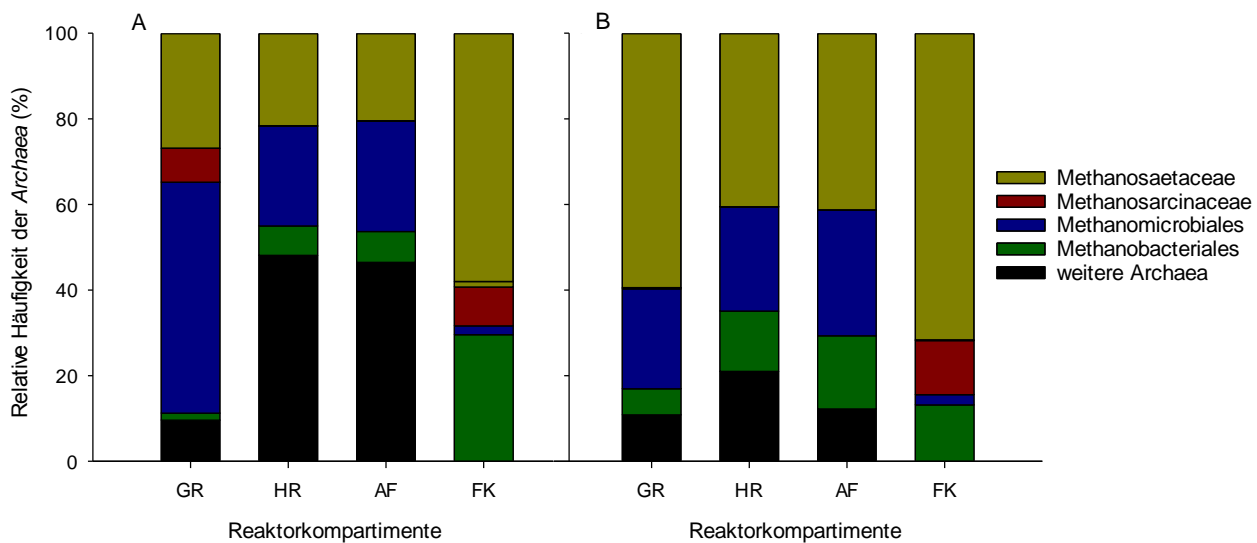


Abbildung 22: Prozentuale Darstellung der Anteile methanogener Archaea im Reaktorsystem (37°C) bei Vergärung von 500 g (A; VR11) und 1.500 g Grassilage (B; VR23). Die untersuchten Proben wurden jeweils aus dem ersten Reaktorsystem entnommen und mittels qPCR-Assays nach Yu *et al.* (2005) untersucht. GR, Gärrest; HR, Hydrolysereaktor; AF, Anaerobfilter; FK, Füllkörper.

Im Vergleich zu der geringen Substratlast nahm bei höherer Substratlast (1.500 g Grassilage, **Abbildung 22 B**) die Dominanz der *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*) mit prozentualen Anteilen von 41% in den Perkolaten, 59% im Gärrest bzw. 72% auf den Füllkörpern in allen Kompartimenten zu. Der Anteil der *Methanomicrobiales* war im Vergleich zu den Analysen bei 500 g Grassilage weitgehend gleich. Nur im Gärrest wurden deutlich geringere Werte nachgewiesen. Vertreter der *Methanobacteriales* wurden dagegen sowohl im Gärrest als auch in den Perkolaten in leicht erhöhten Anteilen detektiert. Der Anteil an nicht zugeordneten *Archaea* verringerte sich bei erhöhter Substrat-

last deutlich, was auf einen Rückgang von Gruppen hindeuten kann, die nicht mittels der vier untersuchten methanogenen qPCR-Assays erfasst werden konnten (zum Beispiel *Crenarchaeota*).

Insgesamt ist festzustellen, dass im Reaktorsystem bei 37°C unter höherer Substratlast die acetoklastische aber auch die hydrogenotrophe Methanogenese durchgeführt wurde, während bei geringerer Substratlast die hydrogenotrophe neben der acetoklastischen Methanogenese eine größere Rolle zu spielen schien.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei einer Reaktortemperatur von 37°C zeigte sich bei einer Betriebstemperatur von 55°C und einer geringen Substratlast von 500 g Grassilage (**Abbildung 23 A**) im Gärrest eine Dominanz der *Methanosarcinaceae* (59%) sowie im Füllkörper-Biofilm (34%), während in den Perkolaten Vertreter der *Methanobacteriales* mit 31% (HR) bzw. 34% (AF) dominierten. Erneut war ein großer Anteil der *Archaea* (zwischen 18 und 49% bezogen auf die Differenz in den ermittelten relativen Kopienzahlen) nicht mittels der vier in dieser Studie angewandten qPCR-Assays zum Nachweis einzelner methanogener Gruppen erfassbar. Ausgehend von den Ergebnissen der 16S rRNA Gensequenzanalysen ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei zumindest anteilig um Vertreter der *Thermoplasmata* handelte.

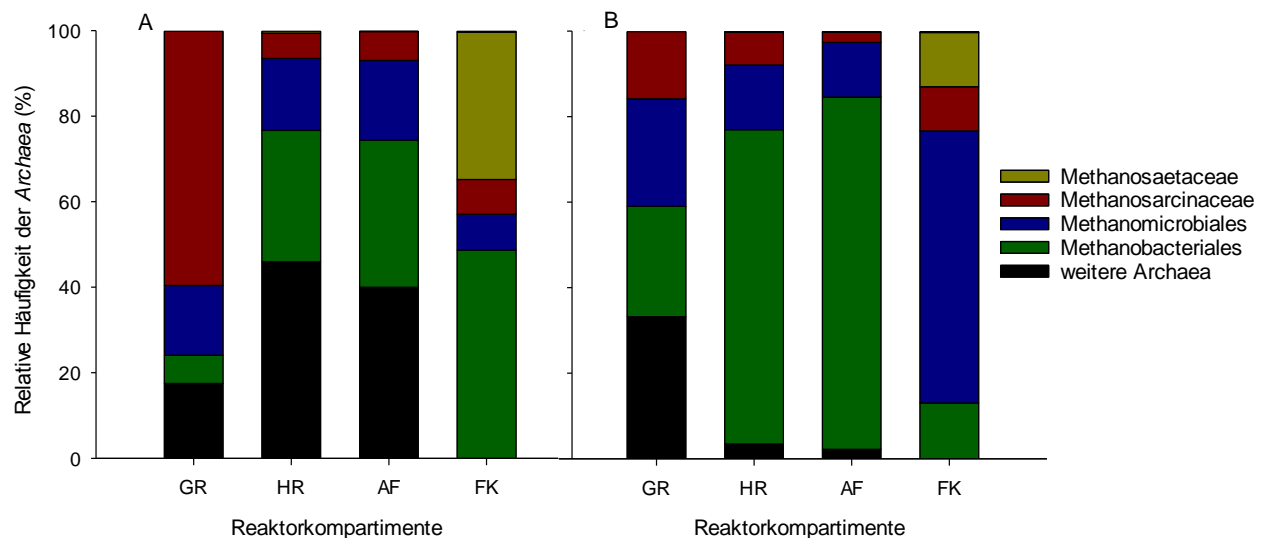


Abbildung 23: Prozentuale Darstellung der Anteile methanogener Archaea im Reaktorsystem (55°C) bei Vergärung von 500 g (A; VR11) und 1.500 g Grassilage (B; VR23). Die Proben wurden jeweils aus dem ersten Reaktorsystem entnommen und mittels qPCR-Assays nach YU *et al.* (2005) untersucht. GR, Gärrest; HR, Hydrolysereaktor; AF, Anaerobfilter; FK, Füllkörper.

Bei höherer Substratlast von 1.500 g Grassilage (**Abbildung 23 B**) veränderte sich die archaeelle Gemeinschaft innerhalb der einzelnen Kompartimente deutlich. In allen Kompartimenten nahm der Anteil an *Methanobacteriales* stark zu. Besonders in den Perkolaten wurde diese Gruppe mit Anteilen von 73% (HR) und 82% (AF) an der gesamten archaeellen Gemeinschaft detektiert. Im Biofilm des Füllkörpers wurde immerhin ein Anteil von 64% festgestellt. Lediglich im Gärrest hatten neben den *Methanobac-*

teriales (26%) auch noch Vertreter der *Methanomicrobiales* einen größeren Anteil (25%) an der gesamten archaeellen Gemeinschaft. Methanogene der Familie *Methanosarcinaceae* waren dagegen in allen Kompartimenten nur mit einem maximalen Anteil von 16% vertreten. Der Anteil an taxonomisch nicht klassifizierbaren *Archaea* verringerte sich erhöhter Substratlast bei 55°C ebenso wie bei 37°C deutlich. Dieses könnte auf einen Rückgang im Anteil derjenigen Gruppen hindeuten, die mittels der vier angewandten qPCR-Assays für Methanogene nicht erfasst werden konnte (zum Beispiel *Thermoplasmata*).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass im Reaktorsystem bei 55°C unter höherer Substratlast die hydrogenotrophe Methanogenese dominierte, während bei geringerer Substratlast der von Vertretern der *Methanosarcinaceae* durchgeführte mixotrophe Methanogenese ebenfalls eine Rolle zu spielen schien. Diese Ergebnisse wurden durch die Analysen der 16S rRNA Gensequenzbibliotheken bestätigt.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse hinsichtlich der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften innerhalb der einzelnen Kompartimente und deren Dynamiken die Bedeutung der ganzheitlichen Betrachtung der Systemmikrobiologie des zweiphasigen zweistufigen Reaktorsystems. Wird zum Beispiel ausschließlich das Perkolat des Reaktors bei 37°C und 55°C untersucht, könnte die Rolle der *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*) bzw. der *Methanosarcinaceae* bei der Biomethanisierung von geringen Substratlasten (hier: 500 g FM) unterschätzt werden. Eine vollständige Betrachtung ist jedoch für das Verständnis der mikrobiologischen und biochemischen Stoffwandlungsprozesse und damit des gesamten Prozesses von grundlegender Bedeutung.

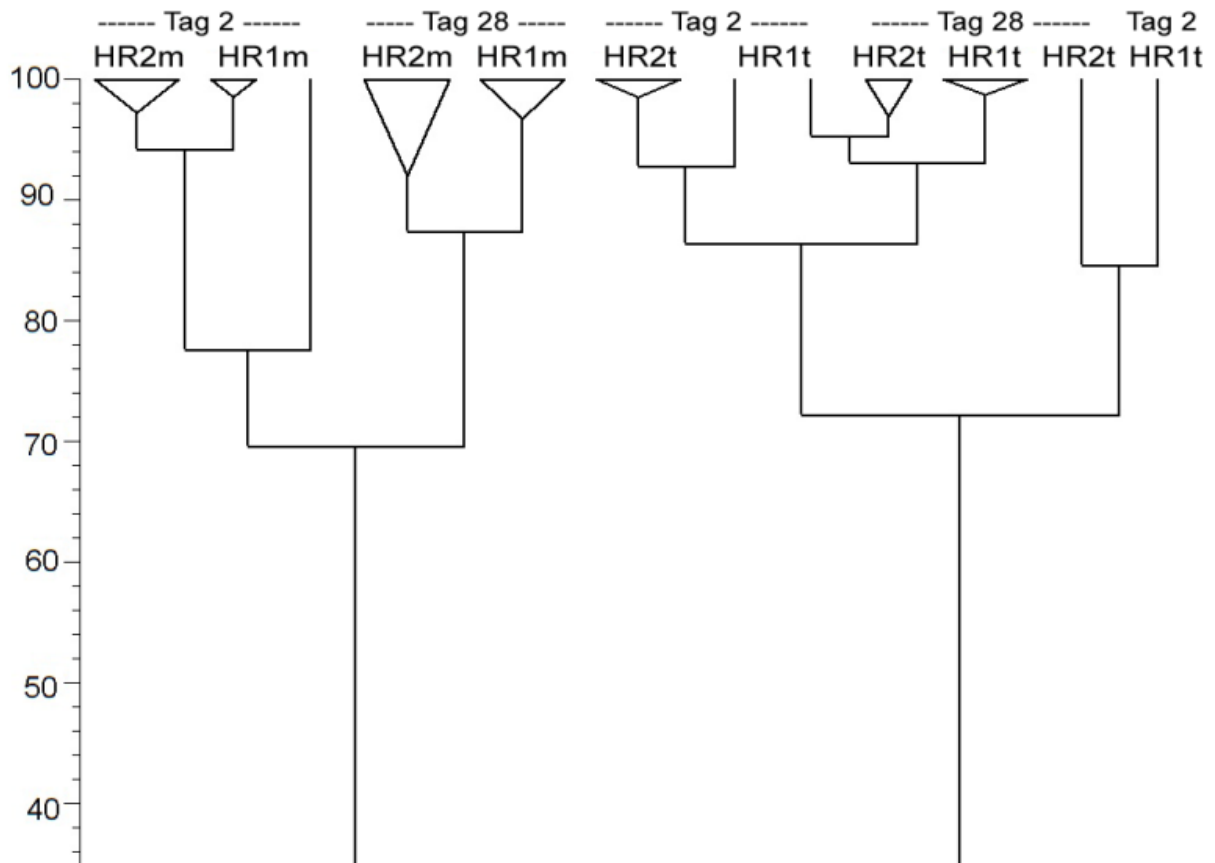


Abbildung 24: Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften im ersten (1) und zweiten (2) Reaktorsystem für die Temperatur von 37°C (m) und 55°C (t). Hierfür wurden Perkolatproben aus dem Hydrolysereaktoren (HR) der vier Anlagen der VR20 (Tag 527 und 553 der Gesamtversuchslaufzeit) entnommen und mittels TRFLP-Analyse untersucht. Prozentuale Ähnlichkeiten der Profile wurde mittels Pearson-Korrelation (Ähnlichkeitskoeffizient mit Optimierung 0,5%) und UPGMA Clusteranalyse bestimmt.

Die oben dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Entwicklung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft beziehen sich stets auf das erste Reaktorsystem. Um einen Einblick zu erhalten, ob sich die Gemeinschaften in den parallel betriebenen zweiten Reaktorsystemen vergleichbar etabliert hatten, wurden hieraus ebenfalls Perkolate zu Beginn (Tag 2) und zum Ende (Tag 28) der VR20 entnommen und mittels TRFLP-Methode untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse (**Abbildung 24**) bestätigten zunächst, dass sich die bakterielle Gemeinschaft bei 37°C von der bei 55°C deutlich unterschied. Des Weiteren waren im Verlauf der 28-tägigen Fermentation bei 37°C größere Veränderungen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft zu erkennen als zwischen den Gemeinschaften der zwei gleichtemperierten Reaktorsysteme, was auf eine ähnliche Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft sowohl im ersten als auch im zweiten System hindeutet.

Für die bakterielle Gemeinschaft bei 55°C zeigte sich, dass die Veränderungen im Verlauf der 28-tägigen Fermentation (vgl. Tag 2 und 28) kleiner waren als bei 37°C. Bis auf

wenige Ausnahmen waren aber auch hier die Unterschiede zwischen den zwei Reaktorsystemen geringer als zwischen den zwei analysierten Versuchstagen.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sich die bakterielle Gemeinschaft sowohl bei 37°C als auch bei 55°C jeweils in beiden Reaktorsystemen ähnlich entwickelt hatte.

II.1.4 Bereitstellung von mikrobieller cDNA für die Transkriptomanalyse (AP 4.1)

Mittels der Analyse der mikrobiellen Metatranskriptome sollten Einblicke in die Stoffwechselaktivität bzw. in die Genexpression der mikrobiellen Gemeinschaften ermöglicht werden. Innerhalb dieses Verbundvorhabens wurde dazu eine mRNA-fokussierte Transkriptomanalyse durchgeführt, die grundsätzlich Auskunft über die tatsächlich exprimierten Gene und damit eine Information über die zellulär produzierten Proteine gibt. Parallel zu den Transkriptomanalysen wurden zusätzlich auch Metagenomanalysen durchgeführt, die es ermöglichen einen Vergleich zwischen den tatsächlich exprimierten Genen (*i.e.* Metatranskriptom) und den grundsätzlich in den mikrobiellen Genomen vorhandenen Genen (*i.e.* Metagenom) herzustellen. Neben der Metagenomanalyse wurde die genomische DNA ebenfalls für eine 16S rRNA Amplikonanalyse herangezogen, bei der das mikrobielle 16S rRNA Gen amplifiziert und im Hochdurchsatzverfahren sequenziert wurde. Ziel dieser Analyse war eine umfassende Charakterisierung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften auf Gattungsebene. Die Verknüpfung aller erhaltenen Datensätze erlaubt eine Aussage über den stoffwechselaktiven und -inaktiven Anteil des Mikrobioms sowie eine detaillierte Aussage über die umgesetzten Stoffwechselwege.

Als Proben für diese Analysen wurden zwei Versuchsreihen ausgewählt, die mit geringer (500 g Grassilage, VR16) bzw. erhöhter Substratlast (1.500 g Grassilage, VR24) gefahren wurden. Diese Versuchsreihen mit einer standardmäßigen Versuchsdauer von 28 Tagen wurden bereits nach zwei Tagen Fermentation abgebrochen um die Mikroorganismen direkt auf der Oberfläche des Substrates untersuchen zu können. Tag 2 wurde ausgesucht, da sich in den vorherigen Versuchsreihen bzw. Untersuchungen gezeigt hatte, dass sich hier die höchste Konzentration an Gesamtsäureäquivalenten eingestellt hatte. Dementsprechend sollten für diesen Zeitpunkt die höchsten und biotechnologisch bedeutsamsten mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten zu erwarten sein.

Die RNA und DNA wurde mittels der in Kap. 2.1.2 beschriebenen Protokolle isoliert. Qualität und Quantität der DNA und RNA wurde durch den Verbundpartner CeBiTec geprüft und bestätigt. Für die RNA wurde dies mit Hilfe eines Prokaryote Total RNA Pico Chips (Hersteller: Agilent Technologies) festgestellt. Mittels dieser Analyse wird die sog. RNA-Integritätsnummer (RIN) ermittelt, die der RNA-Qualität einen Zahlenwert, den sog. RIN-Wert, zuordnet. Dieser Wert berücksichtigt die Anteile von 23S und 16S rRNA und deren Verhältnis zueinander sowie den Anteil an degradierten Abbauprodukten. Hieraus wird ein Wert zwischen 1 (= komplett degradiert) und 10 (= komplett intakt) generiert.

Die isolierte RNA zeigte für die überwiegende Anzahl von Proben aus den Reaktoren bei geringer und erhöhter Substratlast gute Qualitäten und RIN-Werte > 7. Die Präparationen mikrobieller RNA waren somit für eine Transkriptomsequenzierung grundsätzlich gut geeignet. Für einige Proben war jedoch die Quantität der RNA nicht ausreichend, so dass ergänzend eine zweite zusätzliche RNA-Extraktion aus den Biogasreaktorproben durchgeführt wurde. Hierfür wurde in RNAlater fixiertes Probenmaterial verwendet. Die weitere Bearbeitung der erzeugten RNA-Präparationen erfolgte durch den Verbundpartner CeBiTec.

II.1.5 Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für taxonomische Einheiten und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem (AP 5.1)

In diesem Arbeitspaket sollte eine Optimierung und Etablierung von Protokollen zur Anwendung von molekularen Markern zum Nachweis ausgewählter taxonomischer Einheiten umgesetzt werden. Insbesondere sollte geprüft werden, ob der qPCR-basierte Nachweis basierend auf (1) der DNA (einfache Handhabung), (2) der RNA bzw. von zu RNA komplementärer DNA (cDNA, Nachweis von Transkripten) oder (3) der Verwendung von Propidiummonoazid (PMA, Hemmung der PCR-Amplifikation von DNA aus geschädigten Zellen) durchgeführt werden sollte.

Im ersten experimentellen Ansatz erfolgte der Nachweis mittels bakterieller und archaeeller TRFLP-Analyse basierend auf Präparationen der genomischen (gDNA) bzw. komplementären (cDNA) DNA (**Abbildung 25**). Während mit Hilfe der gDNA basierten Analysen grundsätzlich Aussagen über die im Reaktor vorhandenen Mikroorganismen getroffen werden können, können mittels cDNA-basierter Analysen stoffwechselaktive Mikroorganismen identifiziert werden.

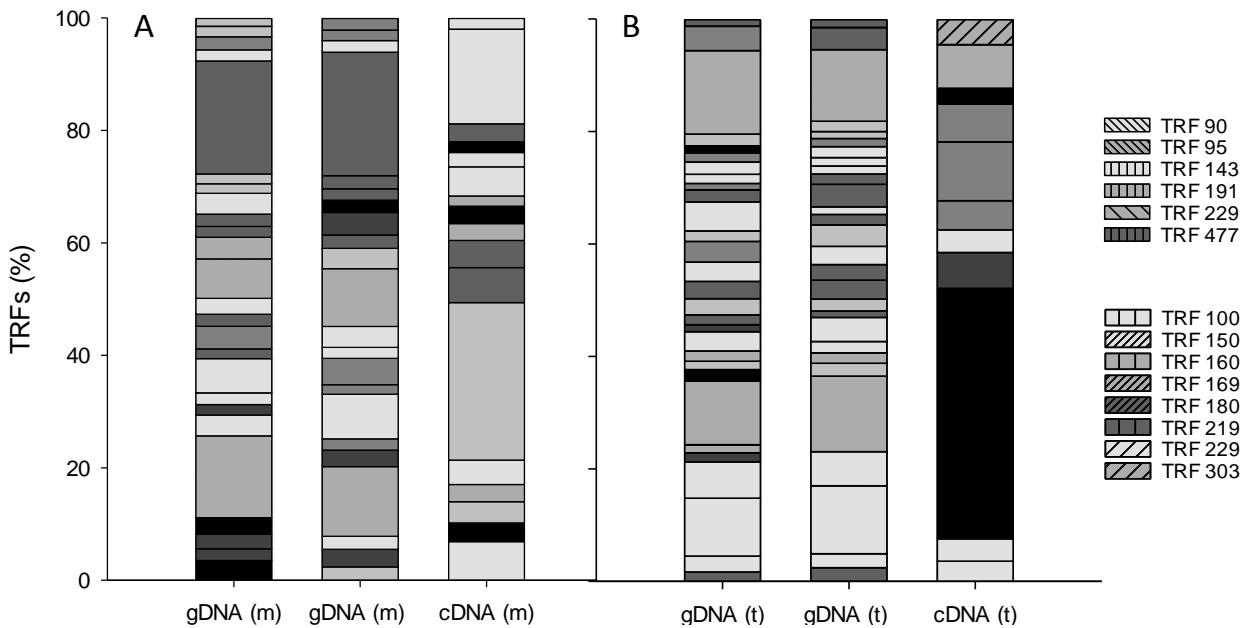


Abbildung 25: Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften innerhalb der Gärreste aus den bei 37°C (A) bzw. 55°C (B) betriebenen Biogasreaktoren basierend auf der TRFLP-Analyse von gDNA und von zu RNA komplementärer DNA (cDNA). Das Probenmaterial wurde am zweiten Tag der Versuchsreihe VR24 entnommen. Für die RNA-Extraktion wurde das Probenmaterial in RNAlater konserviert. m, 37°C; t, 55°C.

Das Ergebnis der bakteriellen Analyse des Gärrestes bei 37°C ergab zum Teil deutliche Unterschiede zwischen gDNA und cDNA. Dies deutet darauf hin, dass die in der Analyse der gDNA im Gärrest bei 37°C dominierenden Bakterien nicht zwangsläufig auch die stoffwechselaktiven Bakterien waren. Ein Beispiel hierfür ist TRF 143, welches cDNA-basiert einen Anteil von 28% aufwies, während es gDNA-basiert deutlich geringer vertreten war.

Ebenfalls wurden TRFs identifiziert, die sowohl in der gDNA- als auch in der cDNA-basierten TRFLP-Analyse zum Teil mit höheren prozentualen Anteilen detektiert wurden (TRF 477, aber auch TRF 95). Für diese beiden TRFs, die den *Bacteroidetes* (*Porphyromonadaceae*, TRF 95) und den *Firmicutes* (*Clostridiales*, TRF 477) zugeordnet werden konnten, wurden im Folgenden weiter unten im Detail beschriebene qPCR-Assays entwickelt.

Für den Gärrest aus dem bei 55°C betriebenen Reaktorsystem (**Abbildung 25 B**) zeigte sich grundsätzlich ein ähnliches Bild. Es gab sowohl TRFs, die bei der gDNA-basierten Analyse dominierten (zum Beispiel TRF 100, TRF 303), aber auch TRFs, die bei der cDNA-basierten Analyse stärker vertreten waren (zum Beispiel TRF 160, TRF 219). Insbesondere die zuletzt genannten Gruppen schienen für den anaeroben Abbau von Grassilage bei 55°C besonders relevant zu sein und wären somit ebenfalls interessant für die Entwicklung von qPCR-Assays. Da allerdings die Zuordnung zu entsprechenden Sequenzen nicht eindeutig war, fehlte eine ausreichende Grundlage für ein Primerdesign.

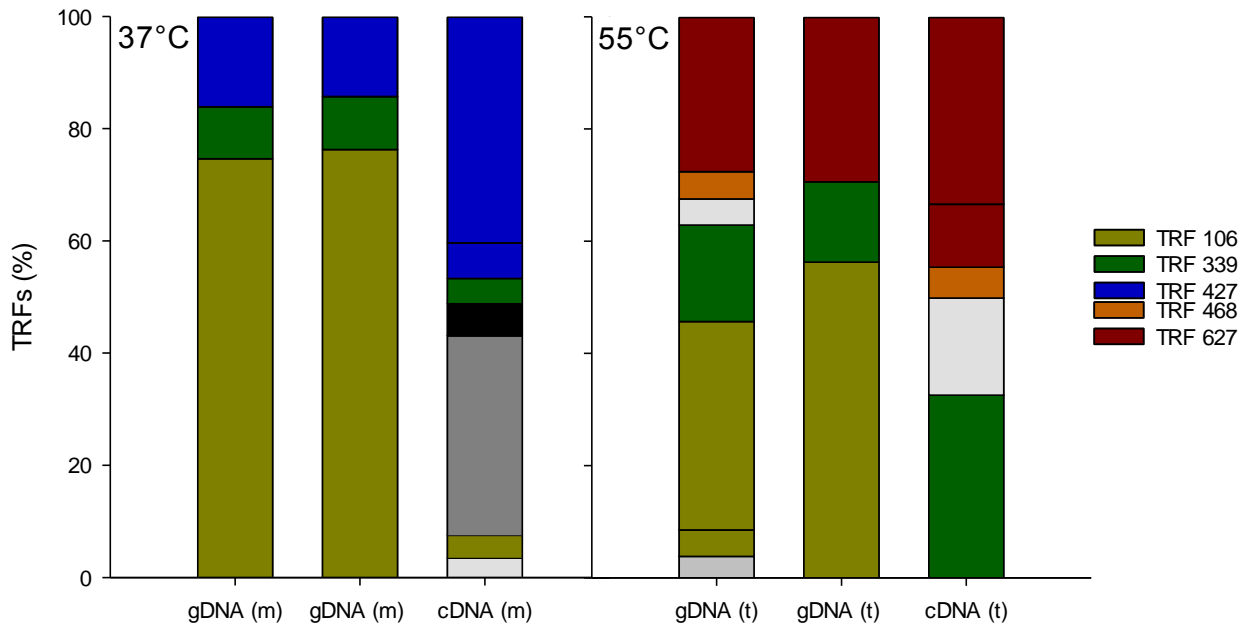


Abbildung 26: Vergleich der archaeellen Gemeinschaften in den Gärresten der bei 37°C bzw. 55°C betriebenen Biogasreaktoren basierend auf der TRFLP-Analyse von gDNA und von zu RNA komplementärer DNA (cDNA). Das Probenmaterial wurde am zweiten Tag der Versuchsreihe VR24 entnommen. Für die RNA-Extraktion wurde das Probenmaterial in RNAlater konserviert. Zuordnung der terminalen Restriktionsfragmente (TRFs): TRF 106, *Methanosaetaceae* (*Methanotrichaceae*, 37°C); *Methanomicrobiaceae* (55°C); TRF 339, *Methanobacteriaceae* (55°C); TRF 427, *Methanomicrobiaceae* oder *-spirillaceae* (37°C); TRF 468, *Methanomassiliicoccaceae* (55°C); TRF 627, *Methanosarcinaceae* (55°C); m, 37°C; t, 55°C.

Ebenso wie für die bakteriellen TRFLP-Profile zeigten sich für die archaeellen TRFLP-Profile Unterschiede zwischen gDNA- und cDNA-basierter Analyse (**Abbildung 26**). Im Gärrest aus der Fermentation bei 37°C dominierte deutlich das TRF 106 mit Anteilen von 75%, während es in der cDNA-basierten Analyse einen Anteil von lediglich 36% aufwies. Im Gegensatz dazu war das TRF 427 im gDNA-basierten Nachweis mit 15% vertreten, cDNA-basiert dagegen mit 40%, was darauf hindeutet, dass diese Gruppe stärker am Stoffwechsel beteiligt war als man es von den gDNA-basierten Ergebnissen abgeleitet hätte.

Im Gärrest aus dem thermophilen Biogasreaktor (55°C) waren die Unterschiede in den Ergebnissen von gDNA- und cDNA-basierter Analyse weniger deutlich. In beiden Analysen dominierten die TRFs 106 und 627 in den methanogenen Gemeinschaften. In diesem Fall waren die in der gDNA detektierten Archaeen auch tatsächlich die vorrangig stoffwechselaktiven.

Um die Ergebnisse der gDNA- und cDNA-basierter Analyse der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaften zu bestätigen, werden weitere Untersuchungen notwendig sein. Die im Rahmen dieser Studie erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass in den meisten Fällen von der gDNA-basierter Analyse nicht ausreichend auf die stoffwechselaktiven Mikroorganismen geschlossen werden kann. Lediglich unter bestimmten Voraussetzungen (hier: Analyse der methanogenen Archaea in dem thermophilen Biogasreaktor) scheint eine Analyse auf gDNA-Basis ausreichend Informationen

über die aktiv am anaeroben Abbau und der Biomethanisierung beteiligten Mikroorganismen liefern zu können.

Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt lag in der Untersuchung des Effektes der Behandlung von Reaktorproben mit Propidiummonoazid (PMA; Biotium, Hayward, USA). PMA ist ein photoreaktiver Farbstoff mit einer hohen Affinität zu doppelsträngiger DNA. Durch Inkubation mit starkem sichtbarem Licht (zum Beispiel durch Halogenstrahler) reagiert die photoaktive Azidogruppe zu einem hochreaktiven Nitrenradikal, welches eine kovalente Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung mit DNA ausbildet. Da PMA jedoch nicht durch intakte Zellmembranen dringen kann, bindet der Farbstoff nur an freie DNA bzw. an DNA von Zellen mit geschwächter Zellmembran. So markierte DNA kann nach erfolgter Extraktion nicht mittels PCR amplifiziert werden und steht somit für die weitere Analyse nicht zur Verfügung. Lediglich die vor dem PMA-Zugriff geschützte DNA aus Zellen mit intakter Zellmembran kann auf diese Weise für nachfolgende Analysen genutzt werden. Theoretisch sollte so der ausschließliche Nachweis von „lebendigen“ (oder vielmehr von ungeschädigten und vermehrungsfähigen) Mikroorganismen erfolgen.

In einem ersten Versuch zur Etablierung der PMA-Analyse wurde Perkolat aus den zweiphasigen zweistufigen Reaktorsystemen des Verbundpartners ATB entnommen (**Abbildung 27 A**). Ein Teil der Proben wurde mit PMA (50 μM) versetzt und unter einer Halogenlichtquelle für 5 min inkubiert. Anschließend wurde DNA extrahiert und mittels TRFLP-Fingerprintanalyse verglichen. Deutliche Unterschiede waren zwischen der bakteriellen Gemeinschaft bei 37°C und 55°C festzustellen (**Abbildung 27 A**). Die Anwendung von PMA auf einzelne Proben zeigte jedoch keine eindeutigen Unterschiede in den Fingerprint-Profilen der bakteriellen Gemeinschaft im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine unzureichende Lichtanregung sein, da das Licht aufgrund der Trübung der Perkolate nicht tief genug in die Probe eindringen konnte.

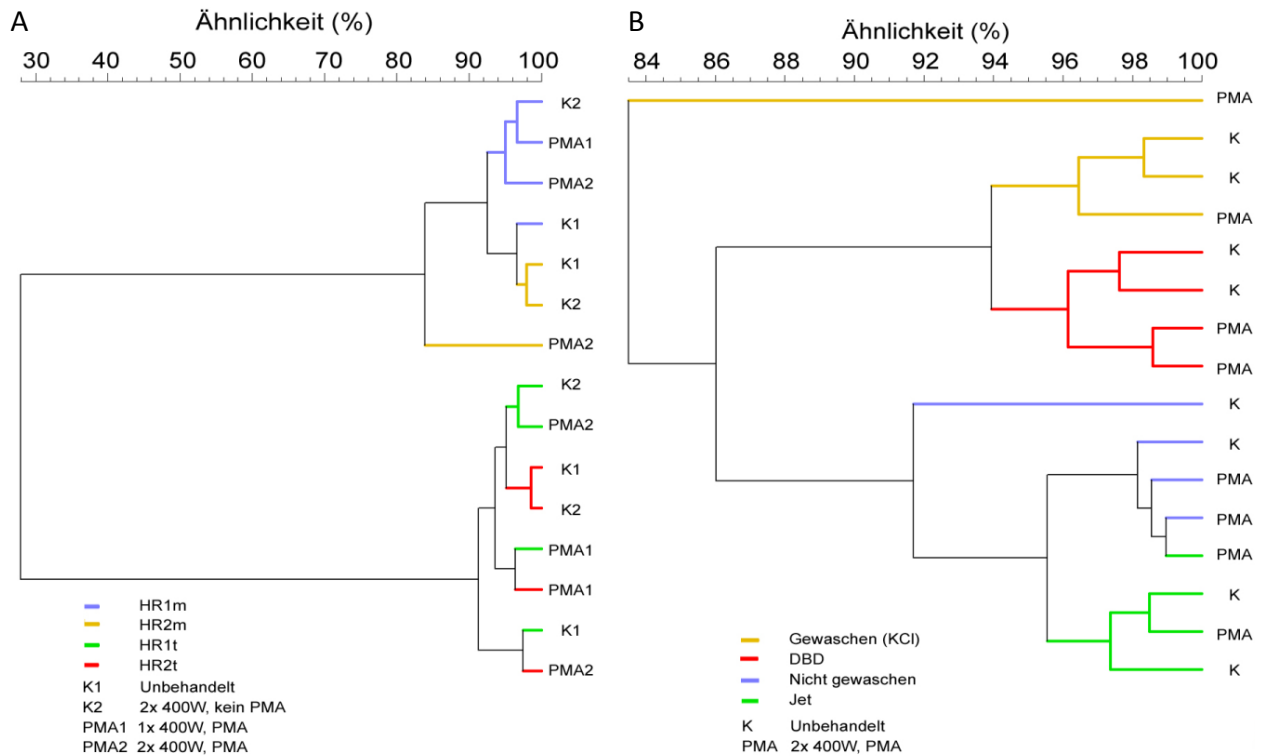


Abbildung 27: Ergebnisse der PMA-Versuche. (A) Clusteranalyse (UPGMA) der TRFLP-Ergebnisse basierend auf einer Pearson-Korrelation (Ähnlichkeitskoeffizient) mit verschiedenen Perkolatproben unter Berücksichtigung von verschiedenen Lichtintensitäten, (B) Clusteranalyse (UPGMA) der TRFLP-Ergebnisse basierend auf einer Pearson-Korrelation (Ähnlichkeitskoeffizient) einer Perkolatprobe unter Berücksichtigung von verschiedenen Vorbehandlungen. HR1m, Hydrolysereaktor 1 (37°C); HR2m, Hydrolysereaktor 2 (37°C); HR1t, Hydrolysereaktor 1 (55°C); HR2t, Hydrolysereaktor 2 (55°C); 1x 400W, 1 Halogenstrahler à 400W; 2x 400W, 2 Halogenstrahler à 400W.

In einem zweiten Versuchsansatz (**Abbildung 27 B**) wurde das Perkolat eines Reaktorsystems mit KCl vorgewaschen um das Probenmaterial zu säubern bzw. mit Plasma behandelt (Jet-Plasma, Dielectric Barrier Discharge (DBD)-Plasma) um vorhandene Zellen zu schädigen und so den Eintritt von PMA in die Zellen zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit PMA bzw. ohne PMA (= Kontrolle). Aus den Proben wurde die mikrobielle DNA extrahiert und diese mittels TRFLP-Fingerprinttechnik mit Fokus auf die bakterielle Gemeinschaft analysiert.

Die TRFLP-Profile der drei vorbehandelten und der nicht gewaschenen Proben wiesen zum Teil größere Unterschiede auf (**Abbildung 27 B**). Allerdings zeigten sich für die nicht gewaschenen und die mit (Jet-) Plasma behandelten Proben keine eindeutigen Unterschiede zwischen PMA-Zugabe und Kontrolle. Unzureichende Lichtanregung aufgrund der getrübbten Probenmatrix kann auch hier ein Grund für dieses Ergebnis sein (WAGNER *et al.* 2008). Lediglich für die mit (DBD-) Plasma behandelten und die gewaschenen Proben zeigten sich leichte Unterschiede im bakteriellen TRFLP-Profil zwischen PMA-Zugabe und Kontrolle.

Das Waschen der Proben mit KCl scheint einen positiven Effekt auf die Anwendung von PMA zu haben. Die verringerte Trübung der Probenmatrix könnte sich vorteilhaft auf die

lichtinduzierte Bindung von PMA an DNA auswirken. Die Studie von FRANKENHUYZEN *et al.* (2013) legt nahe, dass stark getrübbte Proben, wie zum Beispiel Klärschlamm, verdünnt und mit hoher PMA-Konzentration (200 μM) analysiert werden sollten. Für unbehandelte Biogasproben erscheint die Anwendung von PMA jedoch als nicht zielführend.

Neben dem Problem des unvollständigen Anfärbens von inaktiven Zellen (bzw. von Zellen mit geringer Membranintegrität) besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit falsch-positive Ergebnisse zu erzielen, zum Beispiel durch Anfärben von Zellen mit normaler Membranintegrität. PMA dringt jedoch deutlich schlechter in intakte Zellen ein als vergleichbare Farbstoffe wie zum Beispiel Ethidiummonoazid (NOCKER *et al.* 2006). Ein weiteres grundsätzliches Problem bei dieser Färbemethode besteht in der Abschätzung des Zellzustandes (aktiv vs. inaktiv) nur basierend auf der Intaktheit der Membran, welches ein unvollständiges Kriterium für Zellviabilität ist. Eine geringe Membranintegrität einhergehend mit einer PMA-Färbung kann auch ein reversibler Zustand sein. Nichtsdestotrotz belegen verschiedene Studien die erfolgreiche Diskriminierung von extrazellulärer bzw. aus membransupprimierten Zellen stammende DNA nach PMA-Behandlung von Abwasser bzw. Klärschlamm (NOCKER *et al.* 2007, FRANKENHUYZEN *et al.* 2013).

Entwicklung von qPCR-Assays für prozessrelevante Bakterien:

Basierend auf den Analysen der bakteriellen Gemeinschaften im Biogasreaktorsystem mit geringer Substratlast (500 g, VR11) und mit hoher Substratlast (1500 g, VR23) wurden potentiell prozessrelevante Gruppen abgeleitet. Der Fokus lag auf Grund des höheren Praxisbezuges bei den Reaktorsystemen mit einer Betriebstemperatur von 37°C. Dies ermöglichte außerdem die Evaluierung der entwickelten Marker unter Praxis-Bedingungen anhand von Proben aus dem Biogasreaktorsystem der Fa. GICON (siehe 2.1.7), da dieses ebenfalls bei 37°C betrieben wird.

Für das zweiphasige zweistufige Reaktorsystem mit 37°C wurden drei Cluster innerhalb der *Clostridiales* (*Firmicutes*), *Prevotellaceae* und *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) identifiziert, die für den anaeroben Abbau von Grassilage eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

Entwicklung eines qPCR-Assays (SYBR-Green Assay) für Vertreter der Clostridiales (Lachnospiraceae):

Mittels der 16S rRNA Gensequenzanalysen (jeweils für 37°C) wurde ein Cluster identifiziert, das unter erhöhter Substratlast von 1.500 g (VR23, Tag 2) häufiger (ca. 4% der 16S rRNA Gensequenzen) detektiert wurde als zuvor bei geringerer Substratlast (ca. 1%, VR11, Tag 2). Zusätzlich wurde diese Gruppe im Gärrest an Tag 2 sowohl mittels gDNA-basierter TRFLP-Analyse mit ca. 21% als auch mittels cDNA-basierter TRFLP-Analyse mit ca. 17% aller TRFs nachgewiesen (TRF 477, **Abbildung 25**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass diese Gruppe eine wichtige Rolle im Abbauprozess der Grassi-

lage übernimmt. Interessanterweise waren die Vertreter dieses Clusters mittels TRFLP vorrangig zu Beginn der Fermentation im Gärrest nachweisbar und nicht zu einem späteren Tag der Fermentation.

Die Sequenzen lagen mit einer Sequenzähnlichkeit von > 97% innerhalb eines OTUs und wurden mittels der RDP Datenbank den *Clostridiales* zugeordnet (WANG *et al.* 2007). Sie bildeten innerhalb des in **Abbildung 28** dargestellten Dendrogramms ein eigenes Cluster, das die größte Ähnlichkeit zu den Arten *Clostridium herbivorans* str. DSM 54408 und *Clostridium polysaccharolyticum* str. DSM 1801 (beide Familie *Lachnospiraceae*, Gattung *Lachnoclostridium*) aufwies.

Die entwickelten Primer (PCR_For_1: 5`-ttcsktgtgactgagtggcgga-3`, PCR_Rev_1: 5`-acgcggtccatcacaccga-3`) sind spezifisch für das o.g. Cluster, welches insgesamt aus sechs Sequenzen besteht (39147, 42974, 43036, 43073, 43116, 43126; **Abbildung 28**). Beim Abgleich des Primer-Sets mit der Silva Datenbank (QUAST *et al.* 2013) zeigte sich eine hohe Spezifität der entwickelten Primer für die Zielsequenzen. Diese banden ausschließlich innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* (in der Datenbank vertreten mit 37988 Sequenzen). Bei erlaubten zwei *Mismatches* banden die entwickelten Primer lediglich an 20 der Sequenzen (0,1%), darunter *Anaerosporebacter* (eine Sequenz), *Lachnospiraceae* NK4A136 group (zwei Sequenzen), *Lachnospiraceae* UCG 008 (eine Sequenz) und unkultivierten *Lachnospiraceae* (16 Sequenzen).

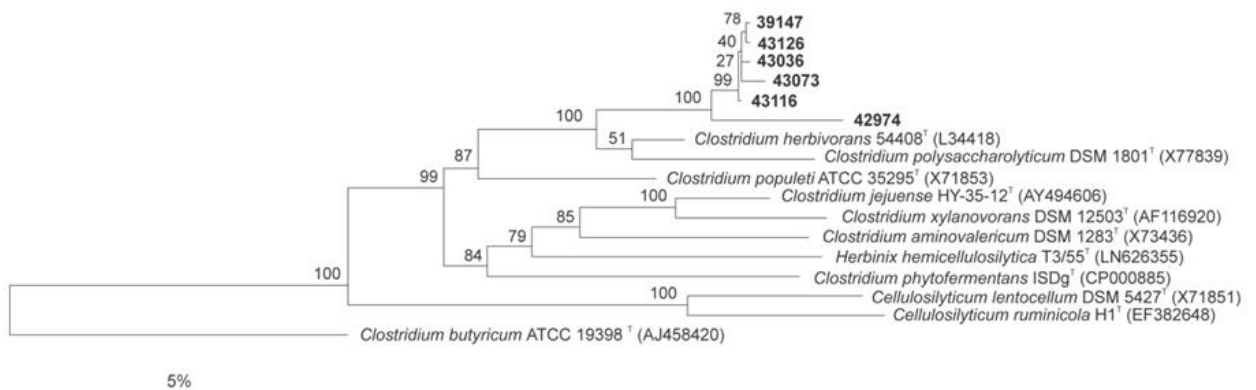


Abbildung 28: Dendrogramm basierend auf 16S rRNA Gensequenzen von Typenstämmen und den für die Entwicklung des Primer-Sets (*Clostridiales*) genutzten sechs Sequenzen (Gensequenzbibliotheken für VR11 und VR23). Das Dendrogramm wurde basierend auf der Neighbor-Joining-Methode und einer Bootstrap-Analyse mit 1.000 Wiederholungen generiert (HAHNKE, pers. Mitteilung).

Mit dem entwickelten qPCR Assay wurden exemplarische Quantifizierungen der ausgewählten Gruppe der *Lachnospiraceae* relativ zu der Gesamtzahl *Bacteria* durchgeführt (**Abbildung 29**). Hierfür wurden zwei Fermentationszustände gegenübergestellt, für alle Reaktoren zeichnete sich die erhöhte Belastung B gegenüber der Belastung A durch einen Einbruch der Biogasproduktion aus. Der Anteil der *Lachnospiraceae* an den *Bacteria* nahm im Fermentationsverlauf mit zunehmender Belastung ab (ca. um eine log-Stufe).

Am Stärksten sind die *Lachnospiraceae* mit einem Anteil von 0,33% der *Bacteria* im Gärrest des ersten mesophilen zweistufigen zweiphasigen Reaktors aufgetreten (**Abbildung 29**, ATB Probe 1M). Die Hemmung des Fermentationsprozesses durch NH_4^+ -Erhöhung hatte zur Folge, dass sich dieser Anteil um mehr als eine Log-Stufe reduziert. In den thermophilen ATB-Reaktoren konnten die *Lachnospiraceae* nach Belastungserhöhung nicht nachgewiesen werden. Bei den thermophilen Gärresten CSTR Proben, wurde ein ebenso starker Abfall der Konzentration, wie in den Proben der zweistufigen zweiphasigen Anlagen festgestellt.

Diese Beobachtung lässt die These zu, dass sich der Anteil der *Lachnospiraceae* an den *Bacteria* immer dann verringert, wenn die Fermentation stark gestresst wird. Eine Ausnahme hiervon stellten lediglich die mesophilen CSTR des Verbundpartners LfL dar, bei welchem in einem Falle sogar eine Zunahme des relativen Anteils zu beobachten war. Das könnte damit begründet sein, dass in den mesophilen CSTR unter diesen Bedingungen eine immer noch relativ effektive Fermentation stattfinden kann.

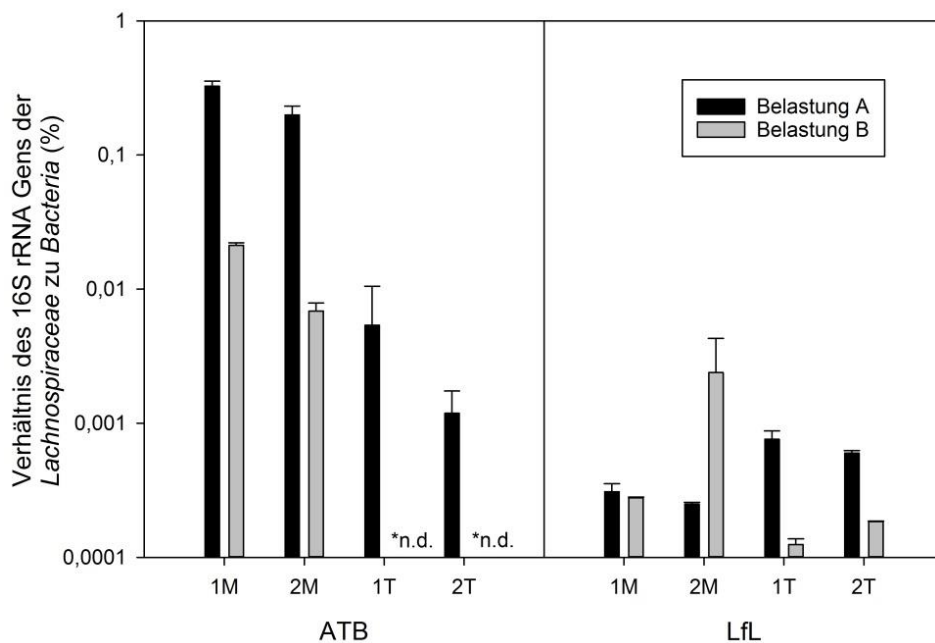


Abbildung 29: Anteil der *Lachnospiraceae* an *Bacteria* (nach YU *et al.* 2005) der Gärreste jeweils zweier mesophiler (M, 37°C) und thermophiler (T, 55°C) zweistufiger zweiphasiger Biogasreaktoren (ATB) und CSTRs (LfL). Es wurden jeweils 2 Zeitpunkte mit unterschiedlicher Belastung (A, B) untersucht. Belastung A: VR23 mit 1500g Grassilage (ATB) bzw. Gärrest vom 03/14 mit $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (M) bzw. 1 (T) $\text{kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ Raumbelastung (LfL); Belastung B: VR32 mit 1500g Grassilage und NH_4^+ -Erhöhung (ATB) bzw. Gärrest vom 07/15 und 08/15 mit $4,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (M) bzw. 2,5 (T) $\text{kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ Raumbelastung (LfL)

Anwendung eines qPCR-Assays (SYBR-Green Assay) für Vertreter der Prevotellaceae:

Mittels der 16S rRNA Gensequenzanalyse (jeweils für 37°C) wurde außerdem ein Cluster innerhalb der *Bacteroidetes* identifiziert, das nur unter erhöhter Substratlast von 1.500 g (VR23, Tag 2) mit ca. 6% aller 16S rRNA Gensequenzen detektiert wurde. Im Vergleich zu der vorherigen Gruppe sind in der Literatur Primer (Prevo1-for 5'-

CACRGTAACGATGGATGCC-3`); Prevo1-rev 5`-GGTCGGGTTGCAGACC-3`) beschrieben, die ohne *Mismatch* an diese Sequenzen binden (BEKELE *et al.* 2010, MATSUKI *et al.* 2004).

Beim Abgleich dieser Primer mit der Silva Datenbank (QUAST *et al.* 2013) zeigte sich, dass sie nicht nur an den o.g. Sequenzen der 16S rRNA Gensequenzbibliothek binden, sondern auch an 55% (3681 von 6071) der Sequenzen in der Silva Datenbank, die zu den *Prevotellaceae* gehören (ohne *Mismatches*). Das Primer-Set ist somit spezifisch für diese Familie, wies allerdings keine weitere Spezifität auf Gattungsebene auf. Bei einem möglichen *Mismatch* (inkl. fünf Basen ohne *Mismatch* am 3`-Ende) wies dieses Primerset jedoch auch Bindungsstellen außerhalb dieser Familie auf (an 0,006% der Sequenzen; bei zwei *Mismatches* an 0,9% der restlichen Sequenzen).

Die Anpassung der in BEKELE *et al.* (2010) und MATSUKI *et al.* (2004) veröffentlichten Assays auf das am Projektpartner ATB befindliche qPCR System stellte sich jedoch als problematisch heraus. Der lineare Zusammenhang zwischen den 10-fachen Verdünnungsstufen der logarithmierten 16S rRNA Genkopien konnte nicht im ausreichend Maß hergestellt werden (**Abbildung 30**). Es kam zur Hemmung der Amplifikation des Standards im Konzentrationsbereich zwischen 10^6 und 10^8 16S rRNA Kopien. Die Assay-Optimierung konnte daher nicht zum Abschluss gebracht werden, die Untersuchung der *Prevotellaceae* wurde nicht fortgeführt.

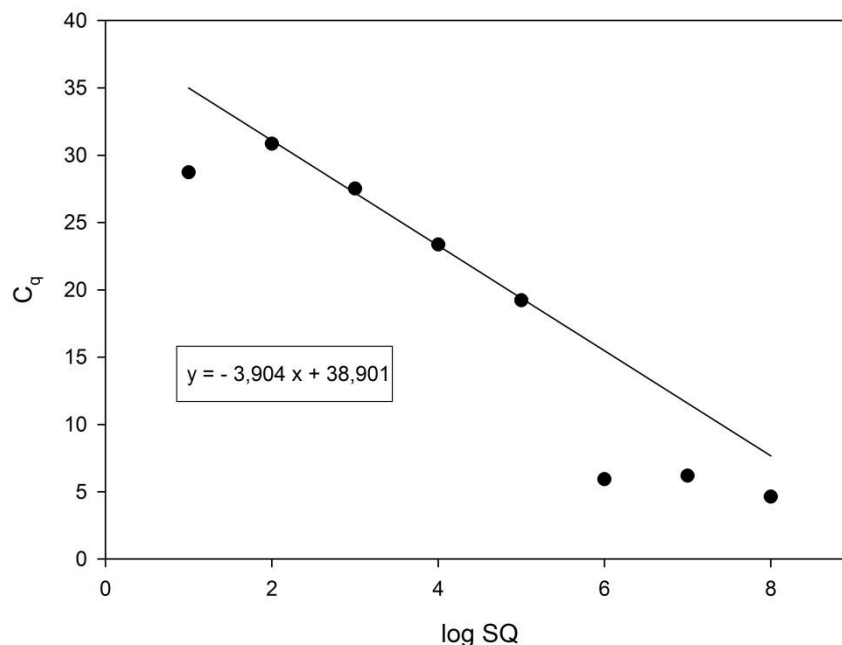


Abbildung 30: Suboptimale Standards (Duplikate) der *Prevotellaceae*, inklusive Hemmung der Amplifikation im Bereich zwischen 10^6 bis 10^8 16S rRNA Kopien. Der theoretische lineare Zusammenhang zwischen log SQ (logarithmierte Start Quantität) des Standards und der C_q-Werte (Quantifizierungszyklus) wurde mithilfe der Linearen dargestellt.

Entwicklung eines qPCR-Assays (SYBR- bzw. TaqMan-Assay) für Vertreter der Familie Porphyromonadaceae:

Mittels der 16S rRNA Gensequenzanalysen (jeweils für 37°C) wurde ein weiteres Cluster innerhalb der *Bacteroidetes* identifiziert, das unter erhöhter Substratlast von 1.500 g (VR23, Tag 2) häufiger (ca. 4% der 16S rRNA Gensequenzen) detektiert wurde als zuvor bei geringerer Substratlast (ca. 1,6%, VR11, Tag 2). Zusätzlich wurde diese Gruppe mittels gDNA-basierter TRFLP-Analyse im Gärrest an Tag 2 mit ca. 13% als auch cDNA-basiert mit ca. 4% der TRFs nachgewiesen (TRF 95, **Abbildung 25**). Dies deutet darauf hin, dass die Vertreter dieses Clusters ebenfalls, wenngleich auch nicht so dominant wie die zuvor erwähnte Gruppe der *Clostridiales* eine Rolle im Abbauprozess der Grassilage übernimmt.

Die Sequenzen liegen mit einer Sequenzähnlichkeit von > 97% innerhalb eines OTUs und wurden mittels Auswertung unter Nutzung der RDP Datenbank den *Porphyromonadaceae* zugeordnet (WANG *et al.* 2007). Interessanterweise bildeten sie innerhalb des in **Abbildung 31** dargestellten Dendrogramms zusammen mit einem durch den Verbundpartner ATB isolierten Stamm (HAHNKE *et al.* 2015, HAHNKE *et al.* 2016) ein eigenes Cluster. Der Stamm gehört zum Phylum *Bacteroidetes* (Familie *Porphyromonadaceae*) und wurde als erste Art der neuen Gattung *Fermentimonas* beschrieben (*Fermentimonas caenicola*) (HAHNKE *et al.* 2016). Die hohen 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten von 98,8% bis zu 99,8% (außer 42979) deuteten darauf hin, dass es sich hierbei um dieselbe Art handeln könnte.

Fermentimonas wurde aus einem CSTR im Labormaßstab, in dem Maissilage zusammen mit Schweine- und Rindergülle fermentiert wurde, isoliert. Aufgrund der durchgeführten Genomsequenzierung (HAHNKE *et al.* 2015) konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die es diesem Stamm erlauben maßgeblich am Abbau von komplexen Kohlenhydraten und Proteinen beteiligt zu sein.

Die entwickelten Primer (Por4_for acgtatgcaacctaccttccacaggag, Por4_rev catgcaaaaartcacacgtgactcact) sind spezifisch für das o.g. Cluster, welches insgesamt aus sieben Sequenzen besteht (**Abbildung 31**; 39185, 40800, 42979, 42995, 43028, 43093, 43111). Zusätzlich wurde für diese Gruppe eine Sonde abgeleitet (Por-Sonde1 ttggtgaggaacggctcaccaaggca), die es ermöglicht TaqMan-Analysen durchzuführen. Beim Abgleich der entwickelten Primer mit der Silva Datenbank (QUAST *et al.* 2013) zeigte sich eine hohe Spezifität für die Zielsequenzen (inkl. *Fermentimonas*). Zusätzlich banden die Primer *in silico* auch an einigen Sequenzen von unkultivierten Bakterien innerhalb der *Porphyromonadaceae* (zu 0,8%). Auch bei möglichen zwei Mismatches wiesen die Primer keine Bindung an Sequenzen von Vertretern anderer Familien auf. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die entwickelte Sonde.

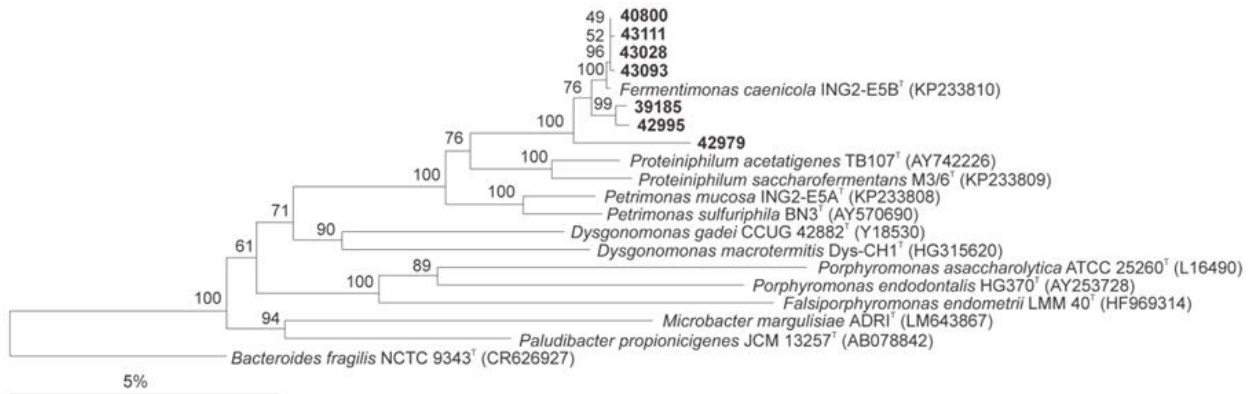


Abbildung 31: Dendrogramm basierend auf 16S rRNA Gensequenzen von Typenstämmen und den für die Entwicklung der Primer genutzten sieben Sequenzen (Gensequenzbibliotheken für VR11 und VR23). Das Dendrogramm wurde basierend auf der Neighbor-Joining-Methode und einer Bootstrap-Analyse mit 1.000 Wiederholungen generiert (HAHNKE, pers. Mitteilung).

Im Unterschied zu dem *Lachnospiraceae* qPCR-Assay wurden mit dem *Porphyromonadaceae* Assay kaum Veränderungen im Verlauf der Belastungszunahme des (NH₄⁺-) Stresses beobachtet (**Abbildung 32**). Sowohl in den Analysen der mesophilen und thermophilen zweiphasigen Reaktorsystemen als auch in den thermophil betriebenen CSTR waren die relativen Anteile der ausgewählten *Porphyromonadaceae* an der Bacteria-Gemeinschaft weitgehend konstant. Eine Ausnahme hiervon stellten jedoch wieder die mesophilen CSTR des Verbundpartners LfL dar, bei welchen ebenfalls wieder eine Zunahme des relativen Anteils unter Stressbedingungen zu beobachten war.

Die Persistenz der *Porphyromonadaceae* könnte in ihrem Stoffwechsel begründet sein. Es ist zu vermuten, dass die detektierten Arten saccharolytische Eigenschaften aufweisen und an den frühen Abbauprozessen insbesondere der leicht abbaubaren Kohlenhydrate teilhaben. Eventuell sind diese Stoffwechselprozesse von den in dieser Studie eingestellten Stressbedingungen weniger betroffen. Alternativ ist auch möglich, dass es sich bei den untersuchten Arten der *Porphyromonadaceae* eher um „stresstolerante“ Arten handelt.

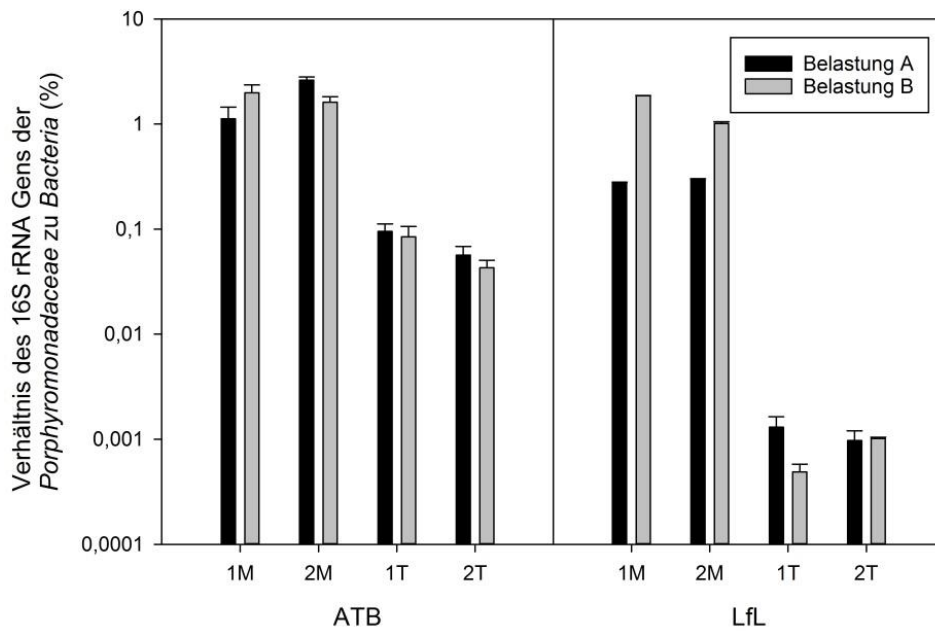


Abbildung 32: Anteil der *Porphyromonadaceae* an *Bacteria* (nach YU *et al.* 2005) der Gärreste jeweils zweier mesophiler (M, 37°C) und thermophiler (T, 55°C) zweistufiger zweiphasiger Biogasreaktoren (ATB) und CSTRs (LfL). Es wurden jeweils 2 Zeitpunkte mit unterschiedlicher Belastung (A, B) untersucht. Belastung A: VR23 mit 1500g Grassilage (ATB) bzw. Gärrest vom 03/14 mit $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (M) bzw. 1 (T) $\text{kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ Raumbelastung (LfL); Belastung B: VR32 mit 1500g Grassilage und NH_4^+ -Erhöhung (ATB) bzw. Gärrest vom 07/15 und 08/15 mit $4,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (M) bzw. 2,5 (T) $\text{kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ Raumbelastung (LfL)

Neben der direkten Anwendung der bereits etablierten Marker und der Entwicklung neuer Marker für prozessrelevante Bakterien kann es auch sinnvoll sein, bestehende Marker als relative Größen zu verwenden. Hierfür wurde das Verhältnis von archaeellen zu bakteriellen 16S rRNA Genkopien bzw. Kopien sowohl auf gDNA-Basis als auch auf RNA-Basis berechnet (**Abbildung 33**).

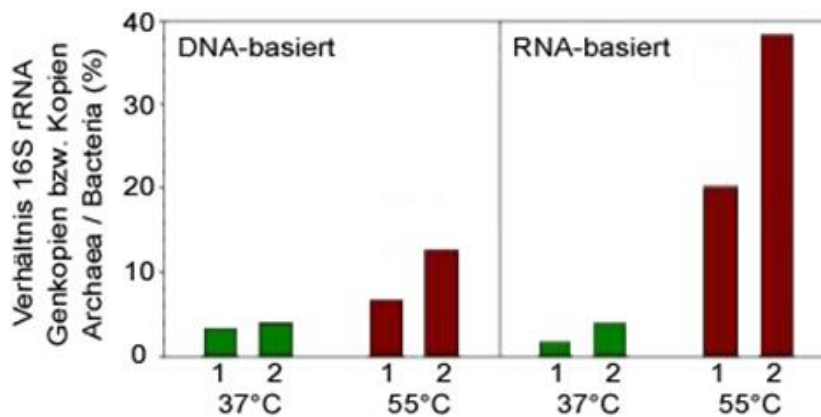


Abbildung 33: Prozentuales Verhältnis von archaeellen zu bakteriellen 16s rRNA Genkopien (DNA-basiert) bzw. Kopien (RNA-basiert). Analysiert wurden Gärreste bei 37°C und 55°C mittels qPCR spezifisch für *Archaea* und *Bacteria*.

Das Verhältnis lag bei der mesophilen Probe sowohl bei der DNA- als auch bei der RNA-basierten Analyse bei durchschnittlich 3 bis 4% bezogen auf die Zahl der bakteriellen 16S rRNA Genkopien. Für die thermophile Probe zeigte sich hingegen ein deutlicher Unterschied zwischen DNA- und RNA-basiertem Ansatz. RNA-basiert war das Verhältnis von *Archaea* zu *Bacteria* um ca. das Dreifache erhöht und zeigte somit Unterschiede in Abhängigkeit von der Art der analysierten Nukleinsäure.

Mit der erfolgreichen Extraktion der rRNA und der Herstellung der cDNA (AP 4.1) ist es außerdem möglich, diese relative Größe auch für das gestresste Reaktorsystem zu untersuchen. Somit wurden entsprechende Analysen der neu entwickelten gruppenspezifischen Assays auch für die mesophilen Gärreste der zweistufigen zweiphasigen Anlage durchgeführt (**Abbildung 34**).

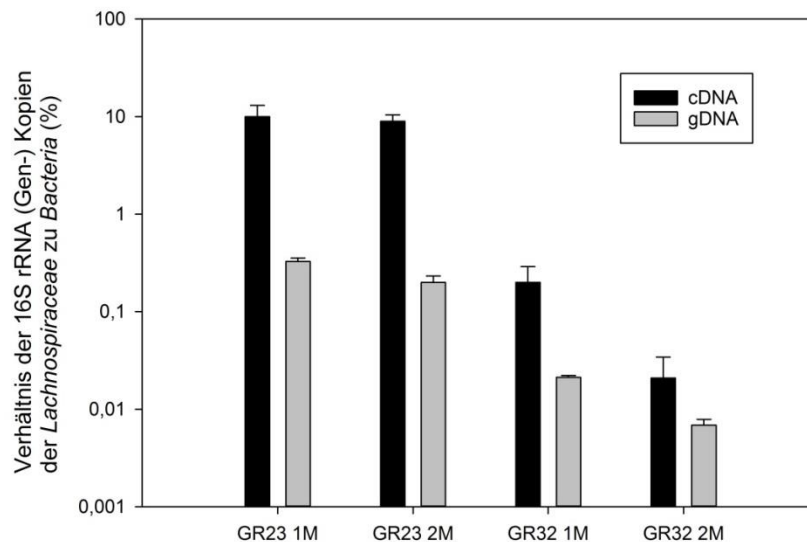


Abbildung 34: Anteil der *Lachnospiraceae* an *Bacteria* (nach YU *et al.* 2005) in den Gärresten jeweils zweier zweistufiger, zweiphasiger mesophiler (M, 37°C) Biogasanlagen auf cDNA (schwarzer Balken) und gDNA (grauer Balken) Basis der 16S rRNA, vor (VR23) und nach (VR32) NH_4^+ -Erhöhung.

Bei der Anwendung des *Lachnospiraceae* Assays wurde im Vergleich zur gDNA bei der Verwendung von cDNA ein deutlich erhöhtes qPCR Signal detektiert. Mehr als eineinhalb log-Stufen lagen zwischen beiden Signalen der VR23 (**Abbildung 34**, Proben GR23 1M und GR23 2M). Dies spricht für eine besonders hohe Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen im Vergleich zu den anderen Arten in der Gemeinschaft. Unter NH_4^+ -Belastung (VR32) nimmt das cDNA basierte qPCR Signal ab, allerdings deutlicher als das gDNA basierte qPCR Signal. Offensichtlich wird die Stoffwechselaktivität dieser Gruppe von Mikroorganismen durch den NH_4^+ -Stress stark beeinträchtigt. Hierdurch und durch die Signalverstärkung sowohl in der Detektion als auch in der prozesstechnisch bedingten Veränderung besitzt das entwickelte Assay ein hohes Potential als diagnostischer funktioneller Marker für das Biogassystem eingesetzt zu werden.

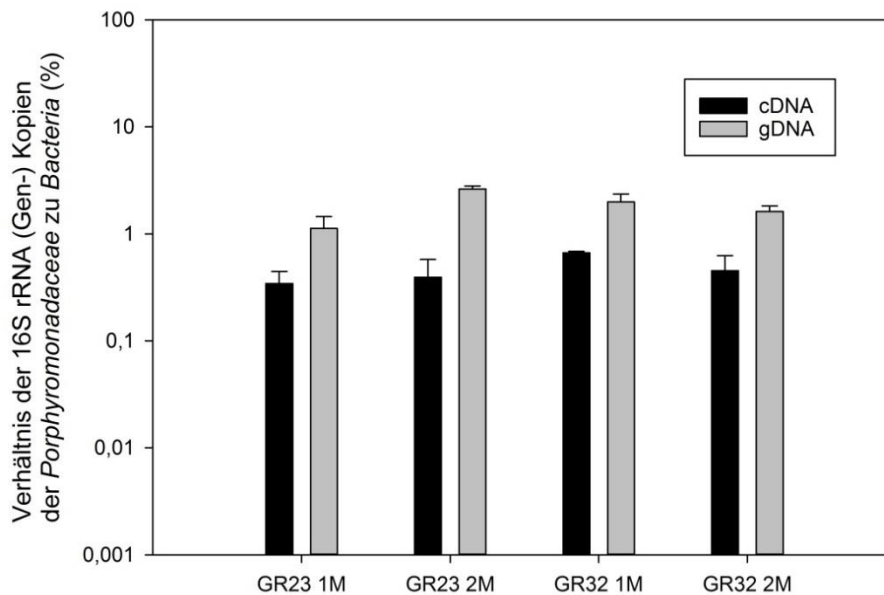


Abbildung 35: Anteil der *Porphyromonadaceae* an *Bacteria* (nach Yu *et al.* 2005) in den Gärresten jeweils zweier zweistufiger, zweiphasiger mesophiler (M, 37°C) Biogasanlagen auf cDNA (schwarzer Balken) und gDNA (grauer Balken) Basis der 16S rRNA, vor (VR23) und nach (VR32) NH_4^+ -Erhöhung.

Im Falle des *Porphyromonadaceae* Assays wurde auf cDNA-Basis ein geringeres qPCR Signals beobachtet, was darauf hinweist, dass es keine starke Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen im Vergleich zu den anderen Arten in der Gemeinschaft gibt. Auch unter NH_4^+ -Belastung verbleibt das *Porphyromonadaceae/Bacteria* Verhältnis (**Abbildung 35**) für beide Nucleinsäuren in einem ähnlichen Verhältnis. Offensichtlich wird die Stoffwechselaktivität dieser Gruppe von Mikroorganismen durch den NH_4^+ -Stress nicht weiter beeinflusst.

Es ist möglich, dass die zu untersuchende Gruppe zu Beginn des Substratabbaus im Batchprozesses aktiv ist. Es ist daher ratsam zu untersuchen, wie sich die Detektion der gruppenspezifischen cDNA unter anderen prozesstechnisch bedingten Veränderungen verhält.

II.1.6 Identifizierung von pathogenen Zielkeimen für die Diagnostik in Metagenom- und Transkriptom-Datensätzen (AP 6.1)

Nach Literaturrecherche und Sichtung der vorhandenen Metagenomstudien, die u.a. von Seiten des Verbundpartners ATB zur Verfügung gestellt wurden, wurde durch den Verbundpartner Beuth Hochschule für Technik Berlin (Beuth-HS) *Xanthomonas translucens* als Zielpathogen ausgewählt. Dieser Phytopathogen ist der Verursacher der bakteriellen Gräserwelke. Für die Verifizierung eines entsprechenden Markersystems wurden der Beuth-HS durch den Verbundpartner ATB Proben der Prozessflüssigkeit von verschiedenen Zeitpunkten einer Fermentation sowie Grassilage und Gärrest zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde von dem Verbundpartner Beuth-HS ein Nachweissystem für *X. translucens* etabliert. Für die weitere Verifizierung dieses Markersystems wurde am ATB ein Versuch zum Nachweis von *X. translucens* während einer Fermentation von Grassilage durchgeführt. Hierzu wurde Grassilage mit *X. translucens* angeimpft und anschließend zusammen mit Inokulum inkubiert. Für diese Versuchsdurchführung wurde das im Rahmen dieses Vorhabens am ATB etablierte AMPT-System genutzt. Der Versuchsansatz inkl. Kontrollen wurde sukzessive beprobt und von dem Partner Beuth-HS mittels des qPCR-Nachweissystems für *X. translucens* analysiert und ausgewertet.

Zusätzlich zu dem Nachweissystem für *X. translucens* wurden weitere Nachweissysteme für *Clostridium sordellii* und *Clostridium difficile* sowie für *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* entwickelt, die im Detail im Schlussbericht der Beuth-HS für Teilvorhaben 5 beschrieben sind.

II.1.7 *Evaluierung der Marker unter Praxis-Bedingungen in der Analyse einer zweiphasigen Praxisanlage (AP 7.1)*

Im Rahmen dieses Arbeitspakets sollten die entwickelten qPCR-Assays unter Praxisbedingungen getestet werden. Hierfür wurden Proben von der zweistufigen zweiphasigen Praxisanlage der Fa. GICON zur Verfügung gestellt. Die Anlage besteht aus sechs Perkolatoren, in denen das Substrat eingebracht wird. Diese stehen über ein Perkolationssystem mit dem Vorlagenbehälter des Methanreaktors in Verbindung, der wiederum mit dem Methanreaktor gekoppelt ist. Das Perkolat aus dem Methanreaktor wird anschließend zurück in die sechs Perkolatoren geleitet.

Die zur Verfügung gestellten Proben stammen aus einem Ansatz, bei dem Grassilage als alleiniges Substrat eingesetzt wurde. Hierfür wurde Perkolat aus dem Ablauf des Methanreaktors zum Startzeitpunkt (Tag 0), sowie Perkolat aus den Perkolatoren an Tag 3 und 17 entnommen. Zusätzlich wurden zum Ende des Versuchsansatzes (Tag 21) Gärrestproben entnommen und wie die restlichen Proben bei -20°C tiefgekühlt. Anschließend erfolgte der Versand zum ATB. Aus den genannten Proben wurde mittels des in 2.1.2 beschriebenen Protokolls für Gärreste und flüssige Proben DNA extrahiert. Anschließend wurden die 16S rRNA Genkopien der *Bacteria*, *Archaea* (Assays nach Yu *et al.* 2005), *Lachnospiraceae* und *Porphyromonadaceae* quantifiziert.

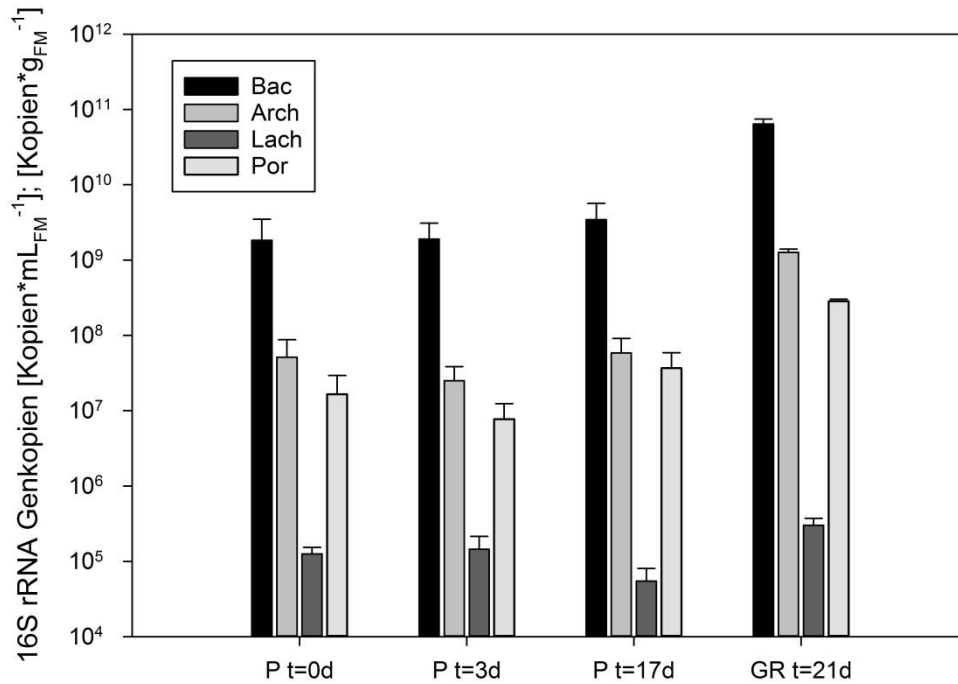


Abbildung 36: 16S rRNA Genkopienzahl der *Bacteria*, *Archea* (nach Yu *et al.* 2005), der *Lachnospiraceae* und der *Porphyromonadaceae* in Perkolatproben (P) an den Tagen 0, 3 und 17 und Gärrestproben (GR) aus der zweistufigen Pilotanlage der Firma GICON.

Während es im Verlauf der 21tägigen Fermentation zu einer Zunahme in der Anzahl an *Bacteria* und methanogenen *Archaea* kommt, ist der relative Anteil an *Lachnospiraceae* und *Porphyromonadaceae* (tendenziell) rückgängig (**Abbildung 36**). Grundsätzlich kommen hierfür zwei Erklärungen in Frage: Zum einen könnte der Rückgang prozess-technisch bedingt sein. Zum anderen könnten die Zielgruppen in Konkurrenz mit anderen Arten stehen und durch diese verdrängt werden. Leider konnten aus Zeitgründen weder cDNA-basierte Assays durchgeführt und noch biologische Replikate untersucht werden, die eventuell zur Klärung dieser Fragen hätten beitragen können.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Arbeiten wurden größtenteils wie geplant durchgeführt. Änderungen bezüglich des Arbeitsprogramms wurden in den einzelnen Zwischenberichten erläutert.

Sofern Änderungen bei den geplanten Investitionen notwendig waren, wurden diese gesondert beantragt und ggf. in den einzelnen Zwischenberichten vermerkt.

Der gesondert zur Verfügung gestellte Verwendungsnachweis beinhaltet die finanzielle Abwicklung des Projektes durch die Buchhaltung des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim (ATB).

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen dieses Projektes konnten eine Reihe neuer Erkenntnisse erzielt werden. Insbesondere die vergleichenden Analysen zur DNA-Analytik (LEBUHN *et al.* 2016) als auch die erfolgreiche Durchführung der Transkriptomanalyse aus den Biogasreaktoren des ATBs sind hier besonders hervorzuheben. Die Analyse des Biogas-Transkriptoms ist eine von wenigen mRNA-basierten Studien in diesem Bereich und bildet eine wesentliche Grundlage für weitreichende Erkenntnisse über die exprimierten Gene im Biogasreaktor bei 37°C bzw. 55°C.

Zudem wird die Entwicklung von Nachweisverfahren für prozessrelevante Bakterien als angemessen und notwendig erachtet um ein molekularbiologisches Monitoring von Biogasanlagen durchführen zu können.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Es wird erwartet, dass die entwickelten Nachweisverfahren für prozessrelevante Bakterien in Zukunft für das Monitoring von Biogas-Praxisanlagen genutzt werden können.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Projektzeitraum sind verschiedene Veröffentlichungen zur Biogasmikrobiologie entstanden. So gibt es u.a. neue Studien zur Anwendung von Biomarkern in Biogassystemen. Beispiele hierfür sind Studien von LI *et al.* oder TRAVERSI *et al.* (beide 2014), die sich auf die Quantifizierung von verschiedenen methanogenen Gruppen konzentrieren. Des Weiteren wurden verschiedene Studien, bei denen der Fokus auf bestimmten Gruppen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft lag (LEBUHN *et al.* 2014, CIBIS *et al.* 2016), veröffentlicht. Insbesondere ging es um verschiedene säurebildende Bakterien sowie um Vertreter der *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae* und *Thermoanaerobacterales*. Die wichtigsten Veröffentlichungen sind im Folgenden aufgeführt.

LEBUHN M, HANREICH A, KLOCKE M, SCHLUTER A, BAUER C, PEREZ CM (2014): Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe* 29:10-21

TRAVERSI D, CAPONE C, VILLA S, VALERIA R, PIETRANGELI B, GILLI G (2014): Assessing Archeal Indicators of Performance by RT-qPCR Methods During Anaerobic Co-digestion of Organic Wastes. *Bioenergy Research* 7(2):720-727

LI YF, CHEN PH, YU ZT (2014): Spatial and temporal variations of microbial community in a mixed plug-flow loop reactor fed with dairy manure. *Microbial Biotechnology* 7(4):332-346

CIBIS KG, GNEIPEL A, KONIG H (2016): Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *Journal of Biotechnology* 220:51-63

Neben den Arbeiten zur Anwendung und Entwicklung von Biomarkern wurden auch Metatranskriptom- bzw. Metagenomstudien veröffentlicht (LI *et al.* 2013, WILKINS *et al.* 2015). Der Fokus lag hierbei allerdings, im Gegensatz zu unseren Analysen, bei der methanogenen Gemeinschaft.

LI A, CHU Y, WANG X, REN L, YU J, LIU X, YAN J, ZHANG L, WU S, LI S (2013): A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnology for Biofuels* 6:3

WILKINS D, LU XY, SHEN ZY, CHEN JP, LEE PKH (2015): Pyrosequencing of *mcrA* and Archaeal 16S rRNA Genes Reveals Diversity and Substrate Preferences of Methanogen Communities in Anaerobic Digesters. *Applied and Environmental Microbiology* 81(2):604-613

Außerdem erschienen Veröffentlichungen zu weiteren Themen, wie RNA-Extraktion, Anwendung von PMA bzw. Isolation neuer Arten, die als wichtige Grundlage für die eigenen Versuche bzw. für die Interpretation der eigenen Ergebnisse herangezogen werden konnten.

STARK L, GIERSCH T, WUNSCHIERS R (2014): Efficiency of RNA extraction from selected bacteria in the context of biogas production and metatranscriptomics. *Anaerobe* 29:85-90

HAHNKE S, MAUS I, WIBBERG D, TOMAZETTO G, PÜHLER A, KLOCKE M, SCHLÜTER A (2015): Complete genome sequence of the novel Porphyromonadaceae bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 193:34–36

HAHNKE S, LANGER T, KOECK DE, KLOCKE M (2016): Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov. isolated from mesophilic lab-scale biogas reactors and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (accepted)

VAN EIJSDEN RGE, STASSEN C, DAENEN L, VAN MULDERSE SE, BAPAT PM, SIEWERS V, GOOSSENS KVV, NIELSEN J, DELVAUX FR, VAN HUMMELEN P, DEVREESE B, WILLAERT RG (2013): A universal fixation method based on quaternary ammonium salts (RNAlater) for omics-technologies: *Saccharomyces cerevisiae* as a case study. *Biotechnology Letters* 35:891-900

VAN FRANKENHUYZEN JK, TREVORS JT, FLEMMING CA, LEE H, HABASH MB (2013): Optimization, validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40:1251–1261

II.6 Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes sind verschiedene Veröffentlichungen auf Tagungen und in Fachzeitschriften erfolgt und weitere in Planung. Eine entsprechende Darstellung der einzelnen Beiträge ist aufgeführt.

Beiträge auf Fachtagungen:

DERENKÓ J, RADEMACHER A, JOST C, KLOCKE M "Microbial community shift during establishment of steady-state biogas fermentation of grass silage", Posterpräsentation, VAAM-Jahrestagung, 1. - 4. März 2015, Marburg

DERENKÓ J, RADEMACHER A, JOST C, KLOCKE M „Entwicklung von molekularen Markern zur Überwachung von Biogasanlagen“, Posterpräsentation und Kurzvortrag, FNR/KTBL-Kongress, 22. - 23. September 2015, Potsdam

KLOCKE M „Bioindikatoren der Biogasfermentation - Entwicklung von molekularen Markern und Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen (realtime) PCR zum Monitoring von prozessrelevanten Mikroorganismen als Frühwarnsysteme für Prozessstörungen.“ Vortrag, BMBF Statusseminar BioProFi, 5. - 6. März 2015, München

Veröffentlichungen:

DERENKÓ J, RADEMACHER A, JOST C, KLOCKE M (2015): „Entwicklung von molekularen Markern zur Überwachung von Biogasanlagen“ in Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven, Hrsg. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt

LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016): "DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison", Bioengineering, 3(1) – article no. 7, online via <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering3010007>

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

- Thema: **Bioindikatoren der Biogasfermentation**
Teilprojekt 2: Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen
- Förderkennzeichen: 03SF0440B
- Zuwendungsempfänger: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Abt. Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
Vöttinger Str. 36
85354 Freising
- Berichtverfasser: Bernhard Munk
Elena Madge-Pimentel
Michael Lebuhn
- Kontakt: Michael Lebuhn
Tel.: 08161/71-3796, Fax: 08161/71-4363
Email: michael.lebuhn@lfl.bayern.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	74
Zusammenfassung	76
Summary	78
1 Ziele	80
1.1 Gesamtziel des Verbundvorhabens	80
1.2 Zielstellungen des Teilprojekts 2	81
1.2.1 Bereich Verfahrenstechnik.....	81
1.2.2 Bereich Mikro-/Molekularbiologie.....	82
1.3 Bezug zum Förderprogramm	84
1.4 Stand der Wissenschaft und Technik zu Arbeitsbeginn	85
1.5 Arbeitsplan	88
2 Material und Methoden	93
2.1 Versuchs- und Praxisanlagen – Technik und Analytik	93
2.1.1 Anlagentechnik und Betrieb	93
2.1.2 Quantitative und qualitative Biogasanalytik.....	94
2.2 Substrate und Substratlogistik; Proben von Gärgemischen	95
2.3 Nasschemische Analysen	96
2.3.1 TM, TS und oTM, oTS	96
2.3.2 Ammoniumstickstoff.....	96
2.3.3 FOS/TAC-Verhältnis	96
2.3.4 pH-Wert	97
2.3.5 Flüchtige Fettsäuren	97
2.3.6 Spuren- und Makroelemente	97

2.4 Molekularbiologische Analytik von Gärgemischen	97
2.4.1 PCR-basierte Ansätze	97
2.4.2 DNA-Extraktion	99
2.4.3 RNA-Stabilisierung und –Extraktion, cDNA-Synthese mit Reverser Transkription und cDNA/DNA-Verhältnisse	99
2.4.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) und Konstruktion von Standards	102
2.4.5 Metabolischer Quotient	105
2.4.6 Direkt-(RT)-PCR-Klonierungen und Analyse der Populationszusammensetzung mittels Amplikon-Sequenzanalysen	105
 3 Ergebnisse	 108
3.1 Bereich Verfahrenstechnik	108
3.2 Bereich Molekularbiologie	113
3.2.1 Standardisierung und Optimierung der Nukleinsäure-Extraktion	113
3.2.2 Aktivitätsparameter Metabolischer Quotient (MQ) und cDNA/DNA-Verhältnisse	120
3.2.3 Quantifizierung von AASF-Bakterien und methanogenen Archaeen	124
3.2.4 Analyse der Gesellschaftszusammensetzung methanogener Archaeen	128
3.2.5 Analyse der Gesellschaftszusammensetzung der AASF-Bakterien	131
3.2.6 Untersuchung von Praxisanlagen	135
3.3 Verwertung	137
3.3.1 Standardisierung von Nukleinsäureextraktionen	137
3.3.2 Mono-Vergärung von Grassilage	137
3.3.3 Frühwarnsysteme zur Prozessdiagnose	138
3.3.4 Bioindikatoren zur Prozessbewertung	138
3.4 Erkenntnisse von Dritten	139
3.5 Veröffentlichungen	139
3.5.1 Schriftliche Veröffentlichungen	139
3.5.2 Mündliche Wissensvermittlung	140
 Literaturverzeichnis	 141

Abkürzungsverzeichnis

AASF	acidogene, acetogene und syntrophe Fettsäure-oxidierende Bakterien
ATB	Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.
AQU	Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
BCN	Biogas Competence Network
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CeBiTec	Center for Biotechnology
CSTR	continuously/completely stirred tank reactor
DNA	deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
FFS	flüchtige Fettsäuren
FKZ	Förderkennzeichen
FM	Frischmasse
FOS/TAC	Verhältnis flüchtiger organischer Säuren zur Karbonat-Pufferkapazität
HR	Hydrolysereaktor
IBMN	Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ILT	Institut für Landtechnik und Tierhaltung
KCl	Kaliumchlorid
LfL	Landesanstalt für Landwirtschaft
MPN	most probable number
MQ	Metabolischer Quotient
mRNA	messenger ribonucleic acid
NawaRo	nachwachsende Rohstoffe
NL	Normliter
OLR	organic loading rate, organische Raumbelastung
oTM	organische Trockenmasse
oTS	organische Trockensubstanz
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Propidiummonoazid
PTJ	Projekträger Jülich

qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RDP	ribosomal database project
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SAO	syntrophe Acetatoxidation
SAOB	syntrophe Acetat oxidierende Bakterien
SCFA	short chained fatty acids
SPOB	syntrophe Propionat oxidierende Bakterien
ss	single stranded, einzelsträngig
TMR	Totale Mischraktion
TP	Teilprojekt
TS	Trockensubstanz
TM	Trockenmasse
TUM	Technische Universität München
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Zusammenfassung

Im Verbundvorhaben „Biogas-Marker“ beschäftigte sich das vorliegende Teilprojekt 2 (TP2) primär mit der bekanntermaßen schwierigen einstufigen meso- und thermophilen Vergärung von Grassilage als Alternative zur Maissilage zur Biogasproduktion. Im verfahrenstechnischen Teil des TP2 galt es, die jeweils 2 parallelen Gärssysteme in den stabilen Betrieb zu führen und in der Folge den Zusammenbruch der biologischen Prozesse zu induzieren. Dabei wurden konventionelle Prozesskennwerte mit nasschemischer und physikalischer Analytik erfasst. Proben der Gärgemische dienten allen Partnern von „Biogas-Marker“ für ihre spezifischen Fragestellungen der Teilprojekte zur Untersuchung. Im mikro/molekularbiologischen Teil des TP2 waren verschiedene Fragestellungen zu bearbeiten: es sollten DNA- und RNA-basierte Nachweise zur Bestimmung aktiver Organismen evaluiert und Nukleinsäure-Extraktionstechniken optimiert werden, es galt, analytische Erfolgskontrollsysteme und spezifische quantitative PCR Assays zu etablieren, Prozessmarker bzw. Bioindikatoren zu identifizieren und entsprechende molekulare Biomarker-Assays zu entwickeln und zu etablieren. Schließlich sollten die Assays zur Früherkennung von Prozessstörungen im Technikums- und Praxismaßstab angewendet und evaluiert werden.

Die parallelen einstufigen meso- und thermophilen Mono-Vergärungen von Grassilage wurden wie im TP2 vorgesehen im Durchflussbetrieb mit Steigerung der organischen Raumbelastung (OLR) durchgeführt. Trotz der hohen Faser- und Ammoniakgehalte konnte ein stabiler Betrieb etabliert werden. Bei relativ geringer OLR, speziell im thermophilen Betrieb, wurden hier hohe spezifische Methanerträge zwischen 350 und 400 NL CH₄ · kg_{oTS}⁻¹ erreicht. Der Trockensubstanzgehalt nahm aber kontinuierlich zu, und es reicherten sich Störstoffe an. Verdünnungen wurden erforderlich, um mechanische Überlastungsschäden zu vermeiden. Durch OLR-Steigerung konnten die thermophilen biologischen Prozesse innerhalb der Projektlaufzeit in den Zusammenbruch geführt werden, für die mesophilen Prozesse zeigte sich zu Projektende eine Prozessstörung, der Prozesszusammenbruch wurde aber nicht erreicht. Auf Basis der Betriebserfahrungen ergibt sich für die Praxis bei sehr hohem Anteil von Gras/Kleegrassilage in der Futtermischung die Empfehlung, die Grassilage periodisch oder anteilmäßig mit N-ärmerem Substrat, z.B. durch Maissilage und/oder Rindergülle, zu substituieren, und das Gärgemisch über ca. 12% TS z.B. mit Wasser oder Prozessflüssigkeit zu verdünnen. Mit den genannten Einschränkungen kann Grassilage als gute Alternative zur Maissilage für die anaerobe Vergärung und die Biogasproduktion dienen.

Hinsichtlich der Optimierung und Standardisierung der Nukleinsäure-Extraktionsprotokolle wurde gezeigt, dass die Konsistenz der Probenmatrix und das Extraktionsziel über die Wahl des optimalen Protokolls entscheiden. Für die quantitative Analytik mit (RT-)qPCR erwies sich das „Lfl-Protokoll“ für viskose (mit Modifikation auch für flüssige) Fermenterproben als besonders geeignet, wie sowohl im verbundübergreifenden Ringversuch zur DNA-Extraktion als auch mit den im TP2 etablierten Erfolgskontrollsystemen „Extraktion dotierter Proben“ und „Verdünnungs-qPCR“ bestätigt wurde. Damit

wird eine verlässliche absolute Quantifizierung bei einer DNA-Wiederfindung von etwa 90% ermöglicht. Das größte Optimierungs-/Entwicklungspotenzial zeigte sich für die Arbeiten mit RNA. Zur Stabilisierung vor allem der sehr labilen mikrobiellen Messenger-RNA nach der Probenahme wurden praktikable Protokolle erarbeitet und vorgestellt, und erste Erfolgskontroll-Untersuchungen mit Standard-Spiking waren erfolgreich. Die Wiederfindung von 35% der dotierten RNA wies aber auch auf Optimierungspotenzial bei der RNA-Extraktion hin, wobei insbesondere zur Reversen Transkription Untersuchungsbedarf besteht. Ein Problem ergab sich für den Bereich RNA-Extraktion für die (Meta)Transkriptom-Analytik (durch TP4), die andere Anforderungen an die Nukleinsäurequalität stellt als die (RT-)qPCR. Trotz Anwendung sehr verschiedener Protokolle konnten diese Anforderungen nicht erfüllt werden, hier besteht besonderer Entwicklungs- und Optimierungsbedarf.

Methanogene Archaeen sind der primäre Flaschenhals der anaeroben Vergärung. Weil sie das energiereiche Methan produzieren und sehr empfindlich auf sich ändernde Prozessbedingungen reagieren, eignen sie sich als Bioindikatoren für verschiedene Prozesszustände. Am Beispiel der methanogenen Archaeen konnte gezeigt werden, dass die Gesellschaftszusammensetzung der Biozöosen auf DNA- (Gesamtpopulation) und cDNA-Ebene (transkriptionelle aktive Population) vor allem im gestressten Betrieb sehr verschieden sein kann. Weil die aktive Fraktion die Leistung des Systems bestimmt sollten künftig verstärkt Transkripte untersucht werden.

In der stabilen thermophilen Mono-Vergärung von Grassilage waren unter den Methanogenen vornehmlich die noch nicht beschriebene Genospecies *Methanoculleus* IIA-2 sp. 2 und daneben *Methanothermobacter wolfeii* transkriptionell aktiv, mesophil war dies die ebenfalls noch nicht beschriebene Genospecies *Methanobacterium* III sp. 4. und daneben *Methanoculleus* III sp. 1 sowie *Methanosarcina* spp.. Aktive Bioindikatoren für den gestressten thermophilen Betrieb waren primär *Methanobacterium* III sp. 4 (offenbar thermotolerant) neben *Methanosarcina* sp. 2 und *Methanothermobacter wolfeii* und für den mesophilen zunehmend *Methanobacterium* III sp. 4 neben dem Aufkommen des noch nicht beschriebenen Genus IV der *Methanobacteriaceae*. Den Befunden zufolge indiziert zunehmende Aktivität dieser Bioindikatoren frühzeitig eine Störung der thermo- bzw. mesophilen Prozesse mit Grassilage.

Der Metabolische Quotient (MQ), ein molekularbiologischer Parameter zur Früherkennung von Prozessstörungen bei der Vergärung von Maissilage, wurde im vorliegenden TP2 auch für die meso- und thermophilen Prozesse mit Grassilage positiv evaluiert. Prinzipiell bestätigte sich die Substrat- und Temperaturunabhängigkeit des Parameters. Auch das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA Verhältnis spiegelte die aktuelle Aktivität der methanogenen Archaeen wider. Am ehesten reagierte aber der Parameter Propionsäure. Gemeinsam mit der Analyse der Bioindikatoren können die zeitlichen Verläufe dieser Parameter zuverlässige Prognosen zu Prozessstörungen ermöglichen und der Praxis helfen, Prozessstörungen und damit einhergehende ökonomische Verluste zu vermeiden.

Summary

The present subproject 2 (TP2) was concerned primarily with the well-known difficult single-stage meso- and thermophilic fermentation of grass silage as an alternative to corn silage for biogas production. In the process engineering part of TP2, the two parallel fermentation systems had to be led into stable operation and subsequently, the collapse of the biological processes was to be induced. Conventional process parameters were recorded with chemical and physical analysis. Samples of the fermentation mixtures were used by all partners of "Biogas-Marker" for their specific questions of the subprojects. In the micro / molecular biology part of the TP2, various questions were to be addressed: DNA- and RNA-based assays for the determination of active organisms were to be evaluated and nucleic acid extraction techniques optimized, analytical success control systems and specific quantitative PCR assays established, bioindicators should be identified and appropriate molecular biomarker assays developed and established. Finally, the assays for the early detection of process disturbances should be applied and evaluated in pilot scale and full-scale biogas plants.

The parallel single-stage meso- and thermophilic mono-fermentations of grass silage were carried out in flow-through operation with an increase in the organic loading rate (OLR), as required in the TP2. Despite the high fiber and ammonia content, a stable operation could be established. With relatively low OLR, especially in thermophilic operation, high specific methane yields between 350 and 400 $L_{STP} CH_4 \cdot kg_{VS}^{-1}$ were achieved. However, the dry substance content increased continuously and inhibitory compounds accumulated. Dilutions were required to avoid mechanical overload damage. Through OLR increase, the thermophilic biological processes were brought to collapse within the project period. The mesophilic processes were brought to disturbance to the project end, but process breakdown was not achieved. On the basis of the operating experience, it is recommended for a very high proportion of grass/clover silage in the feed mixture in practice, to substitute the grass silage periodically or proportionally with N-poorer substrate, e.g. by corn silage and/or bovine manure, and to dilute fermenter sludge over about 12% TS e.g. with water or process liquid. With the mentioned limitations, grass silage can serve as a good alternative to corn silage for anaerobic fermentation and biogas production.

With regard to the optimization and standardization of the nucleic acid extraction protocols, it was shown that the composition of the sample matrix and the intended use decide on the choice of the optimal protocol. For the quantitative analysis with (RT-)qPCR, the "LfL protocol" proved to be particularly suitable for viscous (with modification also for liquid) fermenter samples in the inter-laboratory DNA extraction ring trial as well as with the success control systems "sample spiking" and "dilution qPCR", as established in the TP2. Thus, reliable absolute quantification is possible with a DNA recovery rate of about 90%. The greatest potential for optimization/development was found for the work with RNA. In order to stabilize particularly the very labile microbial messenger RNA after sampling suitable protocols were developed and are presented, and control analyses

with standard spiking were successful. However, the recovery of 35% of the spiked RNA indicated an optimization potential in the RNA extraction process, and particularly the reverse transcription step needs intensified research. A problem has been encountered for RNA extraction destined for (meta)transcriptome analysis (by TP4) which demands different nucleic acid qualities than the (RT-)qPCR. Despite the use of very different protocols, these requirements could not be met in TP2, there is a particular need for further development and optimization.

Methanogenic *Archaea* are the primary bottleneck of anaerobic fermentation. Because they produce the energy source methane and are very sensitive to changing process conditions, they are suitable as bioindicators for various process conditions. The example of the methanogenic archaea showed that the composition of the biocenoses on the DNA (total population) and the cDNA level (transcriptionally active population) can be very different, especially in stressed condition. Since the active fraction determines the performance of the system, transcripts should be analyzed more intensely in future.

In the stable thermophilic mono-fermentation of grass silage, primarily the not yet described genospecies *Methanoculleus* IIA-2 sp. 2 and *Methanothermobacter wolfeii* were transcriptionally active among the methanogens. In the mesophilic processes, it was the not yet described genotypes *Methanobacterium* III sp. 4. along with *Methanoculleus* III sp. 1 and *Methanosarcina* spp. Active bioindicators for the stressed thermophilic operation were primarily *Methanobacterium* III sp. 4 (apparently thermotolerant) besides *Methanosarcina* sp. 2 and *Methanothermobacter wolfeii*, and for the stressed mesophilic processes an increasing portion of *Methanobacterium* III sp. 4 in addition to the advent of the not yet described genus IV of the *Methanobacteriaceae*. According to the findings, increasing activity of these bioindicators is an early indicator of disturbance in the thermophilic and mesophilic processes with grass silage.

The Metabolic Quotient (MQ), a molecular biological parameter developed for the early detection of process disturbances during the fermentation of corn silage, was successfully evaluated in the present TP2 but presented limitations in the meso- and thermophilic processes with grass silage. In principle, the substrate and temperature independency of the parameter was confirmed. In addition to the MQ, the *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA ratio also reflected the actual activity of the methanogenic archaea. However, the parameter propionic acid reacted most readily. Together with the analysis of the bioindicators, the chronological progress of these parameters can provide reliable predictions about process disturbances and help to avoid process disturbances and associated economic losses.

1 Ziele

1.1 Gesamtziel des Verbundvorhabens

Ein grundlegendes Problem der Biogaserzeugung ist, dass die hierbei stattfindenden biochemischen bzw. mikrobiologischen Stoffwandlungsprozesse bislang nur ansatzweise verstanden sind. Der Großteil der beteiligten Mikroorganismen ist unbekannt. Demzufolge sind auch deren StoffwechsellLeistungen bislang kaum wissenschaftlich untersucht. Die Kenntnis der Biogas-Mikrobiologie wird jedoch allgemein als Schlüssel für die weitere technologische Optimierung der Biogasproduktion angesehen.

Nach dem Kenntnisstand zu Projektbeginn konnte davon ausgegangen werden, dass folgenden Gruppen von Mikroorganismen entscheidende Rollen beim anaeroben Abbau von pflanzlicher Biomasse und landwirtschaftlichen Reststoffen zu Biogas bzw. Methan zukommen:

- Cellulolytische und acidogene Bakterien (z.B. bestimmte Clostridien, *Bacteroides*, *Bacilli*)
- Syntrophe, bestimmte Intermediate oxidierende Bakterien („Acetogene“)
- Acetoclastische methanbildende Archaeen
- Hydrogenotrophe methanbildende Archaeen

Im Rahmen des Verbundvorhabens „Biogas-Marker“ sollten molekulare Marker für diese zentralen Gruppen von Mikroorganismen und entsprechende Protokolle zur Anwendung entwickelt werden. Im Einzelnen sollten hierzu folgende Arbeiten umgesetzt werden:

- Prüfung von verschiedenen alternativen Strategien zur Etablierung von molekularen Markern (Nachweis bestimmter taxonomischer Gruppen, Nachweis auf Basis funktioneller Gene bzw. Enzyme, Ableitung von proportionalen Größen)
- Prüfung der Alternativen DNA- und RNA- bzw. cDNA-basierter Nachweis und der jeweiligen Komplementarität zur Bestimmung metabolisch aktiver Zellkonzentrationen
- Prüfung der Verwendung von Propidiummonoazid (PMA) zum Ausschluss geschädigter Zellen als Alternative zu einem RNA-basierten Nachweis (primär Aufgabe TP1, ATB)
- Optimierung der Protokolle zur Präparation der Biomoleküle (Zelllyse, Nukleinsäureextraktion und -reinigung)
- Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen („realtime“) PCR (qPCR)
- Etablierung von Strategien zur Kontrolle des Erfolgs der Präparation und der Nachweisreaktion (standardisierte Protokolle, interne Kontrollen, Spiking-Experimente)
- Identifizierung von Biomarkern (i.e. mikrobiellen Bioindikatoren)
- Anwendung der entwickelten Assays zur Früherkennung von Prozessstörungen im Technikums- und Praxismaßstab.

Der Verbund sollte nicht nur die mikrobiologische „black box“ der Biogasproduktion weiter erhellen. Insbesondere sollten die Vorgänge bei der problematischen Grassilage-Vergärung untersucht und Erkenntnisse zu den in den verschiedenen Prozesszuständen aktiven Mikroorganismen gewonnen werden. Dabei wurden von zwei Einrichtungen (ATB und LfL) unterschiedliche Vergärungsverfahren eingesetzt. Während ATB im Teilprojekt 1 (TP1) ein zweiphasiges Konzept einsetzte, verwendete die LfL im vorliegenden TP2 die einphasige Prozessführung. In beiden Teilvorhaben wurde ein Schwerpunkt auf die Vergärung des stickstoffreichen Substrats Grassilage und die Induktion einer damit verbundenen Prozessstörung gelegt.

Weiterhin sollten mit den Arbeiten im Verbund grundsätzliche Hindernisse in der Entwicklung und Anwendung biologischer Sensorsysteme überwunden werden. Die Bereitstellung entsprechender Detektionssysteme sollte eine verbesserte und zeitnahe Verfolgung der am Biogasprozess beteiligten mikrobiologischen Gemeinschaften sowie ihrer Dynamiken ermöglichen. Es sollten auch molekularbiologische Marker entwickelt bzw. evaluiert werden, die sich zur Prozessdiagnose eignen. Deren Anwendung sollte es ermöglichen, den Prozesszustand und –störungen frühzeitig zu erkennen und damit ein rechtzeitiges (meist verfahrenstechnisches) Eingreifen zu ermöglichen.

1.2 Zielstellungen des Teilprojekts 2 (TP2)

Die Vergärung von Grassilage stellt nicht nur besondere Ansprüche an die Verfahrenstechnik und die Stressresistenz der Mikroorganismen u.a. gegenüber NH_3 (ANDRADE *et al.* 2009b, EFFENBERGER *et al.* 2011). Erschwerend kommt für die Prozesssteuerung hinzu, dass die Akteure der Vergärung von Gras-/Kleegrassilage zu Biogas kaum bekannt sind und ihr Metabolismus sowie ihr Verhalten den Stressoren gegenüber noch viel weniger untersucht ist. Eine Prozesssteuerung anhand relevanter und frühzeitig reagierender Analyseparameter und Abgleich mit aussagekräftigen Prozesskennwerten („benchmarks“) ist aber essentiell. Ohne solche Erfahrungen besteht ständig die Gefahr eines Prozesszusammenbruchs, u.U. mit Einbußen für den Betreiber und u.U. auch mit negativen ökologischen Auswirkungen.

In der Zusammenschau der konventionellen Prozesskennwerte mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen sollten geeignete Frühwarnsysteme insbesondere in Form molekularbiologischer Marker für beginnende Prozessstörungen gefunden und etabliert werden. Schließlich galt es auch, Gründe für den Zusammenbruch zu finden und Vermeidungsstrategien zu definieren. Im Folgenden sind die Zielstellungen des TP2 in den beiden Bereichen Verfahrenstechnik (s. 1.2.1) und Mikro/Molekularbiologie (s. 1.2.2) konkretisiert.

1.2.1 Bereich Verfahrenstechnik

Im Bereich Verfahrenstechnik sollten der einphasige Betrieb mit Gras-/Kleegrassilage mesophil und thermophil so gestaltet werden, dass ein Langzeitbetrieb und damit auch

eine sinnbringende mikro/molekularbiologische Analyse unterschiedlicher Prozesszustände möglich war. Darüber hinaus sollten keine eigenständigen verfahrenstechnischen Fragestellungen geklärt werden. Die Fermenter wurden daher im Rahmen des Arbeitspakets 1 in den steady-state und in der Folge sukzessiv in den Stresszustand gebracht.

(1) Regel-/Langzeitbetrieb:

Hierfür wurden 2 mesophil (38°C) und 2 thermophil (50 – 55°C) mit Grassilage betriebene einstufig/einphasige Durchflussfermenter (32 L) an LfL-ILT in den steady-state Betrieb geführt, um die mikrobiellen Populationen im Regelzustand zu beproben und zu charakterisieren. Relevante Kennwerte der Prozesschemie und der Gasproduktion wurden regelmäßig bzw. kontinuierlich erfasst.

(2) Betrieb im Stresszustand und Prozesszusammenbruch:

Nach der Datenaufnahme im Regelbetrieb wurden die Fermenter durch kontinuierliche Steigerung der organischen Raumbelastung (OLR) in den Stresszustand gebracht und sollten schließlich in den Prozesszusammenbruch geführt werden. Relevante Kennwerte der Prozesschemie und der Gasproduktion wurden auch hier regelmäßig bzw. kontinuierlich erfasst.

Aus diesen Zuständen der Gärgemische wurden Proben genommen und mikro- und molekularbiologisch untersucht, um die molekularbiologischen Frühwarnsysteme zu entwickeln.

1.2.2 Bereich Mikro/Molekularbiologie

Die Mikroorganismen-Populationen wurden in den an der LfL mesophil bzw. thermophil einphasig betriebenen Grassilagefermentern (s. 1.2.1, 2.1) mit Fokus auf methanogene Archaeen und Bakterien des intermediären Metabolismus (AASF, acidogene, acetogene und syntrophe Fettsäureoxidierer; Sekundärfermentierer) analysiert. Die relevanten Biomarker bzw. Bioindikatoren in den verschiedenen Gilden sollten mit den molekularen Prozessmarkern anhand ihrer unterschiedlichen Präsenz bzw. Aktivität im stabilen Betrieb und in der Prozessstörung identifiziert werden. Dabei wurde auf den Ergebnissen aus vorangegangenen Untersuchungen (LEBUHN *et al.* 2010, FRÖSCHLE *et al.* 2011, MUNK *et al.* 2012) aufgebaut. Weiterhin hatte die Analyse des syntrophen Abbaus kurzkettiger Fettsäuren in den letzten Jahren erheblichen Fortschritt gemacht, weswegen die Sekundärfermentierer in das Arbeitsprogramm des TP2 mit aufgenommen wurden.

Das TP2 war an den mikro- und molekularbiologischen Fragestellungen des Gesamtverbands mit folgenden spezifischen Zielen im chronologischen Ablauf der geplanten Arbeiten beteiligt:

- (1) Evaluierung des DNA- und RNA-basierten Nachweises zur Bestimmung aktiver Organismen:

TP2 war auf den Nachweis funktioneller Gruppen von Mikroorganismen fokussiert und zielte daher auf den quantitativen Nachweis von mRNA für Schlüsselenzyme in Form von umgeschriebener cDNA im Verhältnis zur Konzentration der zugehörigen DNA ab (cDNA/DNA- bzw. Transkript/Gen-Verhältnis). Je höher das Verhältnis ist, desto aktiver ist die betrachtete Gilde.

Inbegriffen in die Evaluierung des nukleinsäurebasierten Nachweises waren die bei (2) und (3) genannte Evaluierung der Nukleinsäure-Extraktionseffizienzen und der Effizienz der Reversen Transkription (RT). Hierfür ist der Einsatz quantitativer PCR-Analytik (5) erforderlich. Diese Ansätze sollten im Rahmen des TP2 bearbeitet werden.

- (2) Optimierung der Nukleinsäureextraktion:

Optimierungsbedarf bestand hinsichtlich einer möglichst vollständigen spezifischen Extraktion mikrobieller (*Bacteria*, *Archaea*) mRNA aus Fermenterproben (DNA ist in dieser Hinsicht weniger kritisch) auch bei Einsatz größerer Probenmengen als zu Beginn der Arbeiten möglich. Hierzu sollten die TP2-Arbeiten beitragen.

- (3) Etablierung von analytischen Erfolgskontrollsystemen:

Solche Systeme waren zwar für den Schritt der (q)PCR-Analytik entwickelt, sie fehlten aber größtenteils noch für die (m)RNA-Extraktion und die Reverse Transkription. Daher sollten die entsprechenden Effizienzen über Standard-Spiking Experimente mit quantitativer Analytik (5) im TP2 bestimmt werden.

Die Ergebnisse waren für die Bestimmung der Konzentration der Zielmoleküle bzw. –organismen in der untersuchten Probe essentiell.

- (4) Optional: Eignung von Propidiummonoazid zum Ausschluss geschädigter Zellen:

Dieser Ansatz sollte im Rahmen des TP2 durch einen Vergleich mit einer parallelen cDNA/DNA-Untersuchung (1) quantitativ evaluiert werden, wenn sich aus den Arbeiten von ATB (TP1) ein entsprechender Bedarf ergab. Nachdem ATB auf dem zweiten Statusseminar negative Ergebnisse mit Propidiummonoazid berichtete, wurde dieser Punkt aus den Arbeiten des TP2 gestrichen.

- (5) Etablierung von quantitativen PCR Assays:

Quantitative Bestimmungen sind die Grundlage jeder Effizienzbetrachtung, und waren damit auch die Basis der bei (1) bis (4), (7) und (8) genannten Zielsetzungen. Die Etablierung solcher qPCR- und insbesondere RT-qPCR-Assays hatte grundlegende Bedeutung für die oben genannten Arbeiten im TP2, die solche Assays verwendeten.

- (6) Identifizierung von Prozessmarkern:

Zur molekularen Früherkennung von Prozessstörungen (8) mussten zunächst die Schlüsselprozesse und -akteure im syntrophen Fettsäureumsatz (Gilden der AASF-Bakterien) und in der Methanogenese (Gilden der methanogene Archaeen) im ein-

phasigen mesophilen und thermophilen Betrieb mit Grassilage identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe sequenzierungsbasierter Techniken. Innerhalb des TP2 erstellte AQU dabei ein System mit eigenen Sequenzanalysen auf Basis von RT-PCR-Klonierungen. Weiterhin sollten in Zusammenarbeit mit dem TP4 Vergleiche Metatranskriptom-Analysen gleicher Proben durchgeführt werden.

Darüber hinaus sollte in Zusammenarbeit mit dem TP1 geprüft werden, in wie weit die im TP2 erhaltenen Ergebnisse mit den Analysen phylogenetischer („taxonomischer“) Gruppen (*rrs*-Analyse) übereinstimmen (Darstellung erfolgt im Verbundbericht).

(7) Entwicklung und Etablierung von molekularen Biomarker-Assays:

Weiterhin galt es, unter den Prozessmarkern (6) die Biomarker zu identifizieren, die frühzeitig bei Prozessstörungen reagieren und sich damit zur Früherkennung von Prozessstörungen (8) eignen.

Für solche Gilden sollten quantitative qPCR- und RT-qPCR-Assays entwickelt, evaluiert und etabliert werden. Spezifische cDNA/DNA-Verhältnisse (1) sollten bestimmt und damit die spezifische Transkriptionsaktivität der Zielorganismen verfolgt werden.

(8) Die Assays zur Früherkennung von Prozessstörungen und Evaluierung sollten im Technikums- und Praxismaßstab angewendet und evaluiert werden.

1.3 Bezug zum Förderprogramm

Der beantragte Forschungsverbund war im Bereich der mikrobiologischen Grundlagenforschung zur Biogaserzeugung angesiedelt. In diesem Verbund sollten die Grundlagen zur Nutzung molekularer, DNA- und RNA-basierter Marker zum Nachweis und zur Verfolgung von Mikroorganismengruppen mit wesentlicher Bedeutung für den anaeroben Abbau von Biomasse und die Generierung von Biogas, insbesondere von Methan, geschaffen werden. Mittels solcher Marker sollte ein verbessertes Monitoring der mikrobiellen Gemeinschaft möglich sein, sowohl bei der Entwicklung von neuartigen verfahrenstechnischen Lösungen zur Biogaserzeugung wie auch bei der Optimierung der Prozessführung in der Praxis.

Molekulare Marker für funktionelle bzw. taxonomische Gruppen von für die Biogasbildung wichtigen Mikroorganismen sowie die Etablierung standardisierter Protokolle erleichtern die Aufklärung mikrobiologischer und biochemischer Zusammenhänge bei Biogasfermentationen. Hierbei ist die Verfolgung der Entwicklung der mikrobiellen Biozönose unter Stressbedingungen, die im Extremfall zum Ausfall wichtiger funktioneller Gruppen von Mikroorganismen und damit von der Methanbildung führen können, von vorrangiger Bedeutung. Wegen der Möglichkeit, bestimmte mikrobielle Gilden spezifisch nachzuweisen, bieten molekulare Marker ergänzend zu den bisher verfügbaren chemisch/physikalischen Messgrößen grundsätzlich das Potential zur Entwicklung von biologischen Sensoren zur Überwachung der Biogasfermentation. Neben der Prüfung von verschiedenen Strategien zur Entwicklung von molekularbiologischen Markern war daher auch die mikrobiologische Untersuchung von kritischen Prozesszuständen mittels

dieser Markersysteme Forschungsgegenstand des beantragten Verbundes. Zur besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse sollten sowohl klassische einphasige wie auch neuartige zweiphasige Biogasfermentationen betrachtet werden.

Molekulare Marker lassen sich auch zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen nutzen. In der Öffentlichkeit wurden in jüngster Zeit verstärkt Fragen zum mikrobiologischen Risiko der Biogasgärung und zur Verwendung von Gärresten gestellt. Im Rahmen eines Satellitenprojektes, angesiedelt an einer technischen Fachhochschule, sollten die im Rahmen dieses Verbundes erarbeiteten Protokolle zur Isolierung von Biomolekülen und zur Standardisierung von qPCR-Routinen genutzt werden, um molekulare Marker für (potentielle) Pathogene zu entwickeln. Weiterhin sollten die anfallenden Daten zur Prozessmikrobiologie den Partnern im Biogas Competence Network (BCN) u.a. zur Modellierung der Biogasfermentation zur Verfügung gestellt werden.

Weitere Ziele des Verbundes waren die Förderung des Nachwuchses sowie der Aufbau von europäischen Forschungsnetzwerken zur Biogasmikrobiologie.

Das Vorhaben war Teil des *Biogas Competence Network – BCN* als Nachfolger des Verbundvorhabens *Biogas Crops Network*, welches im Rahmen des Schwerpunktprogrammes *Netzwerke Grundlagenforschung erneuerbare Energien und rationelle Energieanwendung* mit Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), vertreten durch den Projektträger Jülich (PTJ), eingerichtet wurde (FKZ: 03SF0317). Die Antragsteller waren ebenfalls beteiligt an den Verbundvorhaben des BMBF-Förderprogramms *BioEnergie2021 BiogasPlusProjekt – BPP* (FKZ: 03SF0349) und *Bioraffinerie-Modul zum gerichteten-fermentativen Aufschluss von Biomasse für eine kombinierte energetische und stoffliche Verwertung – FABES* (FKZ: 03SF0346).

1.4 Stand der Wissenschaft und Technik zu Arbeitsbeginn

Die Produktion von methanhaltigem Biogas aus landwirtschaftlichen Reststoffen und Pflanzenmaterial ist ein wesentlicher Bestandteil in der nachhaltigen und CO₂-neutralen Landbewirtschaftung und Energieproduktion. Am häufigsten wurden in Biogasreaktoren nachwachsende Rohstoffe wie Maissilage, Körnergetreide, Grassilage und Getreide-Ganzpflanzensilagen vergoren, entweder als ausschließliches Substrat oder in Kombination mit Wirtschaftsdüngern wie Rinder- oder Schweinegülle. Es war zu erwarten, dass diesen Substraten weiterhin große Bedeutung zukommen würde.

In Biogasanlagen führt eine komplexe und dynamische mikrobielle Biozönose den Aufschluss und Abbau der organischen Biomasse zu Biogas durch (**Abbildung 1**). Die in pflanzlicher Biomasse gespeicherten langkettigen Kohlenhydrate wie z.B. Cellulose oder Hemicellulose werden dabei in Oligo- und Monomere der jeweiligen Zuckerverbindungen gespalten (Hydrolyse) und in der Folge zu Säuren, Alkoholen und anderen Intermediaten umgesetzt. Ein zentrales Produkt der Acetogenese ist Essigsäure, welche im Weiteren entweder in Methan und Kohlendioxid gespalten (acetoklastische Methanogenese) oder zu Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff oxidiert (syntrophe Ace-

tat-Oxidation) wird. Auch letztere Produkte können zu Methan und Wasser umgesetzt werden (hydrogenotrophe Methanogenese). Methan ist die energieliefernde Komponente des Biogases und kann unter optimalen Bedingungen bis zu 80% des Biogases ausmachen.

Es war bekannt, dass verschiedene Ursachen wie z.B. Spurenelementmangel oder hohe Ammoniakgehalte die Biomethanisierung stören können. Je nach Art der Störung können die Störgrößen an unterschiedlichen Teilschritten (vgl. **Abbildung 1**) wirksam werden, allerdings ist vielen Berichten zufolge der letzte Schritt, die Methanogenese (insbesondere die acetoklastische Methanogenese) besonders empfindlich. Die Hemmung der Methanogenese bewirkt zunächst eine Anhäufung von Intermediaten und kann durch Feedback-Hemmung der vorhergehenden Reaktionen den Substratabbau und den Prozess komplett zum Erliegen bringen. Neben den methanogenen Archaeen sind die syntroph Acetat oder auch Propionat oxidierenden Bakterien (SAOB, SPOB), die diese thermodynamisch ungünstigen Teilschritte durchführen und damit an der Grenze möglicher Energiegewinnung leben (SCHINK 1997), besonders sensibel und störungsanfällig.

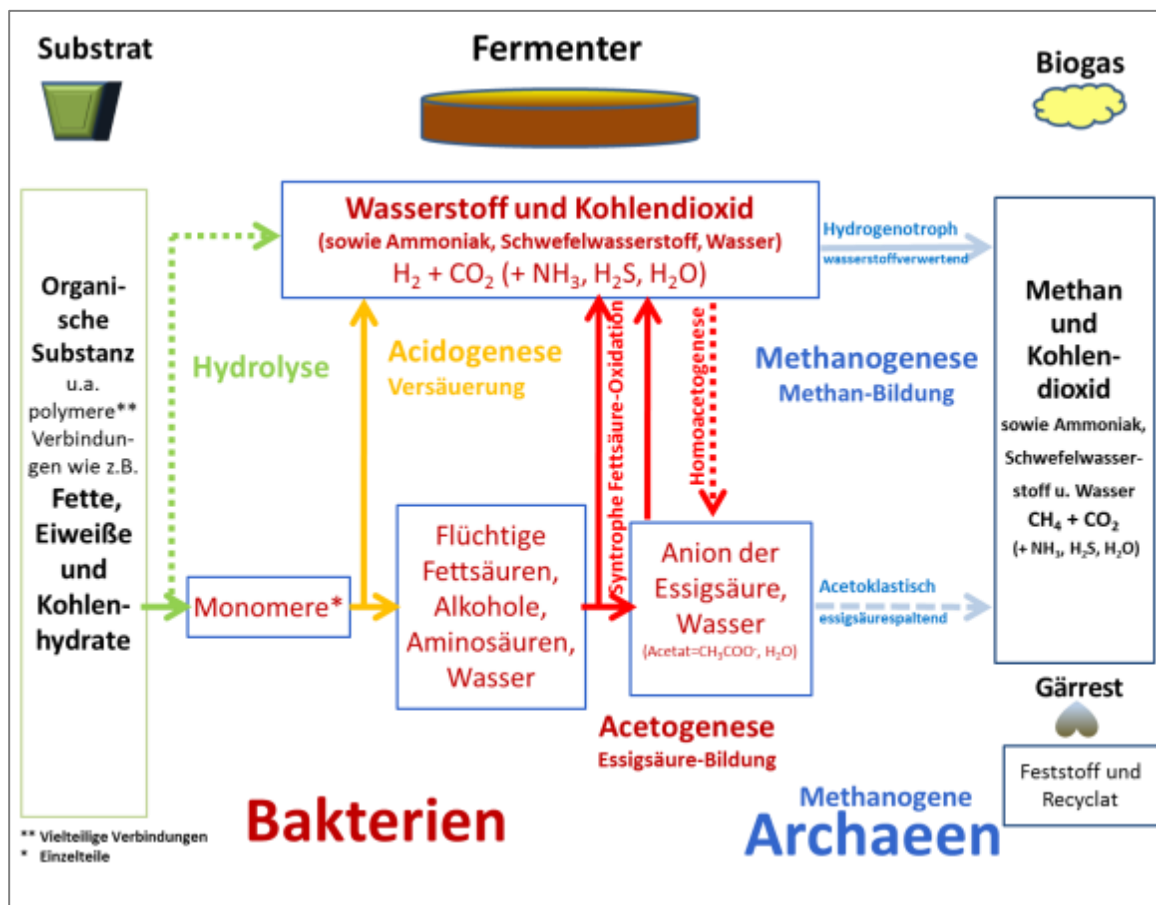


Abbildung 1: Prozessmodell Biogas (SCHIEDER *et al.* 2010)

Trotz stark intensivierter Forschung in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten und einer Vielzahl wichtiger Erkenntnisse wird die Biogas-Mikrobiologie im Allgemeinen noch als „*black box*“, also als weitgehend unbekannter Mikrokosmos wahrgenommen. Dennoch wird die Aufklärung der mikrobiellen Zusammenhänge allgemein als Schlüssel für die weitere verfahrenstechnische Optimierung der Biogasfermentation angesehen. So weist eine Studie des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) zu den Schwerpunkten für Forschung und Entwicklung in den Energietechnologien für den Bereich der Biogasproduktion explizit auf den Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Analyse der Stoffwechselvorgänge und der beteiligten Organismen sowie den notwendigen Anpassungen der Verfahren an die Anforderungen der Biozönose hin (BMWi 2010: Energietechnologien 2050 – Schwerpunkte für Forschung und Entwicklung. S. 142).

Besonders die kultivierungsbasierte mikrobiologische Analytik wird jedoch dadurch erschwert, dass (1) die mikrobiologische Gemeinschaft aus einer Vielzahl unterschiedlichster Arten von Mikroorganismen besteht, die aufgrund der anaeroben Lebensweise, spezialisierter Nährstoffanforderungen und syntropher bzw. symbiotischer Wechselbeziehungen häufig nicht oder nur schwer kultivierbar sind, und auch daher (2) viele der auftretenden Arten bislang weder taxonomisch noch physiologisch beschrieben sind, weil (3) die mikrobiologische Gemeinschaft zeitlich und in Abhängigkeit der Betriebsweise des Biogasreaktors stark variieren kann, weil (4) die Kultivierung sehr aufwändig und zeitraubend werden kann und weil (5) die nötigen Kultivierungsbedingungen für die meisten anaeroben Mikroorganismen nicht bekannt sind, weswegen über Kultivierung erzielte Ergebnisse meist verschoben oder verfälscht sind („*great plate count anomaly*“, STALEY & KONOPKA 1985).

Besonders mithilfe der molekularbiologischen Analytik konnten in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse zu den Prozessabläufen erzielt werden. Es erscheint nun zunehmend möglich, die „*black box*“ der Biogas-Mikrobiologie zu entschlüsseln. Verschiedene kulturunabhängige Hochdurchsatzverfahren zur molekularen Analyse wurden etabliert, die die Analyse von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften ermöglichen. Hierzu zählen insbesondere sogenannte OMIK-Technologien, wie Genomik (Analyse des gesamten Erbguts einer Zelle), Transkriptomik (Analyse der Transkripte, der in (m)RNA umgeschriebenen Gene einer Zelle), Proteomik (Analyse der Proteine in einer Zelle) und Metabolomik (Analyse des Stoffwechsels einer Zelle). Zur Aufklärung komplexer mikrobieller Strukturen können solche Hochdurchsatzverfahren auch als Meta-Analyse eingesetzt werden z.B. zur Entschlüsselung des gesamten Erbgutes einer mikrobiellen Gemeinschaft (Metagenomik). Die mit diesen Methoden erhaltene genetische Information zu physiologischen Fähigkeiten ist auch insofern äußerst wertvoll, da damit zur Anzucht bislang nicht kultivierbarer Mikroorganismen neue Kultivierungsmethoden spezifisch gestaltet werden können.

Neben der Information, welche Mikroorganismen bzw. physiologischen Gruppen im betrachteten Prozess zugegen und aktiv sind, ist die Angabe, wie abundant und wie aktiv diese Organismen zum betrachteten Zeitpunkt sind, besonders wichtig. Mit bioinformatisch maßgeschneiderten Primern und Sonden lassen sich bestimmte Zielgruppen,

-Kladen oder -Gilden mit Quantitativer Real-Time PCR (qPCR, HEID *et al.* 1996) quantitativ erfassen. Dies kann auf DNA-Ebene erfolgen, wobei die DNA von Proben extrahiert und analysiert wird, oder auf RNA-Ebene, wobei zunächst RNA extrahiert und DNA verdaut wird. RNA (insbesondere mRNA) muss wegen ihrer Labilität stabilisiert oder sehr schnell extrahiert werden (s. 2.4.3), um vor allem bei quantitativen Analysen keine verzerrten Ergebnisse zu produzieren. Die RNA wird dann über Reverse Transkription (RT) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und dann mit qPCR quantifiziert. Die zur relativen Quantifizierung von Transkriptionsaktivitäten geeignete Analytik (RT-qPCR) barg allerdings besonders hinsichtlich der Stabilität von Messenger-RNA (mRNA) zu Beginn des Forschungsvorhabens noch technische Herausforderungen (FREEMAN *et al.* 1999). Auch zu diesem Punkt sollten die Arbeiten Verbesserungen bringen (s. 1.2.2).

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität bestimmter mikrobieller Gilden, z.B. der methanogenen Archaeen, eignen sich die mit RT-qPCR und qPCR ermittelten Transkript/Gen- bzw. cDNA/DNA-Verhältnisse am besten. Mit diesen Parametern kann die Leistungsfähigkeit der betrachteten Gilde im beprobten Gärgemisch bestimmt werden (FREITAG & PROSSER 2009, WATANABE *et al.* 2009). Ersten Ergebnissen zufolge lässt sich die Information zur aktuellen spezifischen transkriptionellen Aktivität ähnlich wie der Verlauf des Metabolischen Quotienten (MQ) im Vergleich mit Daten aus bekannten Prozesszuständen zur Prozessdiagnose und zur Prozesssteuerung nutzen (MUNK *et al.* 2012, LEBUHN *et al.* 2014a). Dies ließ sich in den genannten Arbeiten zumindest für die mesophile Vergärung von Maissilage darstellen. Dabei bietet die Bestimmung des *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnisses den Vorteil, dass im Gegensatz zum MQ keine Angaben zur Methanproduktion für die Aktivitätsdiagnose erforderlich sind. Für die bislang geprüfte mesophile Vergärung von Maissilage ergaben sich für den MQ Werte im Normalbereich zwischen 0,1 und 4 und für das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis zwischen 0,1 und 1 (MUNK *et al.* 2012, LEBUHN *et al.* 2014a). Werte darunter zeigen Unterforderung im betrachteten Zustand und Werte darüber Überforderung bzw. metabolischen Stress an.

Ob die cDNA/DNA-Verhältnisse und der MQ auch für die Prozessdiagnose bei der mesophilen und der thermophilen Vergärung von Grassilage eingesetzt und eventuell sogar hier als Frühwarnsystem vor Prozessstörungen genutzt werden kann, sollte im vorliegenden Forschungsvorhaben ermittelt werden (vgl. 1.2.2).

1.5 Arbeitsplan

Im Folgenden sind die gesamten Arbeitsinhalte der einzelnen Arbeitspakete von Biogas-Marker beschrieben. Dadurch lassen sich die spezifischen Beiträge der LfL besser im Zusammenhang und vor dem Hintergrund der Verbundziele verstehen, und es wird die teils sehr intensive Kooperation der Partner deutlicher.

Arbeitspaket 1: Aufbau und Betrieb von Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab

Die überwiegende Mehrheit der landwirtschaftlichen Biogasanlagen wird als (mehrstufige) Rührkesselreaktoren (continuously/completely stirred tank reactor, CSTR) betrieben. CSTR sind gut geeignet, Substrate bis zu ca. 15% TS zu vergären. Speziell für die Hochdurchsatz-Vergärung von Pflanzenmaterial als alleiniges (bzw. überwachendes) Substrat wurden zweiphasige Systeme mit einer räumlichen Trennung von Hydrolyse und Methanogenese entwickelt (FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE 2010). Während CSTR überwiegend mesophil bei etwa 36 - 44°C betrieben werden, wird für zweiphasige Reaktorsysteme eher ein thermophiler Temperaturbereich (55 - 60°C) bevorzugt. Hieraus können höhere Abbauraten sowie eine höhere Prozessstabilität resultieren.

Im Rahmen dieses Vorhabens sollten verschiedene Technikumsanlagen zur Gewinnung von Probenmaterial für die mikrobiologische Analyse betrieben werden. Der Fokus des Projektpartners **LfL** lag hierbei auf der Vergärung von landwirtschaftlichen Substraten in CSTR Systemen, während am **ATB** zweiphasigen Reaktoren betrieben wurden. Es wurde sowohl die mesophile wie auch die thermophile Fermentation betrachtet. Beide Partner besitzen langjährige Erfahrung in Aufbau und Betrieb entsprechender Anlagen.

Der Betrieb der Anlagen vor Ort ermöglicht die Einstellung optimaler Parameter zur Vergärung der Substrate. Anschließend an den stabilen, effizienten Betrieb wurden für beide Betriebsweisen (meso- und thermophil) kritische Prozessbedingungen herbeigeführt. Dabei wurden insbesondere folgende Faktoren betrachtet: (1) Raumbelastung, (2) Verweilzeit, (3) Säuregehalt (insbesondere Essigsäure, Propionsäure und Iso-Säuren), (4) Ammoniakstress als Folge der Fütterung mit proteinreichem Substrat, (5) ggf. Spurenelementgehalt.

Die erarbeiteten Daten zum Prozessablauf und zur Dynamik der Mikrobiologie werden im Rahmen des Biogas Competence Network (BCN, Koordinator: Dr. S. Köhler) spezialisierten Arbeitsgruppen zur Modellierung und Simulation der Biogasfermentation zur Verfügung gestellt.

Arbeitspaket 2: Optimierung und Standardisierung der Präparation von DNA und RNA aus Biogasreaktoren

Da der überwiegende Anteil der Mikroorganismen in einem Biogasreaktor nicht oder nur mit hohem Arbeitsaufwand kultivierbar ist (vgl. STANTSCHOFF *et al.* 2014), wurden in diesem Vorhaben alternativ die DNA bzw. deren Transkript, die RNA, als Ziel zur Erfassung der Mikrobiologie und der Ableitung von Markern für prozessrelevanten Gruppen von Mikroorganismen verwendet.

Die Präparation von Nukleinsäuren kann jedoch verschiedene Probleme in sich bergen und so die spätere Analyse verfälschen (LEBUHN *et al.* 2003, LEBUHN *et al.* 2004, GARCÉS *et al.* 2005, GARCÉS *et al.* 2006, BERGMANN *et al.* 2010a, BERGMANN 2011). Ins-

besondere die Extraktion von RNA erfordert bekanntermaßen ein hohes Know-How. Die Antragsteller **ATB**, **TUM** und **LfL** hatten eine entsprechende Analytik etabliert, welche im Rahmen dieses Verbundes optimiert, untereinander abgeglichen und standardisiert werden sollte.

Insbesondere sollten folgende Punkte besonders optimiert werden: (1) Effizienz der Zellyse, (2) Gleichmäßigkeit des Zellaufschlusses bei verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen, (3) Abwesenheit von PCR-inhibierenden Substanzen, (4) Einfachheit des Protokolls. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten sollten geeignete Spiking-Experimente etabliert werden (LEBUHN *et al.* 2003, LEBUHN *et al.* 2004, GARCÉS *et al.* 2005, GARCÉS *et al.* 2009, BERGMANN 2011).

Arbeitspaket 3: Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern

Ein erstes Beispiel für einen entsprechenden Ansatz wurde 2005 von YU *et al.* zum Nachweis von verschiedenen Methanbildnern entwickelt (YU *et al.* 2005). In Arbeiten des Partners **ATB** wurde dieser Ansatz modifiziert und erfolgreich zur Analyse von Labor- und Praxisanlagen eingesetzt (z.B. BERGMANN *et al.* 2010b, BLUME *et al.* 2010, NETTMANN *et al.* 2010). Für Gene des Schlüsselenzyms der Methanogenese wurde von den Antragstellern der **LfL** im Rahmen des BMELV-FNR-Vorhabens IBMN ein (RT) qPCR-Assay entwickelt (*mcrA/mrtA*, BAUER *et al.* 2008) und in Labor- bis Praxissystemen erfolgreich evaluiert. Im Rahmen des BMBF-BioEnergie2021-Vorhabens FABES wurden von den Partnern **ATB** und **TUM** weitere Marker bzw. markergestützte Assays entwickelt, z.B. für funktionelle Enzyme der Hydrolyse (**ATB**: Cellulase-Motiv GH5, **TUM**: Cellulase-Motiv GH48) oder für bestimmte cellulolytisch-aktive Bakteriengruppen (**TUM**: *Clostridium* Gruppe 3 und ausgewählte Spezies). Weitere Marker bzw. qPCR Assays sind aus der Literatur bekannt wie z.B. Assays zum Nachweis von Bakterien, die mit Methanbildnern in Syntrophie leben (WORM *et al.* 2011, WESTERHOLM *et al.* 2011a,b).

Im Rahmen des vorliegenden Verbundvorhabens wurden diese Systeme weiterentwickelt. Die Schwerpunktsetzung war dabei wie folgt festgelegt: **ATB**, TP1, Marker für taxonomische Einheiten; **LfL**, vorliegendes TP2, Marker insbesondere für das Schlüsselenzym der Methanogenese und der vorgelagerten syntrophen Umsetzung (s.a. 2.4.1); **TUM**, TP3, Marker für Enzyme der Hydrolyse. Die Marker sollten von allen Partnern zur Analyse der Laborfermentationen genutzt werden. Die Eignung der verschiedenen Strategien zur Beurteilung des Prozesszustandes sollte mittels der Induktion von Störungen in den Laborfermentationen geprüft werden (s. Arbeitspaket 1).

Arbeitspaket 4: Ermittlung der metabolisch aktiven Gemeinschaft in Biogasfermentationen

Zur Ableitung von molekularen Markern stehen den Antragstellern acht Metagenomdatensätze mit einem Umfang von ca. 850 Mbp zur Verfügung (RADEMACHER *et al.* 2012). Dieser Datensatz wurde u.a. bereits zur Ableitung der GH5-Marker genutzt.

Das mikrobielle Metagenom repräsentiert die Gesamtheit der mikrobiellen DNA in einem System. Welche dieser Mikroorganismen jedoch metabolisch aktiv sind, lässt sich hieraus nur begrenzt ableiten. Es besteht die Möglichkeit, dass nur eine Minderheit der vorhandenen Mikroorganismen wesentliche Prozessschritte durchführt. Hierbei steht insbesondere auch die Frage im Raum, welche Mikroorganismen auf welche Weise auf kritische Prozesszustände wie z.B. hohe Ammoniakkonzentrationen als Folge der Verwendung von proteinhaltigen Gärsubstraten reagieren.

Im Rahmen dieses Verbundes sollte daher ebenfalls das Transkriptom, also die Gesamtheit der aktivierten Gene, in den Biogassystemen untersucht werden. Durch die Berücksichtigung solcher Daten sollten wesentlich schneller Marker für prozessrelevante funktionelle Gruppen gefunden werden. Die Transkriptom-Analysen wurden durch den Partner **CeBiTec** durchgeführt, der über eine langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der Hochdurchsatzsequenzierung verfügt. Hierzu wurde in erster Line das Verfahren der 454-Pyrosequenzierung genutzt.

In einer späteren Projektphase sollten gezielt Strukturunterschiede in der Nukleotidzusammensetzung der zur Markerentwicklung ausgewählten Zielgene ermittelt werden, um Aussagen zum Markerbindungsverhalten und damit zur Übertragbarkeit auf Praxisanlagen zu erhalten. Hierzu wurde die Illumina-Sequenzierung genutzt, welche eine kostengünstige Identifizierung von Sequenzvariationen im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht.

Arbeitspaket 5: Etablierung von Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR)

Die qPCR ist derzeitiger Standard zur Quantifizierung von DNA bzw. cDNA. Hieraus lassen sich sowohl die Zelldichte von Mikroorganismen in Umweltproben ableiten wie auch Veränderungen innerhalb von gemischten Populationen verfolgen. Zentrale Idee dieses Vorhabens ist, dass sich qPCR-basierte Nachweisverfahren zur zeitnahen Analyse und Verfolgung des mikrobiellen Status in Biogasreaktoren nutzen lassen.

Die Projektpartner **ATB**, **LfL** und **TUM** nutzten bereits entsprechende Assays (vgl. AP 3). Jedoch bestand Forschungsbedarf insbesondere zu der Frage, ob der Nachweis auf Basis der DNA (einfachere Handhabung) allein genügt. Als Alternative bot sich der Nachweis auf Basis der RNA (Nachweis von Transkripten) an oder die Verwendung von Propidiummonoazid (PMA) (Hemmung der PCR-Amplifikation von DNA aus geschädigten Zellen) (NOCKER *et al.* 2006). Nachdem ATB allerdings auf dem zweiten Statusseminar negative Ergebnisse mit Propidiummonoazid berichtete, wurde dieser Punkt aus

den Arbeiten des TP2 gestrichen. Die Protokolle sollten weitest möglich standardisiert werden, um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen.

Arbeitspaket 6: Pathogen-Diagnostik

Die in den Arbeitspaketen 1 - 5 erarbeiteten Ergebnisse lassen sich grundsätzlich auch zum Nachweis anderer Gruppen von Mikroorganismen nutzen. Aus gesellschaftlicher Sicht besteht eine hohe Nachfrage zum mikrobiologischen Risiko von Biogasfermentationen insbesondere bei der Verwertung von Gärresten. Aus wirtschaftlicher Sicht ergibt sich die Frage nach Notwendigkeit und Effizienz von Hygienisierungsverfahren sowie nach der Sicherheit in den Verwertungsketten. Ebenso könnte der Eintrag pathogener Spezies durch den Substrateintrag erfasst werden.

Durch dieses Teilprojekt konnten Hinweise zur Etablierung von Strategien zur Vermeidung oder Verminderung pathogener Keime gewonnen werden. Insbesondere folgende Organismengruppen erschienen hierbei unter den Bedingungen, wie sie im Biogasreaktor vorliegen, von Relevanz: (1) toxinbildende Endosporenbildner (z.B. *Clostridium botulinum*), (2) pathogene Enterobakterien (z.B. enterohämorrhagische *E. coli*, EHEC), (3) phytopathogene Keime.

Die Arbeiten der **Beuth-HS** wurden durch **ATB** und **LfL** unterstützt. Beide Partner verfügen über Expertise auf dem Gebiet der molekularen Pathogen-Diagnostik (z.B. SOBIELLA 2008, NEUMANN 2010, OCTOVIANI 2010, RHEINHARDT 2011, FRÖHLING *et al.* 2012).

Arbeitspaket 7: Evaluierung der Marker unter Praxis-Bedingungen

Bei Untersuchungen im Labormaßstab besteht immer die Frage, in wie weit die Ergebnisse auf Praxisanlagen übertragbar sind. So konnte im Rahmen einer Studie der Antragsteller gezeigt werden, dass die Mikrobiologie einer Praxisanlage deutliche Unterschiede zu dem vorangegangenen Labormodell aufwies (KLOCKE *et al.* 2008). In diesem Vorhaben sollte daher stets auch eine Betrachtung von Praxis-Biogasanlagen erfolgen. Exemplarisch für CSTR Systeme wurden Biogasanlagen der „Bayerischen Demonstrationsanlagen“ beprobt. Der Wirtschaftspartner **GICON GmbH** ermöglichte die Beprobung einer zweiphasigen Pilotanlage in der Nähe von Cottbus.

Die entwickelten Assays sollten zur Beurteilung des mikrobiellen Status in solchen industriellen bzw. landwirtschaftlichen Biogasanlagen eingesetzt werden. Die Assays und entsprechende Kontrollexperimente wurden von den Partnern **ATB** und **LfL** umgesetzt.

2 Material und Methoden

Die mikrobiologisch/molekularbiologische Analytik wurde unter der Leitung von Herrn Dr. Lebuhn (Arbeitsgruppe 2 des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung, ILT2; seit 1.4.2012 Aufgabengruppe 1c der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungsweisen, AQU1c) an der LfL aufgebaut und ist an AQU situiert. Hier wurde zu Projektbeginn die zur sachgemäßen Bearbeitung nötige Infrastruktur geschaffen. Die begleitende chemische und physikalische Analytik oblagen AQU und ILT2.

Fermenterbetrieb und Bereitstellung von Fermenterproben aus verschiedenen Betriebsvarianten und Aktivitätszuständen erfolgten durch ILT2. Begleitend wurden die Proben chemisch und physikalisch analysiert.

2.1 Versuchs- und Praxisanlagen – Technik und Analytik

2.1.1 Anlagentechnik und Betrieb

Für die Durchführung der Versuche waren die benötigten Reaktoren inklusive der Mess- und Steuerungseinheit an LfL-ILT vorhanden. Die 32 L Durchflussfermenter (**Abbildung 2**) bestanden aus doppelwandigen zylindrischen Behältern mit einem Innendurchmesser von 250 mm und einer Innenhöhe von 750 mm. Zwischen den beiden Wänden befand sich die Wasserheizung, mit der die Fermenter auf konstanter Temperatur gehalten wurden. Die Fermenter wurden mesophil (38°C) und thermophil (55°C) betrieben.



Abbildung 2: 32 L Durchflussfermenter des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung

Die Fermenter wurden über eine Schnecke von oben mit Substrat unter die Oberfläche des Gärgemischs (Fermenterinhalt) semikontinuierlich beschickt, damit bei der Fütte-

zung kein Gasverlust entsteht. In der Regel wurden die Fermenter täglich mit Substrat gefüttert. Für den Durchflussbetrieb wurde Volumenkonstanz über die Entnahme von Gärgemisch eingestellt. An der Unterseite befand sich der Auslass für die Entleerung und die Probenahme. Im Deckel waren Rührwerksmotor und Einfüllrohr sowie die Anschlüsse zur Gasabführung und zum Druckausgleich integriert. Durchmischt wurde mit einem Gabelrührwerk.

2.1.2 Quantitative und qualitative Biogasanalytik

Die Erfassung des Gasvolumenstroms erfolgte mit Milligascountern. Die Gasqualität (CH₄, CO₂, O₂, H₂ und H₂S, **Tabelle 1**) in den Gassäcken wurde automatisch nach jeweils 4 L registrierter Gasproduktion in einem Awite-Gasanalysegerät gemessen.

Tabelle 1: Messgenauigkeit und Messprinzip der Sensoren des Gasanalysegerätes

Gaskomponente	Sensorprinzip	Messbereich	Messgenauigkeit
CH ₄	Infrarot	0 – 100 Vol.- %	± 2% pro Jahr
CO ₂	Infrarot	0 – 100 Vol.- %	± 2% pro Jahr
O ₂	elektrochemisch	0 – 25 Vol.- %	± 1% relativ in Luft
H ₂	elektrochemisch	0 – 500 ppm	± 2% relativ
H ₂ S	elektrochemisch	0 – 5000 ppm	± 2% relativ

Die Biogas- und Methanerträge wurden stets zu Normbedingungen angegeben. Zuerst erfolgte eine Umrechnung des Volumens auf trockenes Gas. Der Wasserdampf im Biogas wurde nach der „Magnusformel“ berechnet:

$$p = 610,78 \times e^{\left(\frac{17,08 \times t}{234,18 + t} \right)}$$

p: Dampfdruck in Pascal

t: Temperatur in Grad Celsius

Der Volumenanteil des Wasserdampfs im Biogas wurde durch Division mit dem zugehörigen Luftdruck bestimmt.

Nach VDI 4630 wurde das Trockengasvolumen auf 273,15 K und 1013,25 hPa normiert. Dafür wurde die Gleichung für ideale Gase verwendet:

$$V_n = \frac{V_{tr} \times P_{tr} \times T_n}{T_{tr} \times P_n}$$

V_n: Volumen des normierten Gases; V_{tr}: Volumen des trockenen Gases; P_n: Normdruck; P_{tr}: Real-Luftdruck; T_n: Normtemperatur; T_{tr}: Real-Temperatur

2.2 Substrate und Substratlogistik; Proben von Gärgemischen

Die Versorgung des Versuchsanlagenbetriebs mit Silagen wurde über ILT2 abgewickelt. Zwei 400 kg Grassilageballen wurden von einem nahegelegenen Landwirt bezogen. Ein Silageballen wurde dem ATB für deren Versuche zur Verfügung gestellt (TP1). Die Grassilage wurde portioniert eingefroren und anschließend in Holzkisten verdichtet und tiefgefroren, um gefrorene „Substratbalken“ herzustellen. Diese „Substratbalken“ wurden mit einem Laborhäcksler nachzerkleinert (**Abbildung 3**). Das zerkleinerte Substrat (**Abbildung 4**) wurde der nasschemischen Analyse an die Fütterung angepasst portioniert in Plastiktüten verpackt und tiefgefroren. Die passende Futterration wurde vor der Fütterung langsam im Kühlschrank aufgetaut.



Abbildung 3: Herstellung von gefrorenen „Substratbalken“ für die Nachzerkleinerung mit einem Laborhäcksler



Abbildung 4: Vergleich der Faserlänge der Grassilage vor und nach der Nachzerkleinerung

Die Probenahme erfolgte immer vor der Fütterung. Dabei wurde das Gärgemisch zuvor über die Probenahme-Einrichtung rezirkuliert, um kein abgestandenes Material aus Totzonen der nasschemischen und molekularbiologischen Analytik zuzuführen. Abhängig von der weiteren vorgesehenen Analytik wurden die Proben eingefroren (z.B. für die Analytik kurzkettiger Fettsäuren, SCFA) oder sofort aufgearbeitet (z.B. RNA-Extraktion für die mRNA-Analytik).

2.3 Nasschemische Analysen

2.3.1 *TM, TS und oTM, oTS*

Die Trockenmasse (TM, bzw. TS in % TM) und die organische Trockenmasse (oTM, bzw. oTS in % der TS) wurden gravimetrisch nach DIN 38414-S2 bzw. DIN 38414-S3 bestimmt. Wo nicht anders vermerkt stellen die Angaben zur oTM bzw. oTS bei Silagen korrigierte Werte dar, die den mit GC-Analytik bestimmten Gehalt an flüchtigen Fettsäuren beinhalten.

2.3.2 *Ammoniumstickstoff*

Die Ammoniumstickstoffkonzentration ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) wurde mit einer zweipunktkalibrierten ammoniakselektiven Elektrode im verdünnten Substrat gemessen. Dazu wird das in der Probe enthaltene Ammonium durch Zugabe von 10 M Natronlauge in Ammoniak überführt und neben dem schon zuvor enthaltenen Ammoniak mitgemessen. Der Messwert gibt gemäß der Kalibration die Konzentration an Ammoniumstickstoff und Ammoniak in der Probe wieder.

Die Ammoniak-Stickstoffkonzentration wurde mit der folgenden Formel nach HANSEN *et al.* (1998) berechnet:

$$\text{NH}_3 - \text{N} = \frac{\text{NH}_4 - \text{N}}{1 + 10^{(pKa - pH)}}$$

$$pKa = 0.09018 \times \frac{2729,92}{t + 273,15}$$

pKa: Dissoziationskonstante für Ammonium; t: Temperatur in Grad Celsius.

2.3.3 *FOS/TAC-Verhältnis*

Das Verhältnis von flüchtigen organischen Säuren (FOS) zur alkalinen Pufferkapazität (FOS/TAC) wurde titrimetrisch nach NORDMANN (1977) und RIEGER & WEILAND (2006) bestimmt.

Zur Probenvorbereitung wurde die frisch entnommene Probe zentrifugiert (20 min bei 15.000 g) und ein definiertes Volumen des Überstands in ein Becherglas (50 mL) pipetiert (typischerweise 5 mL). Die Probe wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, bis die pH-Elektrode gut in die Lösung eintauchte.

Die Gehalte an TAC und FOS wurden durch Titration mit 0,1 N Schwefelsäure bestimmt. Für den TAC wurde die Lösung vom Ausgangs-pH-Wert auf 5,0 titriert (Menge α), für den FOS-Gehalt weiter auf 4,4 (Menge β). Die Gehalte wurden mit den unten aufgeführten Formeln bestimmt.

$$\text{TAC}[\text{mg/kg}] = \frac{20 \text{ ml}}{V1 [\text{ml}]} \times \alpha \times 250$$

$$\text{FOS [mg/kg]} = \left(\frac{20 \text{ ml}}{V_2 \text{ [ml]}} \times \beta \times 1,66 - 0,15 \right) \times 500$$

2.3.4 pH-Wert

Der pH-Wert wurde nach DIN EN 12176-S5 mit einer pH-Elektrode bestimmt.

2.3.5 Flüchtige Fettsäuren

Kurzkettige aliphatische Monocarbonsäuren sind wasserdampfflüchtig (FFS). Sie wurden daher bei der vorliegenden Bestimmungsmethode nach Freisetzung mit ortho-Phosphorsäure durch Wasserdampf aus der Probe ausgetrieben und als wässrige Lösung in einer Vorlage aufgefangen. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Titration des Destillats mit Natronlauge gegen Phenolphthalein. Die Konzentrationsangabe erfolgt als Essigsäure in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Konzentrationen der einzelnen FFS C2 – C7 wurden gaschromatographisch bestimmt.

2.3.6 Spuren- und Makroelemente

Die Spurenelementanalytik inklusive der Bestimmung von Natrium (Gesamtgehalte) wurde von der Abteilung AQU der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-AQU) mit der dort etablierten Methodik durchgeführt. Die Spurenelementextraktion erfolgte mit Königswasser und die Bestimmung mit ICP-OES bzw. einem Grafitrohr.

Die Elemente Phosphat, Kalium, Magnesium und Calcium wurden von LfL-AQU entsprechend den Vorschriften VDLUFA MB. Bd.3, Kap. 2.2.2.6, bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Analytik von Gärgemischen

2.4.1 PCR-basierte Ansätze

Bioinformatik und Primerentwicklung (*mcrA/mrtA*, *fhs*)

Alle für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Primer- und Sondensysteme wurden auf Basis der jeweils aktuellen Eintragslage zu Nukleinsäuresequenzen in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>), der ENA-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) oder der RDP-Datenbank (<http://rdp.cme.msu.edu/>) konstruiert. Dabei wurden mit dem Programmpaket MEGA (TAMURA *et al.* 2007, TAMURA *et al.* 2011, TAMURA *et al.* 2013) Alignments mit jeweils mehreren Tausend kuriierten Sequenzen der Zielgene (knapp 2.000 für *fhs* bis etwa 8.000 für *mcrA/mrtA*) erstellt. Relevante Primer- (und ggf. Sonden-) Positionen wurden in erkannte Signaturbereiche gelegt. Die Systeme wurden nach positiver Evaluierung *in silico* und *in vitro* sowie mit DNA-Extrakten aus Gärgemischen in den Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 2: Primer- und SONDENSEQUENZEN FÜR METHANOGENE ARCHAEEN AASF-BAKTERIEN UND *Escherichia coli*, DIE IM VORLIEGENDEN TP2 EINGESETZT WURDEN

Cluster	Primer	Sequenz (5' → 3')
Methanogene Archaeen (<i>mcrA/mrtA</i>)	MeA-i 1046f	TAYATGWSIGGGHGGIGTIGGITYAC
	MeA-i 1435r	TGRTCYTGIARRTCRWAICCRWAGAAICC
AASF-Bakterien (<i>fhs</i>)	fthfs-11-e_f	GTNACNGCNATNAVYCCNACNCC
	fthfs-HP-b_r	TGVGCRATRTTNGCRAANGGNCC
<i>E. coli</i> (<i>murA</i>)	Ec_mur_27f	GATAAATTTTCGTGTTTCAGGGGCCA
	Ec_mur_126S	FAM-AGAACCGGTAGAGATCCAGAACGTCC-TAMRA
	Ec_mur_177r	CTTTCGCACCCAGCTGGCTT

mcrA/mrtA:

Die Populationsanalysen und Quantifizierungen der methanogenen Archaeen erfolgten anhand des für diese Gilde spezifischen Gens für die Untereinheit A der Methyl-Coenzym M-Reduktase (*mcrA/mrtA*). Die *mcrA/mrtA*-Analysen wurden im Projekt IBMN (LEBUHN *et al.* 2010) etabliert und für die Untersuchungen im vorliegenden Vorhaben übernommen. Sie waren Grundlage beispielsweise für die Entwicklung des Metabolischen Quotienten (MQ) und die Aktivitätsanalysen auf mRNA-Ebene über die cDNA/DNA-Verhältnisse. Sie erfassen auch die erst vor kurzem beschriebenen Methanogenen der Klasse *Thermoplasmata* (BORREL *et al.* 2013) und der Klasse ARC-I bzw. WSA2 (NOBU *et al.* 2016). Die funktionellen Primer sind in **Tabelle 2** dargestellt und wurden im vorliegenden TP2 eingesetzt. Bei der Berechnung von Gesellschaftszusammensetzungen wurde berücksichtigt, dass manche *Methanobacteriaceae* (wie auch manche *Methanococci*, die aber im Biogasprozess keine Rolle spielen) das allele Genpaar *mcrA* und *mrtA* tragen.

fhs:

Für die Populationsanalyse und die Quantifizierung von acidogenen, acetogenen und syntrophen fettsäureoxidierenden Bakterien (AASF) diente *fhs* als Zielgen. Es codiert für Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase (FTHFS) und ist ein Schlüsselenzym im Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg der autotrophen CO₂-Fixierung, der zumindest von einer Reihe sonst homoacetogener *Bacteria* auch revers beschriftet werden kann (HATTORI 2008). Nachdem sich *fhs*-Sequenzen des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs und des Glycin-Synthase Glycin-Reduktase Abbauewegs der Purinolyse, in dem FTHFS auch eine tragende Funktion hat, unterschieden wurden (ENDERSON *et al.* 2010), wurden an der LfL im Rahmen einer Diplomarbeit (FRÖSCHLE 2011) *fhs*-Primer für Intermediat-oxidierende Mikroorganismen entwickelt (**Tabelle 2**) und ein für dieses System optimierter qPCR-Assay etabliert. Diese Analytiksysteme fanden im vorliegenden TP2 Anwendung.

murA:

Das für *Escherichia coli* spezifische 5'-Hydrolysesonden-System *murA* wurde zur Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienzen bzw. Wiederfindungsraten eingesetzt (s. 3.2.1, **Abbildung 13**). Es ist keine Entwicklung des TP2, um Gilden oder Gruppen der methanogenen Biozösen zu analysieren oder nachzuweisen. Die Basenzusammensetzungen der Primer und der 5'-Hydrolysesonde sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

2.4.2 DNA-Extraktion

Die für Fermenterproben optimierte Methode der DNA-Extraktion wurde von LEBUHN *et al.* (2003) entwickelt und ist dort bzw. mit kleineren Adaptationen in BAUER *et al.* (2008) und MUNK *et al.* (2010) beschrieben. Daher sind im Folgenden nur die wichtigsten Punkte im Überblick zusammengefasst. Die RNA-Extraktion ist essentiell von der DNA-Extraktion verschieden und separat dargestellt (siehe unten).

Die Fermenterproben wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen 2x in 0,85%-iger steriler KCl-Lösung gewaschen. 40 µL gewaschene Probe wurden für die DNA-Extraktion (Fast DNA Spin Kit for Soil, MP Biomedicals) eingesetzt. Die DNA-Extraktion wurde bis auf einen zweiten Waschschrift (MUNK *et al.* 2010) mit SEWS-M Puffer nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Bead-Beating erfolgte für 40 s bei Speed 6,0.

Vorangegangene Untersuchungen zur Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienz hatten gezeigt, dass die Extraktionsmethode, insbesondere das Bead-Beating, der physischen Resistenz der Zielorganismen angepasst sein muss. Für die hier betrachteten physiologisch aktiven Mikroorganismen des Biogasprozess war die oben beschriebene Methode optimal und ergab eine Wiederfindungsrate von über 80% und meist sogar über 90% (GARCÉS *et al.* 2005). Deswegen wurde kein Korrekturfaktor eingeführt.

Im Rahmen eines Vorversuchs wurden Wiederfindungsraten u.a. mit dem oben vorgestellten LfL-Protokoll ermittelt. Details zu diesem Vorversuch können in LEBUHN *et al.* (2016) nachgelesen werden. In diesem Versuch ergab sich eine Wiederfindungsrate von 88% für das LfL-Protokoll (**Abbildung 13**). Weiterhin wurden zur Standardisierung und Optimierung der DNA-Extraktion und qPCR-Analytik zwei verschiedene Ringversuche durchgeführt, an denen die Partner teilnahmen (**Abbildung 14**, **Abbildung 15**). Zum besseren Verständnis des Vorgehens sind die Versuchsgestaltung und –durchführung im Ergebnisteil beschrieben (s. Abschnitt 3.2.1).

2.4.3 RNA-Stabilisierung und –Extraktion, cDNA-Synthese mit Reverser Transkription und cDNA/DNA-Verhältnisse

Um spezifisch aktive Mikroorganismen in den Fermenterproben nachzuweisen, wurden separat *mcrA/mrtA*- bzw. *fhs*-mRNA- oder auch (TP1) 16S rRNA-Transkriptkopien analysiert. Die entsprechenden Gene wurden gewählt, weil sie für Schlüsselenzyme wichtiger Stoffwechselwege im Biogasprozess bzw. für ribosomale RNA codieren. Die mRNA

auch von Prokaryonten wird im Gegensatz zur DNA mit einer Halbwertszeit von wenigen bis einigen Minuten (ANDERSSON *et al.* 2006) sehr schnell abgebaut. rRNA ist etwas stabiler als mRNA, aber labiler als DNA (MCKILLIP *et al.* 1998). Die Instabilität insbesondere der mRNA erlaubt es einerseits, im Saldo zwischen mRNA-Bildung und –Abbau den aktuellen Zustand der Zellen zu bestimmen. Andererseits muss die RNA-Extraktion möglichst sofort an die Probenahme anschließen, um RNA-Verluste zu minimieren, oder die RNA muss bei der Probenahme stabilisiert werden, da häufig zwischen Anlagebetrieb und Analytik im Labor erhebliche Distanzen liegen und beim Transport einige Zeit verfließt. Zur RNA-Stabilisierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, z.B. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff oder Inaktivierung enzymatischer Vorgänge durch Phenol. Weil aber flüssiger N₂ in der Praxis kaum zur Verfügung steht und der Umgang mit dem hochtoxischen Phenol sehr problematisch ist, erscheint der Einsatz quarternärer Ammoniumsalze zur RNA-Stabilisierung vielversprechend (LEBUHN *et al.* 2016) und wurden im RNA-Ringversuch (s. Abschnitt 3.2.1) geprüft.

Für den Nachweis der mRNA und der rRNA wurde die Gesamt-RNA mit einem Kit (FastRNA Pro Soil – Direct Kit, MP Biomedicals) bis auf einen zweiten Waschschrift mit Ethanol nach Herstellerempfehlungen aus Fermenterproben extrahiert. Zuvor wurde die Fermenterprobe analog zur DNA-Extraktion (siehe oben) in 0,85%-iger steriler KCl-Lösung gewaschen, um eine Kontamination mit Inhibitoren (Huminstoffen) und freien Nucleinsäuren (Reste toter Organismen) zu minimieren (LEBUHN *et al.* 2003).

Tabelle 3: Zusammensetzung und Temperaturprotokoll des DNase-Verdaus

Reagenz	1 Ansatz [µL]
RNA-Extrakt	20
DNase-Puffer	2
Turbo DNase	1
45 min bei 37°C inkubieren	
DNase Inactivation Reagent	2,3
Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen	

Tabelle 4: Zusammensetzung und Temperaturprotokoll der Reversen Transkription mit AffinityScript (Agilent Technologies)

Reagenz	1 Ansatz [μ L]
Reverse-Primer (20 μ M)	0,6
RNase freies Wasser	7,4
DNase verdaute RNA	5
5 min bei 65°C denaturieren	
RT-Puffer	2
DTT	2
dNTP Mix (10 mM)	2
AffinityScript	1
60 min bei 45°C inkubieren	
15 min bei 70°C denaturieren	

Nach der RNA-Extraktion wurden die Extrakte wegen der Instabilität der RNA sofort weiterbehandelt. Zuerst wurden Kontaminationen mit genomischer DNA durch DNase-Behandlung (**Tabelle 3**) entfernt, anschließend wurden die RNA Species mit Reverser Transkriptase (RT, AffinityScript, Agilent Technologies; **Tabelle 4**) und je nach Zielsetzung mit spezifischem Reverse-Primer (*mcrA/mrtA*, *fhs*) in cDNA umgeschrieben. Geeignete Kontrollen ohne RT bestätigten die Freiheit von DNA-Kontamination.

Die folgenden qPCR-Ansätze wurden mit unverdünnter und zusätzlich zumindest mit 10^{-1} -verdünnter cDNA wie für DNA-Extrakte durchgeführt. Mit der vorgeschalteten RT wird dieser analytische Ablauf als RT-PCR bzw. RT-qPCR (s. 2.4.4) bezeichnet. Zur Quantifizierung wurde bei der RT-qPCR ein PCR-Zyklus von den Ergebnissen subtrahiert, da ein solcher Zyklus zur Herstellung doppelsträngiger (ds-)DNA aus der einzelsträngigen (ss-)cDNA erforderlich ist. Damit sind die Ergebnisse für genomische DNA und für die Transkripte vergleichbar.

Für die RNA-Extraktionseffizienz wurde in einem Vorversuch ein Wert von 70% bestimmt. Diese RNA-Extraktionseffizienz wurde für die Berechnung der mRNA-Konzentration in den Fermenterproben mit einbezogen. In früheren Versuchen wurden allerdings auch niedrigere Werte ermittelt (LEBUHN *et al.* 2016).

Als zweiter Aktivitätsparameter neben dem Metabolischen Quotienten (MQ) wurden cDNA/DNA Verhältnisse berechnet, um die spezifische *mcrA/mrtA* oder *fhs* Transkriptionsaktivität zu bestimmen. Ein wesentlicher Vorteil der cDNA/DNA Verhältnisse liegt darin, dass zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der betrachteten Gilde keine anderen Angaben von Aktivitätsparametern wie z.B. der Methanproduktivität vorliegen müssen. Die cDNA/DNA Verhältnisse sind also rein molekularbiologische Aktivitätsparameter und wurden als eine wesentliche Leistung dieses Forschungsvorhabens für den untersuchten Bereich der Biogas-Mikrobiologie etabliert.

Den *fhs*-cDNA-Dissoziationskurven-Analysen zufolge könnte allerdings speziell der *fhs*-Reverse-Primer unspezifische Produkte in den RT-PCR und RT-qPCR-Assays generiert haben (s. Abschnitt 3.2.3). Dieses im späteren Verlauf des Forschungsvorhabens erkannte Problem konnte bis zum Projektabschluss nicht gelöst werden, es wird aber weiter an Verbesserungsmöglichkeiten gearbeitet. Bis zur Lösung des Problems müssen die bislang mit den *fhs*-RT-PCR und *fhs*-RT-qPCR-Assays erhaltenen Ergebnisse als unzuverlässig betrachtet werden. Sie werden deswegen nicht publiziert und hier auch nicht präsentiert.

2.4.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) und Konstruktion von Standards

Die Quantifizierung von methanogenen Archaeen, AASF-Bakterien und *Bacteria* aus den Nukleinsäure-Extrakten wurde nach der DNA-Extraktion bzw. nach Umschreiben extrahierter RNA in cDNA (s. 2.4.3) mit quantitativer Real-Time PCR (qPCR) durchgeführt. Um PCR-Inhibierung festzustellen und auszuschließen, wurden die Proben für die Quantifizierung typischerweise unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen (zumindest 10^{-1}) eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde EvaGreen[®] in die qPCR-Ansätze eingesetzt, das in doppelsträngige DNA bindet und bei Blaulichtanregung fluoresziert.

Für die absolute Quantifizierung von methanogenen Archaeen wurde ein *mcrA/mrtA*-Standard hergestellt. Dazu wurde jeweils ein Klon einer Direkt-PCR-Klonierung angezchtet, dessen Konzentration in einer sterilen 0,85% KCl-Suspension zum Zeitpunkt der Aliquotierung auf Agarplatte bestimmt worden war. Parallel dazu wurde die Anzahl der enthaltenen Kopien des Zielgenfragments (Plasmidinserts) mittels MPN- (most probable number-) qPCR aus einer Verdünnungsreihe analysiert. Anhand der Verdünnungsreihe des Zellsuspensionsstandards wurde eine Standardgerade generiert und evaluiert, mit deren Hilfe die Zielorganismen in den untersuchten Proben quantifiziert wurden. Ein Standard wurde erst dann akzeptiert und verwendet, wenn die Steigung der Standardgerade einen Wert von -3,3 hatte und der Schnittpunkt mit der y-Achse zwischen 36 und 39 lag (LEBUHN *et al.* 2015, vgl. **Abbildung 6**). Aliquots der Verdünnungsreihe wurden tiefgefroren. Ein frisches Aliquot der Verdünnungsreihe diente bei der Analyse von Proben als Standard. Die Zusammensetzung des *mcrA/mrtA* qPCR-Ansatzes kann **Tabelle 5** und das Temperaturprofil **Tabelle 6** entnommen werden. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 82°C gemessen, um sich bildende Primerdimere wieder zu denaturieren und weitestgehend von der Messung auszuschließen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des *mcrA/mrtA* qPCR Assays

Bestandteil	1 Ansatz (µL)	Endkonzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	200 µM
forw. Primer (20 µM)	0,75	0,6 µM
rev. Primer (20 µM)	0,75	0,6 µM
Platinum Taq-Pol. (5 U/µL)	0,15	0,75 U
Eva-Green (50x)	1	2x
DNA	1	
H ₂ O	ad 25	

Tabelle 6: Temperaturprofil des *mcrA/mrtA* qPCR Assays

Schritt	Anzahl der Schritte
3 min 95°C	1x
15 s 95°C	45x
60 s 60°C	
10 s 82°C	
Schmelzkurve 55°C – 95°C	Fluoreszenzmessung 1x

Der Standard für AASF-Bakterien wurde gleich wie der *mcrA/mrtA*-Standard konstruiert, jedoch mit einem *fhs*-Gen als Insert im Plasmid. Für den *fhs*-qPCR-Assay war der Reaktionsansatz identisch zu *mcrA/mrtA* (vgl. **Tabelle 5**), außer dass die Primer *fthfs-11-e_f* und *fthfs-HP-b_r* (**Tabelle 2**) Verwendung fanden.

Amplification Plots

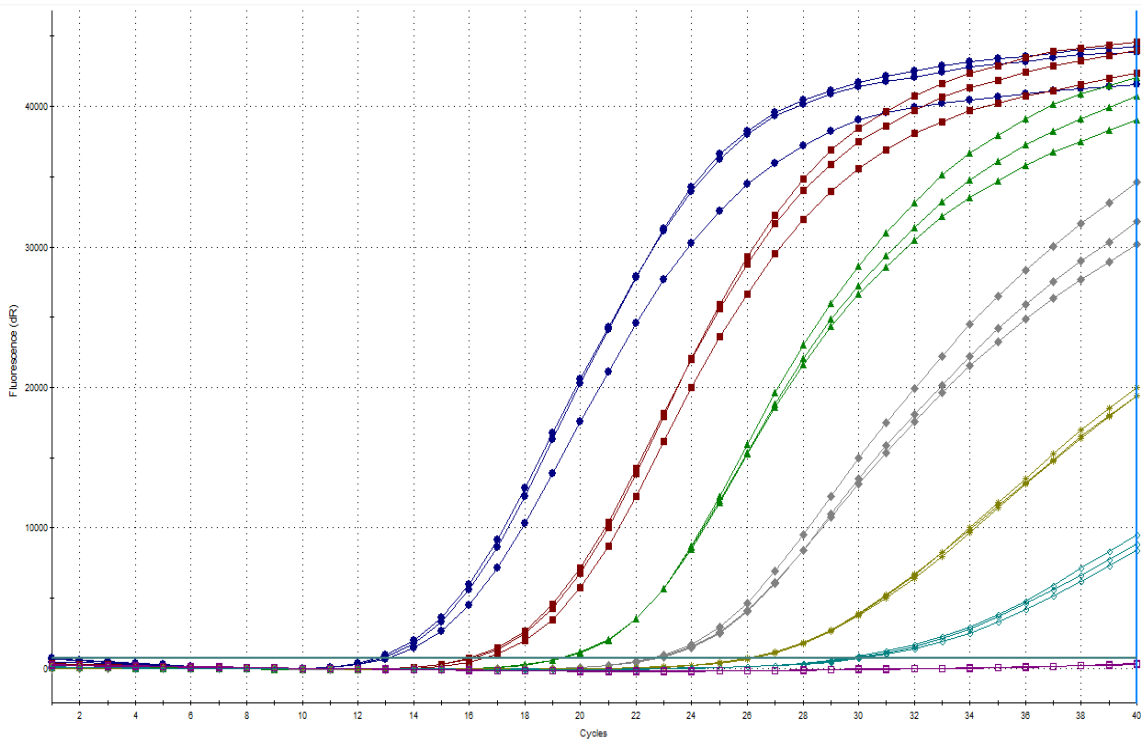


Abbildung 5: Amplifikationsplots eines *fhs*-Plasmid-Standards. Es wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten analysiert

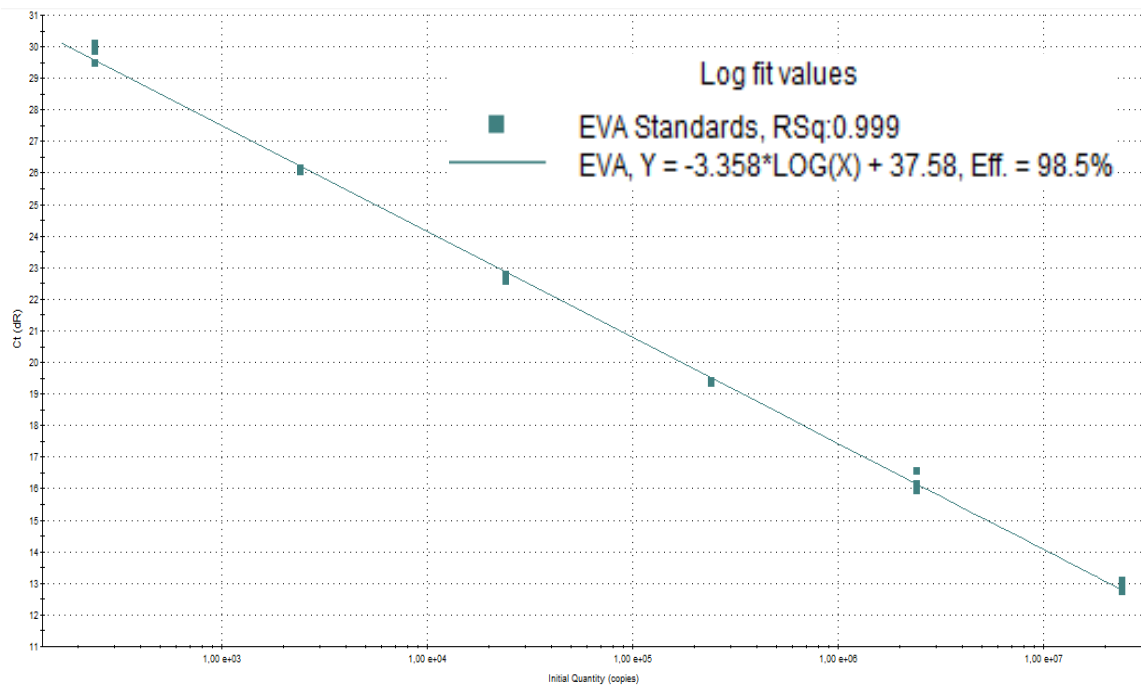


Abbildung 6: Standardgerade eines *fhs*-Plasmid-Standards

Es wurde aber beim *fhs*-Assay ein 3-Schritt Temperaturprofil mit einer Annealing-Phase von 45 Sekunden bei 52°C und einer Extensions-Phase von 60 Sekunden bei 72°C

verwendet. Zusätzlich wurde noch vor der Fluoreszenzmessung ein Denaturierungsschritt bei 79°C für 10 Sekunden eingefügt, um Primerdimere auszuschließen. Als Beispiel zeigt **Abbildung 5** die Amplifikationskurven für eine Verdünnungsreihe eines *fhs*-Standards und **Abbildung 6** die zugehörige Standardgerade, die für die Quantifizierung der *fhs*-Gen- und Transkriptkopien Verwendung fand.

2.4.5 Metabolischer Quotient

In Untersuchungen aus dem Projekt IBMN wurde eine Korrelation zwischen der Konzentration von methanogenen Archaeen und der Methanproduktivität von sechs mesophilen, mit Maissilage über mehrere Versuchsjahre betriebenen Fermentern festgestellt (LEBUHN *et al.* 2010). Indem aus diesem Datensatz Datenpunkte von versauerten Prozesszuständen (FOS/TAC > 0,7) und ohne Fütterung entfernt wurden, ergab sich eine erste schwache ($R^2 = 0,38$) Korrelation für einen mesophilen Standardbetrieb mit Maissilage (MUNK *et al.* 2010):

$$Y = 1,1209 \ln(X) + 8,2593; \text{ mit}$$

$$Y = {}^{10}\log \text{ Konzentration methanogene Archaeen} \cdot \text{mL}^{-1},$$

$$X = \text{Methanproduktivität in } \text{L}_N \cdot \text{L}_{\text{FM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}.$$

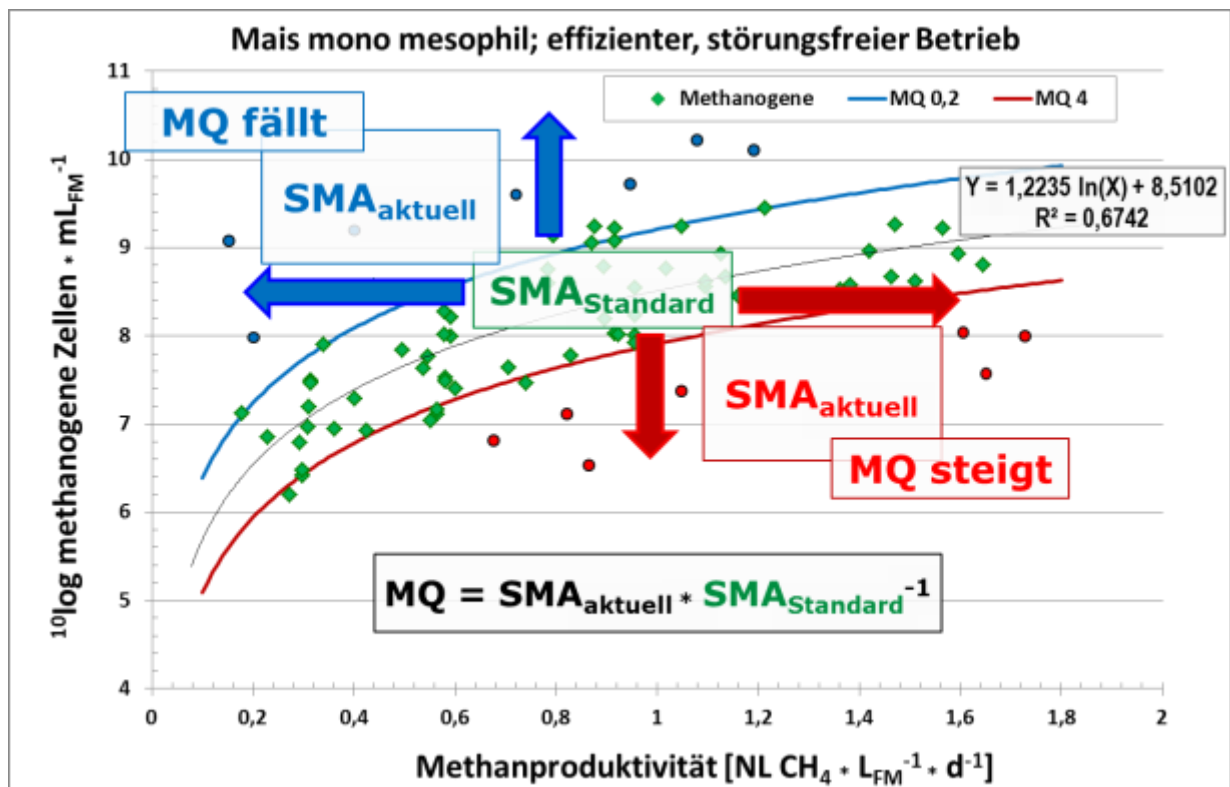


Abbildung 7: Konzentration von methanogenen Archaeen und Methanproduktivität beim Standardbetrieb über verschiedene organische Raumbelastungen hinweg; zuletzt aktualisiert im Januar 2015

Mit weiteren Untersuchungen wurde der Datensatz erweitert, und es wurden Daten aus metabolischer Überlastung bzw. Stress oder einer Hungerphase bzw. Unterforderung der Methanogenen aus dem Datensatz entfernt. Dadurch konnte ein Referenzdatensatz für stabile Standardprozesse mit Maissilage als Substrat und mesophilen Durchflussbetrieb für unterschiedliche Raumbelastungen geschaffen werden, der auch weiter aktualisiert und erweitert wurde (aktualisierte Version: s. **Abbildung 7**).

Auf Basis der Standardkorrelation in **Abbildung 7** wurde der Metabolische Quotient (MQ) eingeführt, um die spezifische methanogene Aktivität zu bestimmen und daraus ein Frühwarnsystem für Prozessversäuerung abzuleiten (MUNK *et al.* 2012). Die Standardkurve erlaubt die Berechnung der erwarteten Konzentration von Methanogenen Archaeen bei einer gegebenen Methanproduktivität im Standard- bzw. Normalzustand und umgekehrt. Die aktuell gemessene Konzentration an Methanogenen in Verhältnis zur Standard-Konzentration bei der gegebenen Methanproduktivität gibt Information über die aktuelle metabolische Aktivität der Methanogenen und ihren physiologischen Zustand. Dieser Standard (**Abbildung 7**) wurde und wird ständig um neue Datenpunkte aus verschiedenen Messkampagnen aktualisiert. Es wird nun untersucht, in wie fern der funktionelle Zusammenhang auch für andere Betriebsweisen angewendet werden kann, z.B. für thermophile Prozesse oder mit Grassilage als Substrat, um als Frühwarnsystem vor Prozessstörungen dienen zu können.

2.4.6 Direkt-(RT)-PCR-Klonierungen und Analyse der Populationszusammensetzung mittels Amplikon-Sequenzanalysen

Um die Zusammensetzung der Mikroorganismengesellschaften in den verschiedenen Biogasprozessen zu bestimmen, wurden Direkt-PCR-Klonierungen von den Fermenterproben durchgeführt. Für die verschiedenen Gilden bzw. phylogenetischen Gruppen wurden Fragmente konservierter Schlüsselgene untersucht: für die methanogenen Archaeen des Gens *mcrA/mrtA* (Untereinheit A der Methyl-CoM-Reduktase) und für die AASF-Bakterien des Gens *fhs* (Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase). Außer den Untersuchungen auf DNA-Ebene mit extrahierter DNA wurde die Populationszusammensetzung transkriptionell aktiver Mikroorganismen mittels Analyse der cDNA aus umgeschriebener mRNA bzw. rRNA der oben genannten Gene untersucht. Hierfür wurde zunächst RNA extrahiert und nach DNase-Behandlung mit Erfolgskontrolle in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

Für die Populationsanalysen wurden die Genfragmente (DNA oder in cDNA umgeschriebene RNA) mit PCR-Systemen für unterschiedliche Gilden amplifiziert (**Abbildung 8**), aufgereinigt und in Vektoren (pCRTM4-TOPO[®] TA vector, Life Technologies) ligiert. Nach Transformation in *E. coli* (TOP10 chemically competent cells, Life Technologies) und Aufzucht auf Selektivnährböden wurden Klone randomisiert gepickt und mittels Kolonie-PCR auf Korrektheit des Inserts hin gescreent. Positive Klone wurden für die Sequenzierung zu MWG Eurofins Operon geschickt.

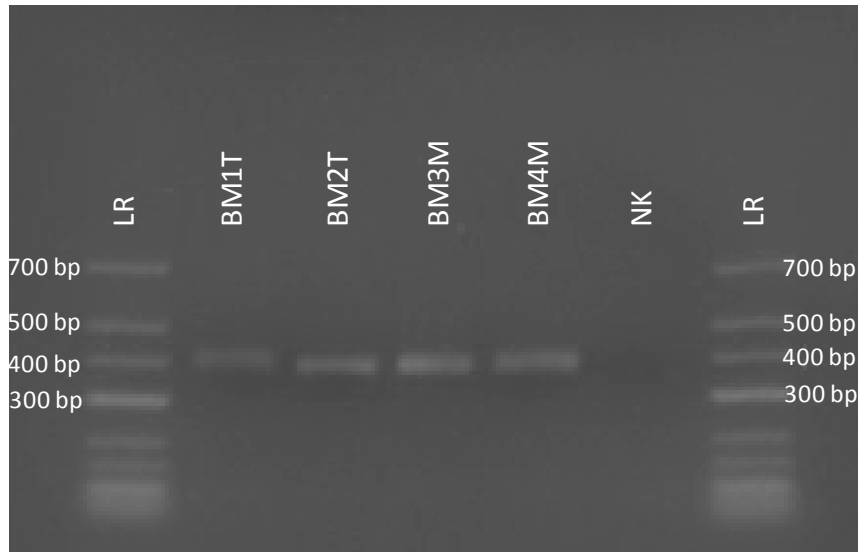


Abbildung 8: Agarosegel der *mcrA/mrtA* Amplifikate der thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Gärgemischproben vom 03.08.2015 bzw. 20.08.2015. LR: low range ladder (Thermo Fisher Scientific), NK: Negativkontrolle, bp: Basenpaare

Die erhaltenen Sequenzen wurden über einen Datenbankabgleich ausgewertet (BLAST) und mit verwandten Sequenzen aus der NCBI- SILVA- oder RDP-Datenbank (ggf. nach manueller Kurierung) in die entsprechenden Alignments aufgenommen. Aus den Alignments wurden über bioinformatische Routinen Stammbäume konstruiert, deren Topologie die Basis für die systematischen Zuordnungen darstellt. Für die phylogenetischen Analysen wurde die Software MEGA 5 und MEGA 6 verwendet (TAMURA *et al.* 2011, TAMURA *et al.* 2013). Die Sequenzen wurden mit dem Online-Tool „Bellerophon“ (HUBER *et al.* 2004), dem Tool „uchime“ innerhalb des Softwarepakets „mothur“ (EDGAR *et al.* 2011) bzw. manuell auf Chimären geprüft und bei positivem Befund aus dem Alignment entfernt.

Auf Basis der phylogenetischen Gruppierung, die sich aus der Stammbaum-Analyse ergab, wurden die prozentualen Anteile der identifizierten Taxa in einer Probe auf DNA- sowie auf mRNA- (bzw. cDNA-) Ebene errechnet. Diese Anteile sind vergleichend in Säulendiagrammen dargestellt. Typische Populationen bzw. Gilden für bestimmte Prozesszustände wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens als Bioindikatoren für diese Zustände definiert, um über ihren Nachweis eine um einen mikrobiologischen Parameter erweiterte Prozessdiagnose zu ermöglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Bereich Verfahrenstechnik

TP2 untersuchte einphasige Biogasprozesse mit deutscher Weidelgrassilage als Substrat bei mesophiler (38°C) sowie thermophiler (55°C) Temperaturführung zu unterschiedlichen Prozesszuständen, bei stabilem Betrieb und im Stresszustand vor dem völligen Prozesszusammenbruch. Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Bearbeitung mikro- und molekularbiologischer Fragestellungen. Dabei wurden auch Substrate und Gärgemische nasschemisch untersucht, und es wurden Prozesskennwerte erfasst.

Am 16.5.2013 wurden 2 mesophile und 2 thermophile Fermenter (28 L) im Durchflussbetrieb angefahren. Als Inokulum diente jeweils Fermenterinhalt aus der Pilotanlage SB2 (Standardbiozönose 2), die mesophil mit Rindergülle und TMR (Totale Mischration) betrieben wird. Das Inokulum wurde nach Sieben (< 1 cm) in die Fermenter gefüllt. Die Fermenter wurden direkt auf Betriebstemperatur erhitzt. Dieses Inokulum wurde auch eine Woche ausgehungert und dann für die Untersuchungen des ATB (TP1) zur Verfügung gestellt. Als Substrat diente Silage aus Deutschem Weidelgras (1. Schnitt). Es wurde auch im TP1 verwendet. Für die einphasigen Systeme in TP2 wurde die Silage gehäckselt, eingefroren und ein zweites Mal gefroren gehäckselt, um eine geringe Faserlänge zu erhalten (s.a. 2.2). Dadurch sollten Probleme mit den Rührwerken vermieden werden. Es wurde Substrat für die gesamte Projektdauer aufbereitet.

Die Biogasproduktion wurde in den mesophilen Fermenter mit einer organischen Raumbelastung (OLR) von $1,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ gestartet. Sie liefen nach einer nur kurzen Einfahrphase stabil (**Abbildung 9**). Die thermophilen Biozönosen brauchten ca. 2 Wochen zur Adaptation an die erhöhte Temperatur anzupassen und wurden dann zunächst mit einer Raumbelastung von $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ gefüttert. **Abbildung 9** zeigt den Verlauf der organischen Raumbelastung (OLR) und der Methanproduktivität für die 4 Fermenter. Am 19.9.2013 wurde die Raumbelastung der mesophilen Fermenter auf $1,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ gesteigert. Anfang November 2013 kam es zu einer Prozessstörung in beiden mesophilen Fermentern, die sich durch einen Einbruch der Gasproduktion und des Methangehalts zeigte (**Abbildung 9**). Ein möglicher Grund für die Störung war die Fütterung verschimmelter Grassilage. Nachdem die Schimmelhöfe vor der Fütterung entfernt wurden liefen die Fermenter ab Anfang des Jahres 2014 wieder stabil bei einer Raumbelastung von $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

In den thermophilen Gärgemischen traten ab Ende April 2015 Anzeichen einer Prozessstörung in Form eines ständigen Anstiegs des Propionsäuregehalts auf ca. $6,5 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ bis zum Versuchsende auf. Ebenso stiegen der Iso-Butter- und Iso-Valeriansäure-Gehalt auf ca. $2 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ an (**Abbildung 10**). Trotz dieser Warnzeichen produzierten die Fermenter noch stabil Gas bei hohen Methanausbeuten zwischen $350 - 400 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kg}_{\text{OTS}}^{-1}$ (**Tabelle 7**) und einem Methangehalt zwischen 50 und 55% im Biogas. Am Ende des Experiments wurde die OLR schnell in 0,5er Schritten von 1,0 auf $3,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ gesteigert, wodurch es letztendlich zum Zusammenbruch der Gasproduktion kam (**Abbildung 9**).

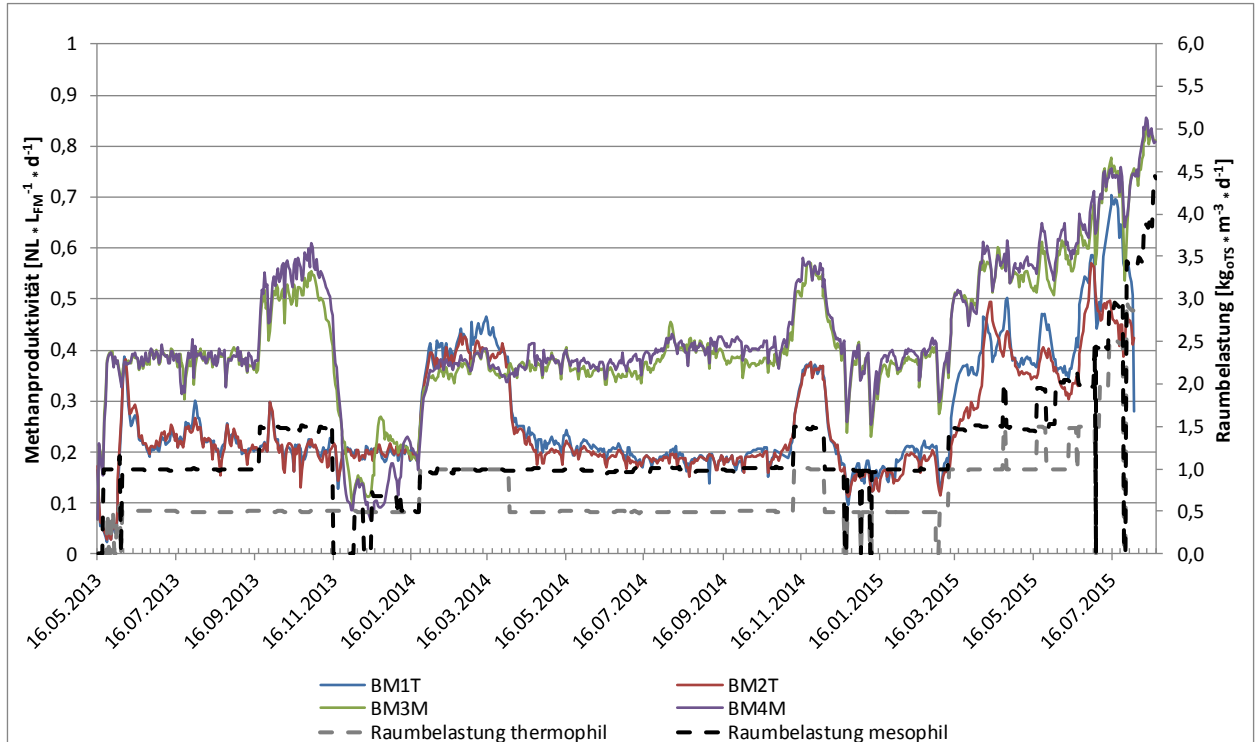


Abbildung 9: Methanproduktivität der thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Fermenter und organische Raumbelastung

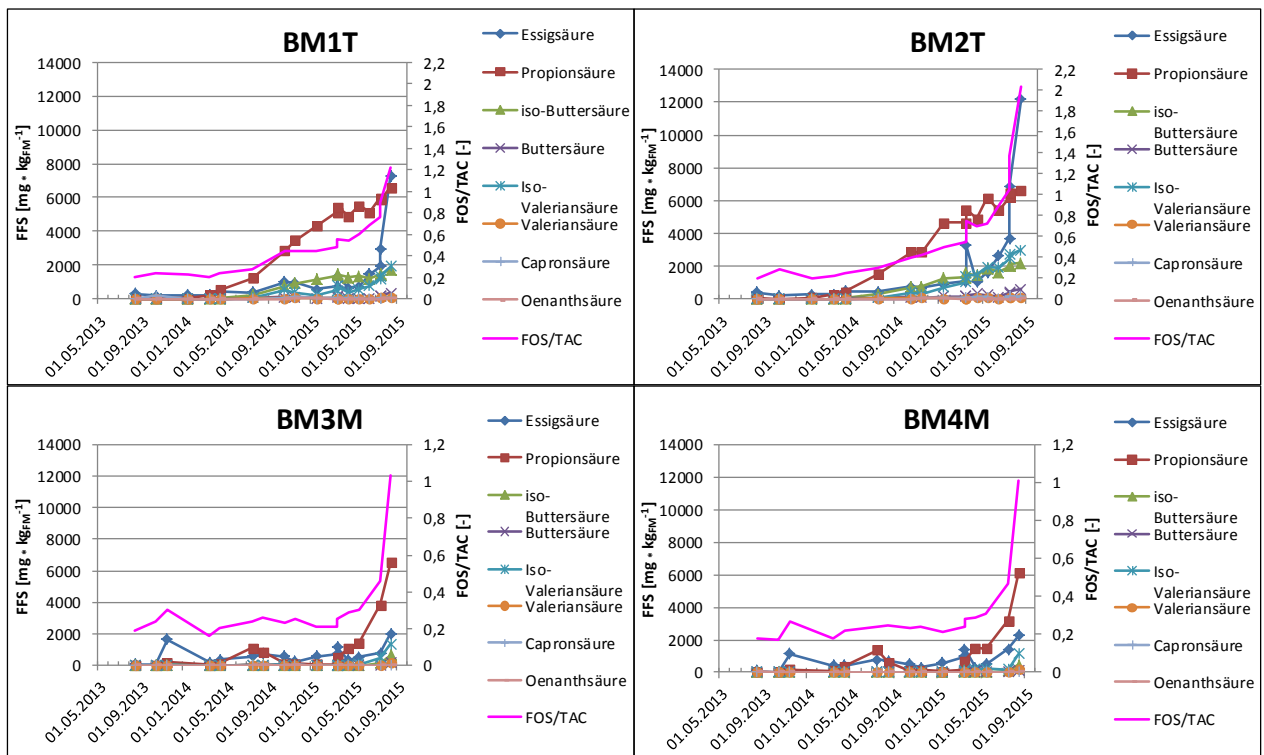


Abbildung 10: Konzentration an flüchtigen Fettsäuren und FOS/TAC-Werte in den thermophilen (BM1T, BM2T) und den mesophilen (BM3M, BM4M) Fermentern

Die mesophilen Fermenter zeigten bis ca. April 2015 keine Zeichen einer Prozessstörung und kein auffälliges Säuremuster. Im März 2015 wurde die OLR gesteigert, um die

Stressphase zu initiieren. Mit steigender OLR stieg auch in den mesophilen Fermentern die Propionsäurekonzentration auf ca. $6,5 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ bis zum Versuchsende an. Auch die Iso-Butter- und die Iso-Valeriansäure-Konzentration nahmen bis zum Versuchsende auf etwa $1 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ zu (**Abbildung 10**). Trotz einer Steigerung der OLR auf $4,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ wurde bis zuletzt kein eindeutiger Einbruch der Gasproduktion festgestellt.

Der FOS/TAC-Wert (Verhältnis flüchtiger organischer Säuren zu totalem anorganischen Kohlenstoff; VOß *et al.* 2009, s.a. 2.3.3) ist in der Praxis ein weit verbreiteter Parameter zur frühen Erkennung einer Prozessversauerung. Im stabilen Betrieb ohne Stresssymptome liegen die Werte typischerweise unter 0,4. Der Schwellenwert für einen kritischen Zustand liegt im Bereich 0,5 – 0,7. Höhere Werte deuten auf eine Prozessversauerung hin. Bei stickstoffreicher Fütterung kann allerdings der Ammonium/Ammoniak-Puffer im Prozess eine Versauerung durch erhöhte FFS (flüchtige Fettsäuren)-Bildung verschleiern (ANDRADE *et al.* 2009a, ANDRADE *et al.* 2009b). Wohl daher lagen die FOS/TAC-Werte in den thermophilen Gärgemischen nur bei ca. 0,5, obwohl die Propionsäuregehalte bereits auf ca. $3 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ angestiegen waren (**Abbildung 10**). Auch in den mesophilen Fermentern lag der FOS/TAC-Wert bei einer Propionsäurekonzentration von ca. $4 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ wegen der hohen NH_4^+ - bzw. NH_3 -Werte (s. unten) noch unter dem Schwellenwert von 0,5 (**Abbildung 10**). Damit erwies sich der FOS/TAC-Wert in den Prozessen mit Grassilage als ungeeignet, Prozessstörungen frühzeitig anzuzeigen.

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung in Klammern des spezifischen Methanertrags der thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Fermenter

OLR [$\text{kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$]	spezifischer Methanertrag [$\text{NL CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$]			
	thermophil		mesophil	
	BM1T	BM2T	BM3M	BM4M
0,5	402 (60)	391 (60)	421 (55)	415 (24)
1,0	384 (47)	359 (57)	374 (29)	386 (30)
1,5	311 (57)	273 (76)	347 (27)	363 (28)
2,0	259 (29)	241 (9)	294 (20)	313 (18)
2,5	265 (11)	184 (9)	283 (20)	290 (13)
3,0	172 (35)	152 (6)	253 (8)	255 (4)
3,5	-	-	211 (16)	219 (13)
4,0	-	-	210 (5)	217 (4)
4,5	-	-	183 (4)	187 (4)

-: keine Werte wegen Prozesszusammenbruch

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die höchsten spezifischen Methanerträge (SMEs) bei der geringsten OLR ($0,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) mit etwas über bzw. etwa $400 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ für die mesophilen bzw. die thermophilen Fermenter erreicht. Bei OLR $1,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ betrug die mesophile SME immer noch beträchtliche ca. 355 NL

$\text{CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ (**Tabelle 7**). Ähnliche Werte sind auch in der Literatur zu finden. WALL *et al.* (2014a) berichten, dass sie für die Mono-Vergärung von Grassilage sogar noch bei einer OLR von $3,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ sehr hohe SMEs von $398 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ erhielten. Bei der Co-Fermentation mit 20% Rindergülle wurden SMEs von $349 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ bei einer OLR von $4,0 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht. In einer anderen Studie berichten WALL *et al.* (2014b), dass die Mono-Fermentation von Grassilage Spurenelemente benötigte und dass sehr hohe Propionsäuregehalte auftraten.

KOCH *et al.* (2009) betrieben einen mesophilen Schlaufenreaktor mit Grassilage als einzigem Substrat. Hier wurde eine SME von $260 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{oTS}}^{-1}$ bei einer OLR von $3,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht. Außerdem wurde der Trockensubstanzgehalt als ein wichtiger Einflussfaktor auf die Prozessstabilität deklariert. Dieser sollte einen Wert von 12% der FM nicht überschreiten. Diese Ergebnisse wurden im vorliegenden Projekt bestätigt.

THAMSIROJ *et al.* (2012) vergoren Weidelgrassilage als Substrat in einem zweistufigen System im Labormaßstab im mesophilen Temperaturbereich. Die Autoren fanden einen deutlichen Anstieg von Lactat während des Experiments. Dies weist auf eine Inhibierung primär der Acetogenese und nicht der Methanogenese hin. Milchsäure könnte somit einen weiteren Indikator für Prozessstörungen bei der Vergärung von Grassilage darstellen. Lactat wurde im vorliegenden Projekt nicht untersucht, sollte aber für weitere Experimente als zusätzlicher Parameter für die Bewertung insbesondere des Zustands intermediärer Prozesse in Betracht gezogen werden.

Aufgrund des relativ hohen Stickstoffgehalts des Substrats stiegen die berechneten Ammoniakkonzentrationen in den mesophilen Fermentern von ca. 100 auf $750 \text{ mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und in den thermophilen von ca. 540 auf $2.200 \text{ mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ stark an. In vorherigen Experimenten und anderen Berichten wurde für nicht adaptierte Prozesse ein kritischer Bereich ab ca. $500 \text{ mg}_{\text{NH}_3\text{-N}} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ festgestellt (LEBUHN *et al.* 2014a, WESTERHOLM *et al.* 2016). Gegen Ende des thermophilen Fermenterbetriebs sank die Ammoniakkonzentration in den thermophilen Gärgemischen deutlich ab (**Abbildung 11**). Zwar stieg der N-Gehalt kontinuierlich weiter an, jedoch verlagerte sich das $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Gleichgewicht aufgrund der zunehmenden Versäuerung auf die Seite des Ammoniums. In den mesophilen Gärgemischen lag der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt meist etwas über und in den thermophilen Gärgemischen deutlich über dem genannten kritischer Bereich von etwa $500 \text{ mg}_{\text{NH}_3\text{-N}} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Da die Prozesse dennoch effizient abliefen, mussten die aktiven mikrobiellen Populationen an die hohen NH_3 -Gehalte adaptiert gewesen sein.

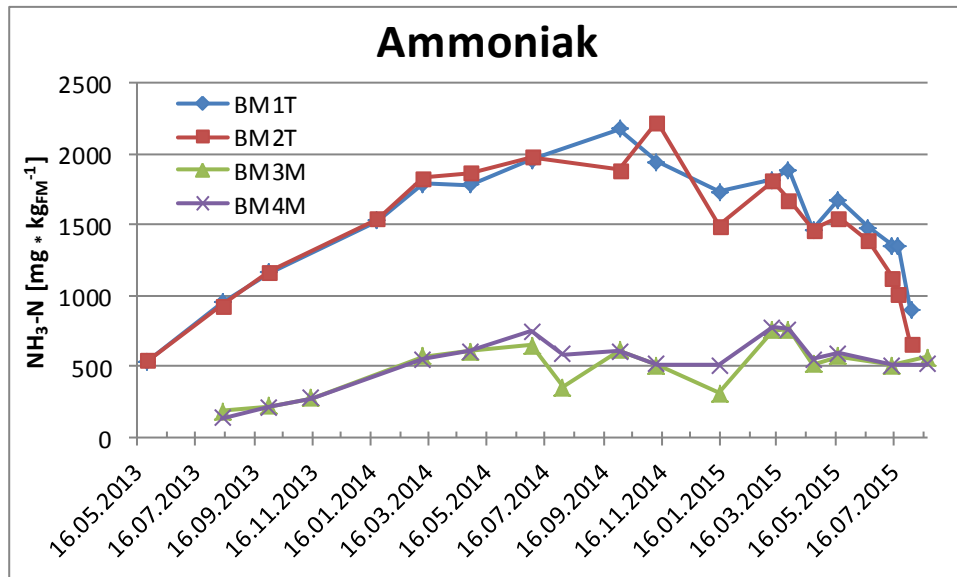


Abbildung 11: Verlauf der Ammoniakgehalte in den thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Fermentern

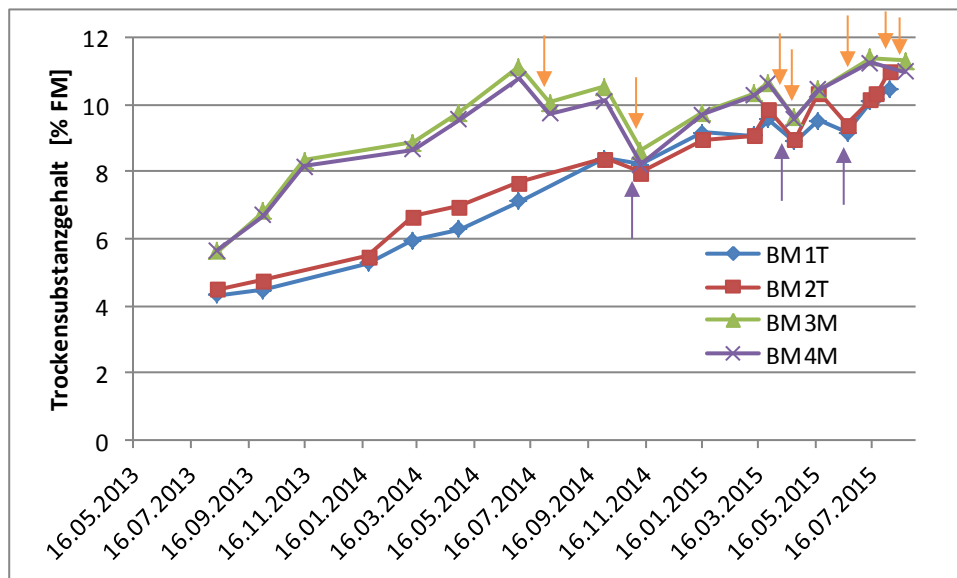


Abbildung 12: Verlauf der Trockensubstanzgehalte in den thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Fermentern. Pfeile indizieren Verdünnungen der thermophilen (violett) bzw. mesophilen (orange) Fermenter mit Wasser

Im Laufe der Untersuchungen stieg der Trockensubstanzgehalt in den Fermentern kontinuierlich an. Vor allem in den mesophilen Fermentern wurden TS-Gehalte von ca. 11% der Frischmasse erreicht (**Abbildung 12**). Die Gärgemische mussten bei der Steigerung der organischen Raumbelastung (OLR) einige Male verdünnt werden (s. Pfeile in **Abbildung 12**), da sonst die Gefahr bestand, dass der mit der steigenden OLR verbundene Anstieg des TS-Gehalts technische Probleme mit den Rührwerken verursacht. Zu jedem Verdünnungszeitpunkt wurde an drei aneinander folgenden Tagen je ein Liter Fermenterinhalt gegen einen Liter Wasser ausgetauscht. In den mesophilen Gärgemischen lag der TS-Gehalt wohl primär wegen der dort größeren OLR praktisch durch-

wegs höher als in den thermophilen. Die mesophilen Gemische mussten daher vor allem am Ende der Untersuchungen öfter als die thermophilen verdünnt werden, um nicht einen TS-Gehalt von ca. 11% zu überschreiten.

Mit dem Austausch von aktivem Fermenterinhalt gegen Wasser wurden nicht nur die Gärgemische verdünnt, es wurde auch die Verweilzeit der Mikroorganismen verkürzt. Die Mikroben hatten weniger Zeit sich zu vermehren und wurden verstärkt ausgespült. Davon waren offenbar nicht nur die methanogenen Archaeen betroffen, wie der Rückgang der Methanproduktion (**Abbildung 9, Tabelle 7**) bei gleichzeitigem Anstieg der Intermediat-Konzentrationen (**Abbildung 10**) zeigt, der Anstieg des TS-Gehalts weist auch auf eine Inhibierung der Hydrolyse/Acidogenese und/oder der Sekundärfermentation („Acetogenese“) im Prozess hin (vgl. **Abbildung 1**).

In der Literatur werden Konzentrationen zwischen 50 und 1.450 mg NH₃-N * kg_{FM}⁻¹ angegeben, die zu einer Inhibierung des Biogasprozesses führen können (SCHNÜRER 2016). Verschiedene Einflussgrößen wie die Verweilzeit bzw. die zur Verfügung stehende Zeit zur Verdopplung der Mikroorganismen, die Substratzusammensetzung, der pH-Wert oder auch die Temperatur beeinflussen diese Hemmschwelle. Wenn die Mikroorganismen im Biogasprozess genügend Zeit zur Adaption haben, können sie sehr hohe NH₃-N Konzentrationen tolerieren (RAJAGOPAL *et al.* 2011, SCHNÜRER 2016). Dies wurde in der vorliegenden Studie auch bestätigt: die thermophilen Biozönosen produzierten bei einer hohen NH₃-N-Konzentration von ca. 2,2 g * kg_{FM}⁻¹ immer noch einen hohen spezifischen Methanertrag von ca. 370 NL CH₄ * kg_{oTS}⁻¹.

Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass Grassilage als Substrat zur Erzeugung von erneuerbarer Energie als Alternative zur Maissilage eingesetzt werden kann. Jedoch ergibt sich durch die höheren Faser- und Ammoniakgehalte ein erhöhter Aufwand bei der Betreuung des Prozesses, und es können neben dem Ammoniak weitere inhibierende Substanzen wie Coumarin und andere phenolische Verbindungen den Biogasprozess negativ beeinflussen (HERNANDEZ & EDYVEAN 2008, HECHT & GRIEHL 2009, POPP *et al.* 2015). Solche Substanzen und ihr Einfluss auf den Biogasprozess wurden allerdings in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Wegen der Anreicherung inhibierender Substanzen bei der Langzeit-Vergärung von Grassilage ist es aber ratsam, größere Anteile dieses Substrats zumindest periodisch durch andere Substrate wie Maissilage oder Rindergülle zu ersetzen, um Prozessstörungen vorzubeugen.

3.2 Bereich Molekularbiologie

3.2.1 Standardisierung und Optimierung der Nukleinsäure-Extraktion

Ein Fokus der Arbeiten lag auf der Optimierung und Standardisierung des DNA-Extraktionsprotokolls. In einem Vorversuch wurde die Effizienz des im TP2 angewendeten LfL-Protokolls mit dem Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, MPBio; s.a. Abschnitt 2.4.2) im Vergleich zu analogen Verfahren mit Verwendung anderer DNA-Extraktionskits (MoBio, QiaStool) evaluiert. **Abbildung 13** zeigt die Ergebnisse. Für das im TP2 benutzte LfL-Protokoll (MPBio) ergab sich eine Wiederfindungsrate von 88%, für

die Varianten MoBio und QiaStool waren 60,6% bzw. 37,5% zu verzeichnen. Die Ergebnisse wurden auch vor kurzem veröffentlicht (LEBUHN *et al.* 2016) und stützen die in Abschnitt 2.4.2 aufgeführten Informationen.

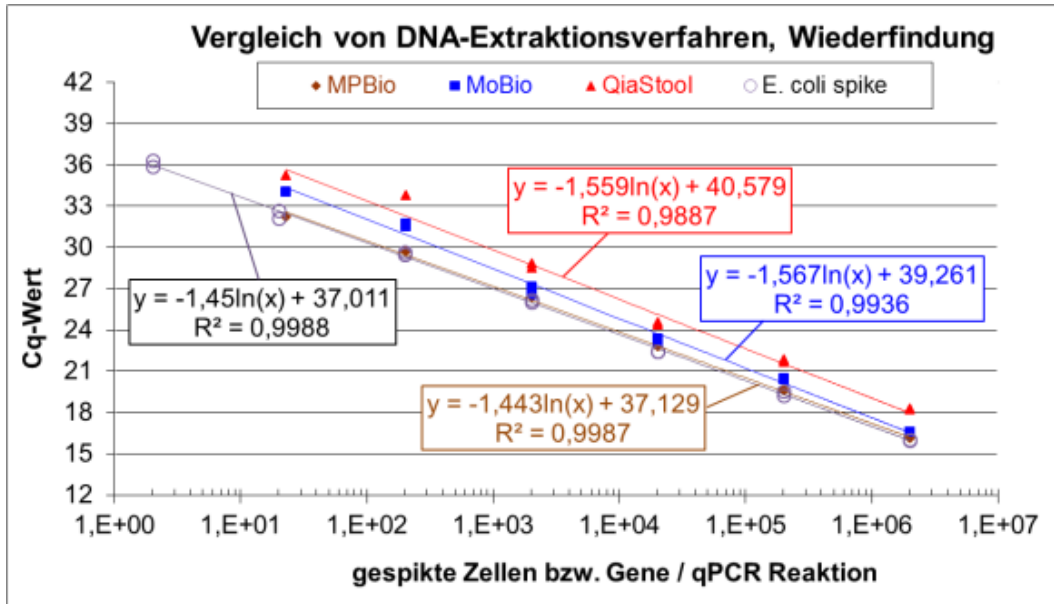
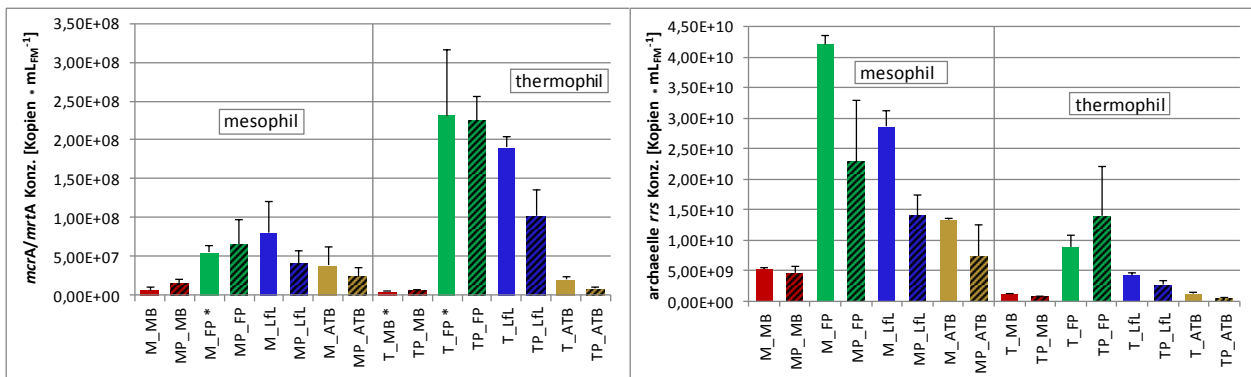


Abbildung 13: Vergleich von DNA-Extraktionsverfahren; Wiederfindung von *E. coli* DNA von zur Probe gespikten *E. coli* Zellen mit *mcrA*-qPCR (Einzelkopie-Gen); MPBio: LfL-Protokoll (s. 2.4.2), MoBio: MoBio UltraClean® Soil DNA Isolation Kit; QiaStool: Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit



* Es wurde unverdünnter und 1:10 verdünnter Extrakt gemessen, wobei der unverdünnte Extrakt in der qPCR inhibiert war und nicht in die Berechnung mit einfluss

Abbildung 14: Vergleich unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden (MB: MoBio-Kit, FP: FastPrep, LfL: LfL-Protokoll, ATB: ATB-Protokoll) hinsichtlich der Konzentration extrahierter *mcrA/mrtA* bzw. *rrs* (16S rRNA) Gene; MP bzw. TP: mit Sephacryl-Säule gereinigte Extrakte aus mesophilem (M) bzw. thermophilem (T) Betrieb

Im Rahmen des verbundinternen DNA-Ringversuchs extrahierte Partner ATB DNA mit unterschiedlichen Extraktionsprotokollen (MoBio-Kit, ATB-hauseigenes Protokoll, LfL-Protokoll, FastPrep-Protokoll) aus Perkolationsflüssigkeit der an ATB betriebenen Fermenter (thermophil und mesophil). Die Extrakte wurden der LfL zur Quantifizierung der

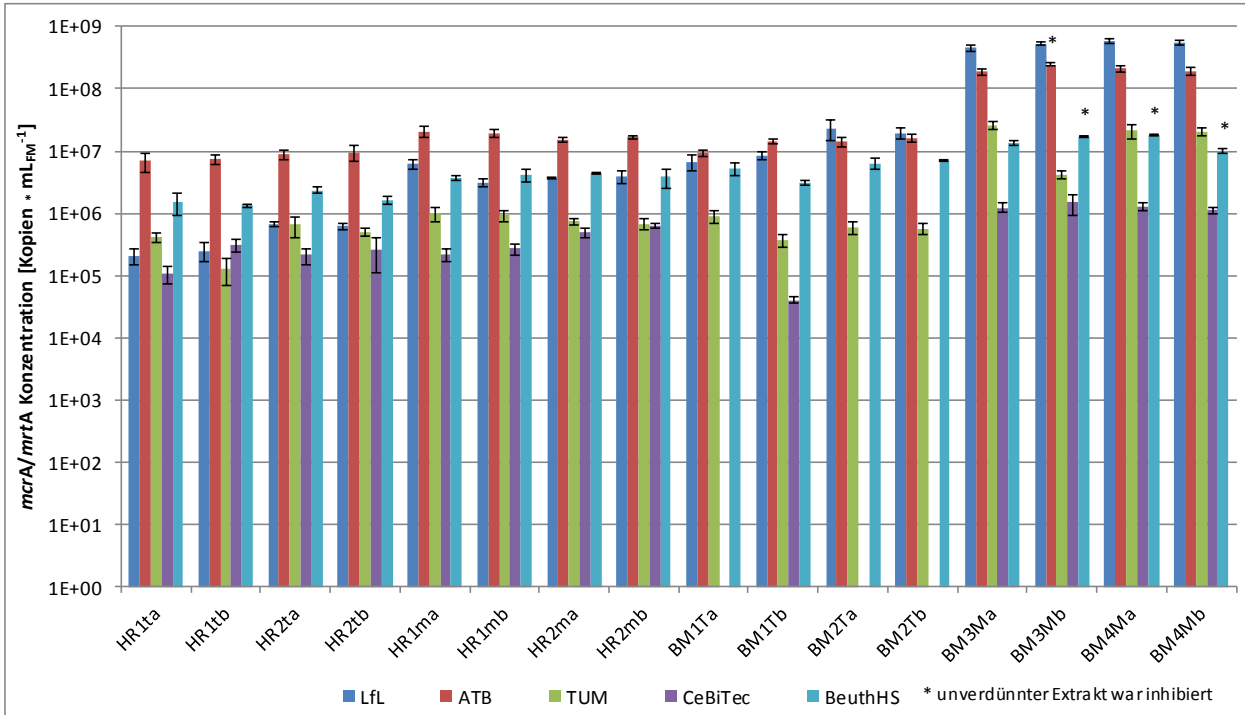
methanogenen Archaeen mit qPCR-Analytik (vgl. 2.4.4) zur Verfügung gestellt. ATB (TP1) quantifizierte parallel auch archaeelle 16S rRNA-Gene. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der beiden Ansätze ist in **Abbildung 14** dargestellt.

Für die einzelnen Proben wurden jeweils unverdünnte und 1:10 verdünnte Extrakte gemessen. Die Quantifizierung des *mcrA/mrtA* Gens ergab für den FastPrep- und den MoBio-Kit eine inhibierte Amplifikation der unverdünnten Proben. Da demnach zu viele Inhibitoren wie z.B. Huminstoffe in den unverdünnten DNA-Extrakten vorhanden waren, war die Sensitivität dieser beiden Assays reduziert. Sie sind damit zur empfindlichen Analyse sehr geringer DNA-Gehalte weniger geeignet als die Methoden „LfL-Protokoll“ und „ATB-Protokoll“.

Abbildung 14 zufolge ergaben die mit dem MoBio-Kit extrahierten DNA-Extrakte die niedrigsten Genkonzentrationen. Sowohl für das *mcrA/mrtA* Gen als auch für das archaeelle 16S rRNA Gen wurden mit dem FastPrep-Protokoll und dem LfL-Protokoll die höchsten Kopienzahlen erzielt. Beide nutzen das MPBiomedicals-Kit mit vorgeschaltetem bead-beating (s. 2.4.2). In einer Variante wurden die Extrakte mit einer Sephacryl-Säule aufgereinigt. Hierbei wurden jedoch wahrscheinlich durch Verluste während dieser Reinigung meist geringere Genkonzentrationen gemessen (**Abbildung 14**). Eine Nachreinigung scheint, wie schon durch LEBUHN *et al.* (2003) berichtet, keine Vorteile zu bringen.

Für den verbundübergreifenden DNA-Extraktions-Ringversuch (**Abbildung 15**) wurden Perkolatproben aus den ATB-Fermentern und Gärrestproben aus den LfL-Fermentern an die Projektpartner verschickt. Jeder Partner extrahierte mit seinem hauseigenen DNA-Extraktionsprotokoll DNA (mit technischem Replikat) und verschickte die DNA-Extrakte wieder an die Partner. Die Extrakte wurden von den Partnern mit deren hauseigenem qPCR-Protokoll hinsichtlich unterschiedlicher Zielgene bzw. -organismen quantifiziert. An der LfL wurden methanogene Archaeen (*mcrA/mrtA*-Genkopien) nachgewiesen.

Die Quantifizierung der biologischen Replikate ergab für die einzelnen Protokolle jeweils sehr ähnliche Resultate, die Reproduzierbarkeit der einzelnen DNA-Extraktionsprotokolle ist also zufriedenstellend. Jedoch waren teilweise deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Extraktionsprotokollen festzustellen (**Abbildung 15**): Für die flüssigen Proben von den ATB-Hydrolysereaktoren (HR) ergaben die DNA-Extrakte des ATB die besten Ergebnisse, während für die stark viskosen Proben (BM3M, BM4M) mit dem LfL-Protokoll die besten Resultate erzielt wurden. Für die nicht ganz so viskosen Proben (BM1T, BM2T) wurden mit den Protokollen des ATB und der LfL äquivalent die besten Ausbeuten in etwa gleicher Höhe extrahiert. Den Ergebnissen zufolge ist die Konsistenz der Matrix ein wichtiger Faktor bei der Wahl, welches Protokoll für die zu untersuchende Probe verwendet und ggf. optimiert werden sollte. Beispielsweise zeigten Nachuntersuchungen (nicht dargestellt), dass die Extraktionseffizienz des LfL-Protokolls für flüssige Proben bei Einsatz größerer Einsatzvolumina wesentlich verbessert ist.



Die in der Legende genannten Institutionen/Partner extrahierten die DNA aus den Gärungsmischproben; die LfL führte die qPCR-Analytik auf methanogene Archaeen durch

Abbildung 15: Ergebnisse des DNA-Ringversuchs, *mcrA/mrtA* Konzentration in den Extrakten der verschiedenen Partner. HR1ta-HR2mb: Fermenter des ATB, BM1Ta-BM4Mb: Fermenter der LfL; a, b: technische Replikate

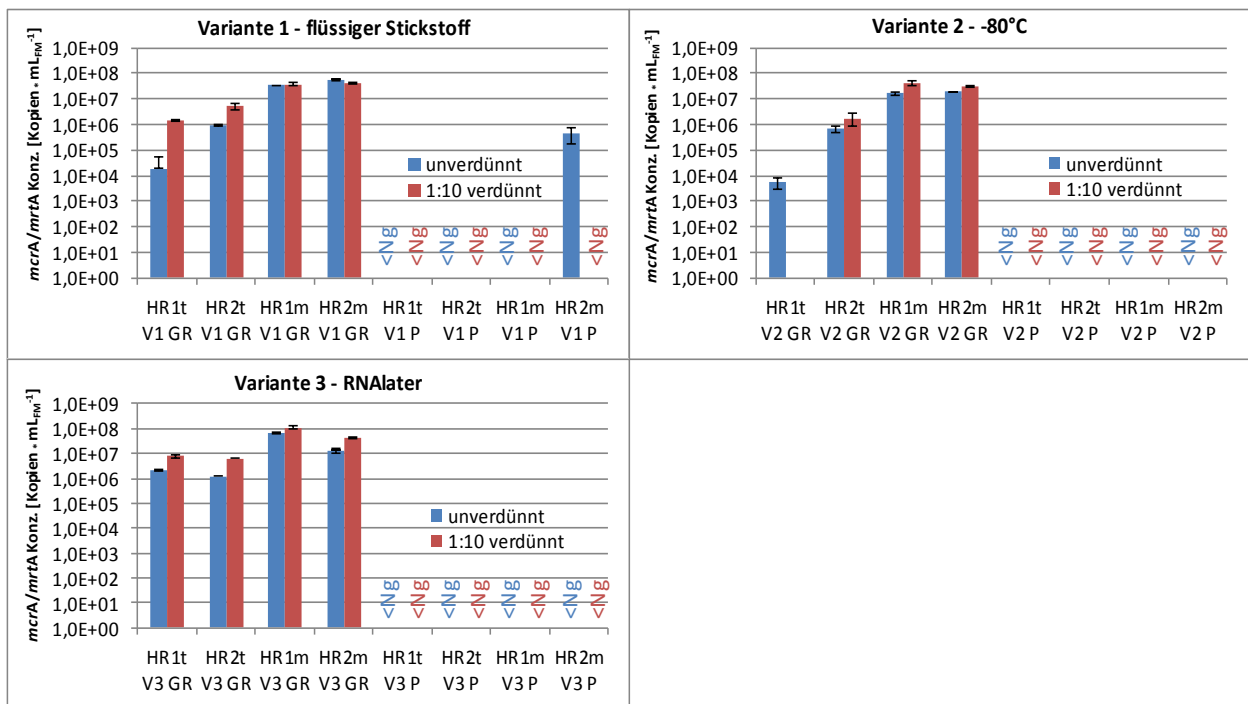


Abbildung 16: Einfluss der Probenfixierung auf die gemessenen *mcrA/mrtA* Kopien für die Gärrest- (HR1t-HR2m V1-V3 GR) und die Perkolatproben (HR1t-HR1m P) der ATB-Fermenter; <Ng>: unterhalb der Nachweisgrenze

Weiterhin wurde ein RNA-Ringversuch durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Fixiermethoden auf die Stabilität der RNA anhand von Proben (Perkolat, Feststoff) aus Gärgemischen der ATB-Fermentersysteme getestet (**Abbildung 16**). Die Proben wurden (1) in flüssigem Stickstoff schockgefroren, (2) direkt auf -80°C gefroren oder (3) mit RNAlater bzw. (4) mit Formaldehyd fixiert. Die Gesamt-RNA-Extrakte wurden mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben (*mcrA/mrtA* Reverse Primer) und mit dem für methanogene Archaeen spezifischen *mcrA/mrtA*-qPCR-Assay (s. Abschnitt 2.4.4) quantifiziert (**Abbildung 16**). In den Perkolatproben und für die Methode mit Formaldehyd konnte keine *mcrA/mrtA*-mRNA nachgewiesen werden. Für die Feststoffproben wurden mit den anderen drei Methoden gute Resultate mit etwa gleicher Ausbeute erzielt. Mit der unverdünnten cDNA war die qPCR im Vergleich zu der 1:10 verdünnten meist leicht inhibiert.

Eine geeignete Fixierung der Fermenterproben ist z.B. bei einem Versand von Proben an Projektpartner wichtig und um gegebenenfalls interessante Prozesszustände auch zu einem späteren Zeitpunkt untersuchen zu können. Im ersten RNA-Ringversuch (**Abbildung 16**) erwies sich RNAlater als zumindest ebenso geeignete Fixierungsvariante wie die gängige „best practice“ Variante Schockfrieren in flüssigem Stickstoff. Dabei ergab sich für die Lagerung in RNAlater gegenüber der sofortigen Bearbeitung der frischen Probe ein Verlust von 50%.

Um die optimale Lagerungstemperatur mit RNAlater zu bestimmen, wurde RNA aus bei -20°C und -80°C gelagerten Fermenterproben extrahiert. Die Quantifizierung der methanogenen Archaeen zeigte, dass ca. die doppelte Menge an RNA aus den bei -80°C gelagerten Proben gegenüber den bei -20°C gelagerten Proben gewonnen wurde (**Abbildung 17**). Daher wurden Rückstellproben im weiteren Verlauf der Arbeiten für spätere Untersuchungen bei -80°C in RNAlater gelagert.

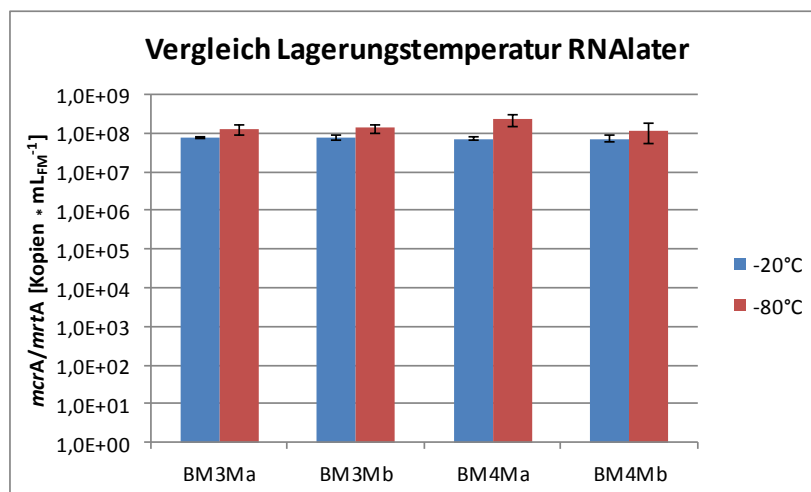


Abbildung 17: Einfluss der Lagerungstemperatur von in RNAlater gelagerten Fermenterproben auf die Sensitivität der RT-qPCR-Ergebnisse

Um eventuell Kosten sparen zu können, wurde neben dem kommerziellen RNAlater auch ein selbst hergestelltes Konservierungsmittel (**Tabelle 8**) getestet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des selbst hergestellten RNA-Konservierungsmittels

Reagenz	Endkonzentration
EDTA	20 mM
Natriumcitrat	25 mM
Ammoniumsulfat	5,3 M
H ₂ SO ₄ (1 M)	pH 5,2

Während bei einer geringen RNA-Konzentration (BM1T, BM2T, **Abbildung 18**) kein eindeutiger Trend zwischen kommerziellem und selbst hergestelltem Konservierungsmittel sowie einer frischen Probe festgestellt wurde, wurden bei höherer RNA-Konzentration (BM3M, BM4M, **Abbildung 18**) geringere RNA-Mengen bei der Lagerung im selbst hergestellten (ca. 80% Verlust) als im kommerziellen (ca. 50% Verlust) Konservierungsmittel gemessen. Die frische Probe schnitt am besten ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das kommerzielle RNAlater weiterhin für die Probenfixierung eingesetzt.

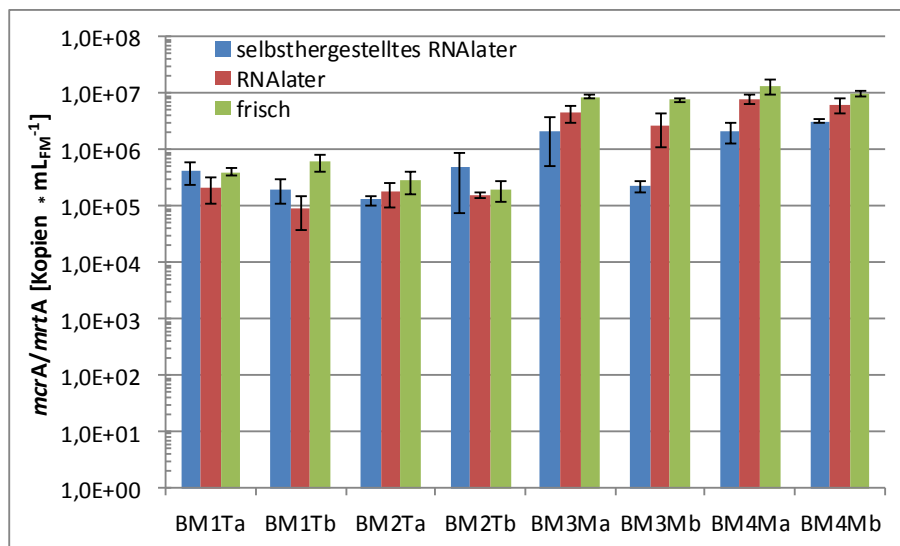


Abbildung 18: Einfluss von kommerziellem RNAlater und selbst hergestelltem RNA-Konservierungsmittel auf die Wiederfindung der RNA methanogener Archaeen

Ein weiterer wichtiger Arbeitspunkt war die Optimierung der RNA-Extraktion für Metatranskriptomanalysen. Hier wird hochreine und intakte RNA in größerer Menge benötigt. Die Qualität der RNA kann z.B. mit dem BioAnalyzer (Agilent Technologies) bestimmt werden. Dabei wird die ribosomale 16S und 23S rRNA im RNA-Extrakt analysiert. Die mit der Standard-Extraktionsmethode (FastRNA Pro Soil-Direct Kit, MP Biomedicals) extrahierte RNA zeigte keine zufriedenstellende Qualität für die Metatranskriptomanalyse.

se. Auch die RNA-Extraktion einer frisch in LB-Medium angezüchteten *Escherichia coli*-Kultur ergab eine nur ungenügende RNA-Qualität. Deshalb wurden verschiedene Einsatzmengen von Gärresten und verschiedene RNA-Extraktionskits getestet.

Durch die Erhöhung der Einsatzmengen konnte die Extraktionsqualität nicht verbessert werden. Mit der Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) konnte die Qualität der extrahierten RNA deutlich verbessert werden. Dabei traten zwei definierte Banden für die 16S und 23S rRNA auf (**Abbildung 19**). Es sind in jedoch in **Abbildung 19** noch zusätzliche Peaks zu sehen, die nicht näher definiert werden konnten (Peaks bei 34 s, 39 s und 44 s). Somit lag der RIN-Wert, der als Maß für die Qualität der RNA herangezogen wird (10: intakt bis 1: degradiert) und für Metatranskriptomanalysen über 8,0 liegen sollte, nur bei 6,8. Außerdem war die RNA-Konzentration mit einem Wert von ca. $1,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Extrakt (total $0,9 \mu\text{g}$ RNA) sehr gering. Für die Metatranskriptomanalyse werden mindestens $3 \mu\text{g}$ RNA benötigt. Die RNA-Extraktion mit diesem Kit muss also noch weiter optimiert werden, um auch für hochviskose Fermenterproben mit vielen Störstoffen, also z.B. für die im vorliegenden TP2 einstufig mit Grassilage betriebenen Fermenter der LfL, qualitativ und quantitativ geeignete RNA für die Metatranskriptomanalyse zu erhalten. Die o.g. geforderte Qualität konnte bis zum Abschluss des Projektes nicht erreicht werden, weswegen auch keine geeignete RNA für die Metatranskriptomanalyse des TP4 generiert werden konnte. Somit konnte dieses Arbeitspaket nicht vollständig erfolgreich abgearbeitet werden. Die Ergebnisse zum Metagenom und Metatranskriptom der zweiphasigen Systeme sind in den Berichten des TP1 bzw. TP4 zu finden.

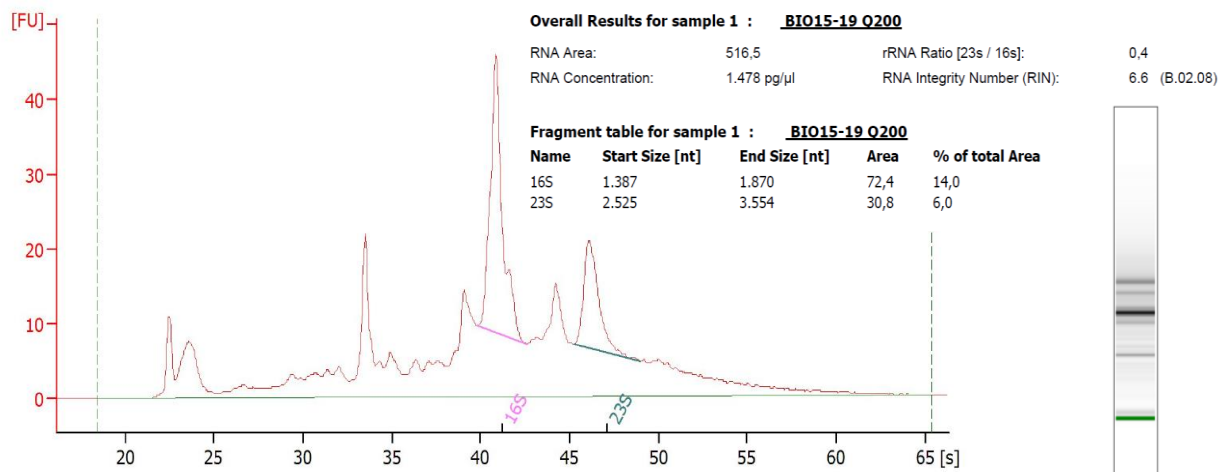


Abbildung 19: Chromatogramm einer RNA-Extraktion (Qiagen RNeasy Mini Kit) aus dem mesophilen Fermenter BM3M (19.05.2015)

Durch die quantitative Analyse der aus extrahierter mRNA umgeschriebenen cDNA lässt sich die (transkriptionelle) Aktivität von Organismen im Biogasprozess semiquantitativ darstellen. Dabei ist die Bestimmung der RNA-Extraktionseffizienz und der RT-Effizienz ein wichtiger Punkt, um Verluste bei der Präparation zu bestimmen und damit die spezifische (transkriptionelle) Aktivität der Zielgruppen korrekt zu quantifizieren.

Um die RNA-Extraktionseffizienz zu bestimmen, wurden zwei Laborfermenter beprobt und mit einer definierten Menge an synthetischer RNA (TATAA RNA Spike I) gespikt (dotiert). Anschließend wurde die RNA mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit extrahiert. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte während der RNA-Extraktion wurde der RNA Spike mit Wasser auf dieselbe Konzentration eingestellt, um eine eventuelle Inhibition bzw. Verluste zu bestimmen. Der mit Wasser verdünnte RNA Spike wurde ca. 1,5 PCR-Zyklen (Cq-Werte) früher detektiert als der mit Fermenterprobe extrahierte Ansatz (**Abbildung 20**). Dies bedeutet, dass etwa 65% der gespikten RNA verloren ging oder durch Inhibition nicht detektiert wurde. Um die RNA-Extraktion noch weiter zu optimieren, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden, um die Verluste bei der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription separat zu bestimmen und zu minimieren.

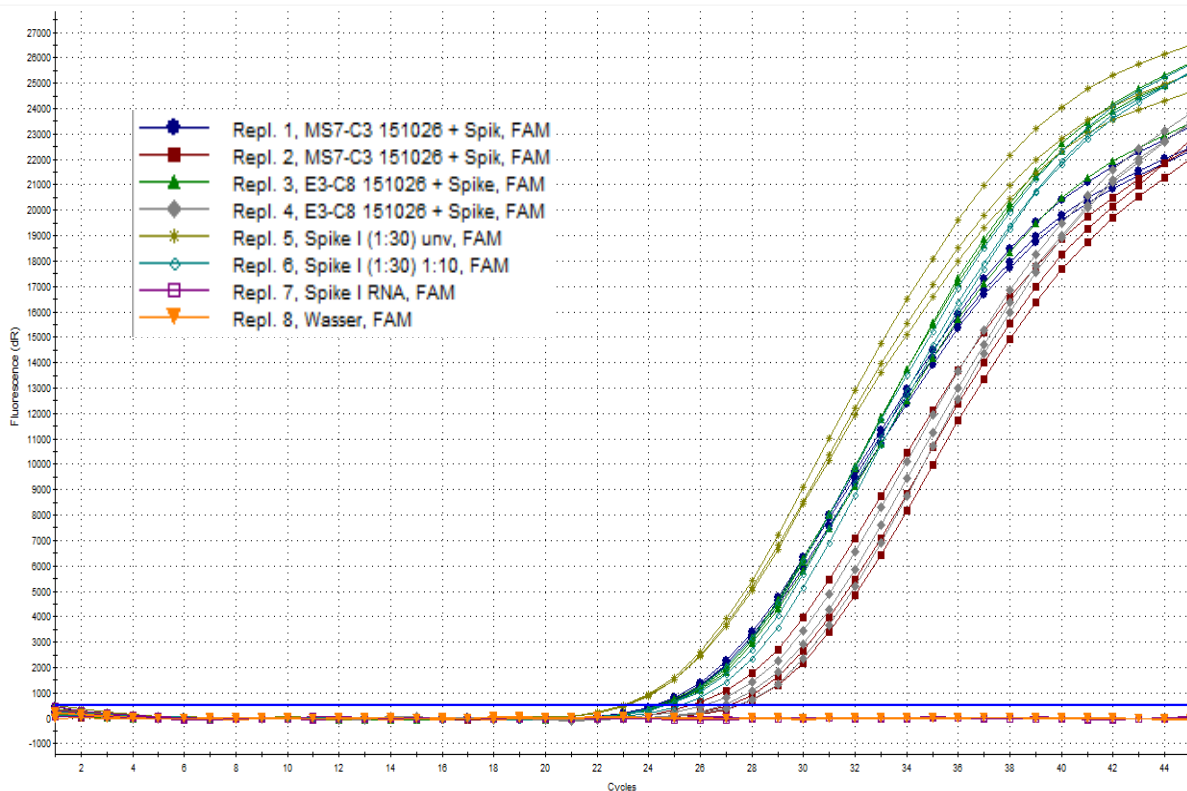


Abbildung 20: Amplifikationsplots (Ausschnitt) zweier gespikter (TATAA RNA Spike I) und mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit extrahierter Fermenterproben (MS7-C3 und E3-C8) sowie des entsprechenden RNA-Spikes für die Bestimmung der RNA-Extraktions- und RT-Effizienz

3.2.2 Aktivitätsparameter Metabolischer Quotient (MQ) und cDNA/DNA-Verhältnisse

Ein weiterer Fokus des TP2 (vgl. Abschnitt 1.2.2) lag auf der Analyse der Parameter Metabolischer Quotient (MQ) und cDNA/DNA- bzw. Transkript/Gen-Verhältnis (*mcrA/mrtA* als Zielgen von methanogenen Archaeen und *fhs* als Zielgen von AASF-Bakterien, vgl. Abschnitt 2.4.1), die beide der Bestimmung der Aktivität der methanoge-

nen Archaeen dienen (**Abbildung 21**). Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass sie zur Prozessdiagnose und zur molekularbiologischen Detektion eines Stresszustands eingesetzt werden können (MUNK *et al.* 2012, LEBUHN *et al.* 2014a, MUNK & LEBUHN 2014).

Der MQ lag zu Versuchsbeginn in den jeweils beiden mesophil und thermophil geführten Gärgemischen (gleiches Inokulum) bei ca. 0,01. Dieser geringe Wert weist auf einen wenig aktiven Zustand der Methanogenen zu diesem Zeitpunkt hin und ist angesichts der hier geringen OLR (thermophil $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, mesophil $1,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) auch plausibel.

In den thermophilen Fermentern stieg der MQ leicht an (der vorübergehende Einbruch der *mcrA/mrtA* cDNA/DNA-Verhältnisse ist unten bei der Vorstellung der Ergebnisse der mesophilen Prozesse diskutiert) und erreichte bei der OLR-Steigerung auf $1,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ den für Normalbetrieb erwarteten Wert von etwa 1. Obwohl die OLR in der Folge wieder auf $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ gesenkt wurde, verblieb der MQ in den thermophilen Gärgemischen zunächst bei etwa 1. Auch das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis erreichte in den beiden Fermentern Werte im Normalbereich (0,1 – 1). Weil (1) der MQ mit der OLR-Rücknahme nicht wieder fiel und gleichzeitig (2) das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis wie auch (3) der FOS/TAC-Wert und (4) der Propionsäuregehalt kontinuierlich anstiegen (**Abbildung 21**, **Abbildung 10**), wiesen diese Symptome bereits zu diesem frühen Zeitpunkt auf eine anstehende Prozessstörung hin.

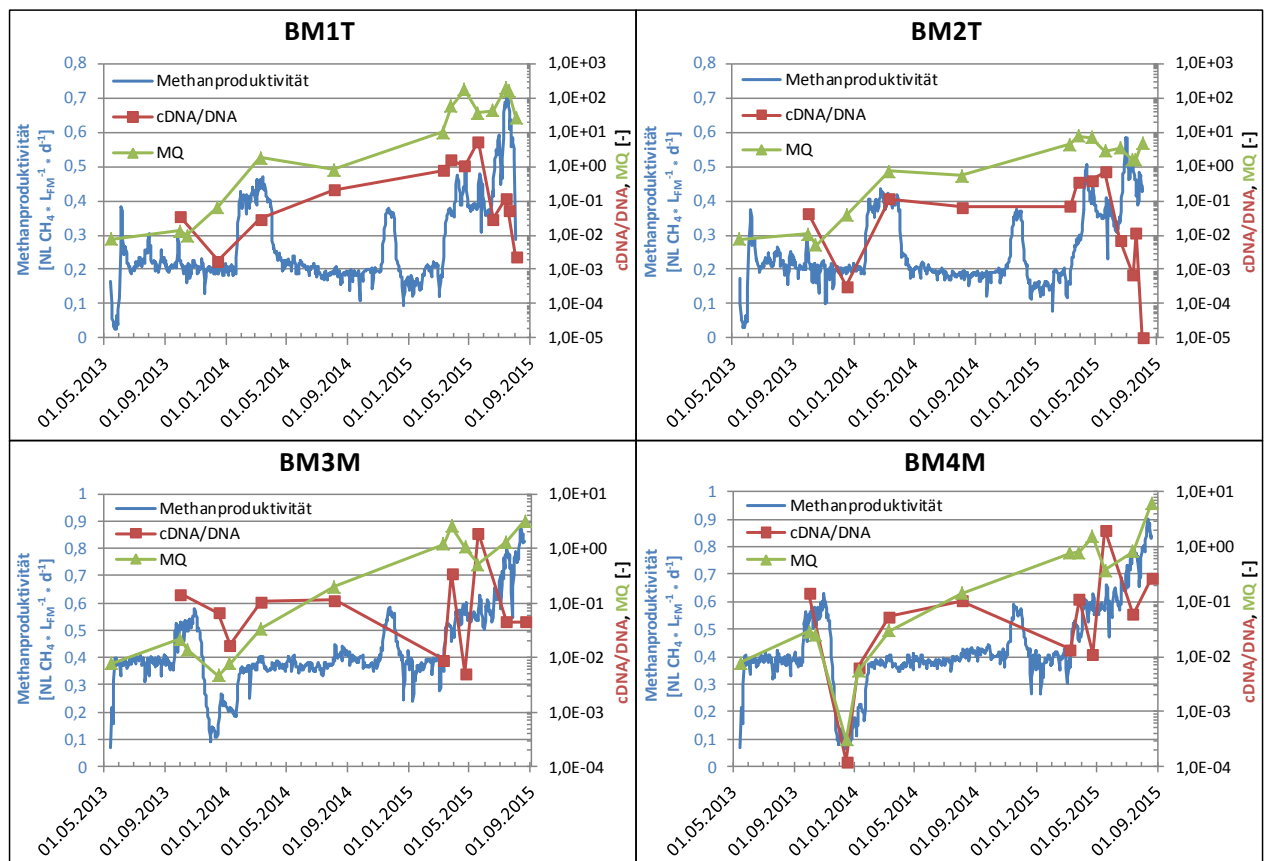


Abbildung 21: Methanproduktivität, *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis und Metabolischer Quotient (MQ) in den thermophilen (BM1T, BM2T) und den mesophilen (BM3M, BM4M) Fermentern

Mit der Induktion der Stressphase durch schrittweise Steigerung der Raumbelastung ab dem 11.03.2015 und den damit einhergehend steigenden Säuregehalten stieg auch der MQ in den thermophilen Gärgemischen auf Werte bis zu 190 an. Die methanogenen Zellen produzierten im betrachteten Prozesszustand also deutlich mehr Methan als im Normalzustand (MQ etwa 0,1 - 4), was bedeutet, dass sie mehr Energie für ihre Zellfunktionen benötigten als im Normalzustand - sie befanden sich also im metabolischen Stress. Dies kündigt einen Prozesszusammenbruch an, wenn die Intensität der Stressoren anhält oder sogar noch steigt. Dem entsprechend brachen die thermophilen Prozesse in der Folge zusammen, im Fermenter BM1T mit den höheren MQ-Werten noch früher als im Fermenter BM2T (**Abbildung 21**). Auch die *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnisse spiegelten diese Entwicklungen wider: nach einem kurzen Anstieg (in BM1T sogar auf etwa 8, deutlich über das Normalniveau hinaus) brach die spezifische *mcrA/mrtA*-Transkription mit der Methanproduktion ein.

In den mesophil betriebenen Fermentern (BM3M und BM4M in **Abbildung 21**) stieg der MQ von anfangs 0,01 auf etwa 0,02 nach der ersten OLR-Steigerung auf $1,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Danach brach die Methanproduktivität höchstwahrscheinlich infolge der Fütterung von verschimmelter Grassilage in den Fermentern BM3M und BM4M ein, und auch der Acetatpeak am 14.11.2013 (**Abbildung 10**) wies auf eine Störungsinduktion hin. Die Fütterung dieser Fermenter wurde vorübergehend ausgesetzt (s. **Abbildung 9**), und der MQ sank hier entsprechend auf unterkritische Werte ($<0,01$). Interessanterweise war die Methanproduktion der thermophilen Biozönosen nicht betroffen, obwohl ihnen die gleiche verschimmelte Silage gefüttert wurde. In den Fermentern BM1T und BM2T brach jedoch das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis vorübergehend ein, während der MQ anstieg (**Abbildung 21**). Die spezifische *mcrA/mrtA*-Transkription war also sowohl in den meso- als auch in den thermophilen methanogenen Archaeen vorübergehend kompromittiert, die Methanproduktion aber nur in den mesophilen methanogenen Archaeen.

Nach Aussetzen der Fütterung der Fermenter BM3M und BM4M und Erholung des Prozesses stieg der MQ erst gegen Ende der stabilen Phase (19.02.2014 – 10.03.2015) in den erwarteten Bereich um etwa 1 an. Das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnis erreichte in dieser Phase nur die untere Schwelle (ca. 0,1) der normalen spezifischen *mcrA/mrtA*-Transkription. Ab dem 11.03.2015 wurde durch schrittweise Erhöhung der OLR die Stressphase induziert, und gleichzeitig stieg auch der MQ an (**Abbildung 21**). Wahrscheinlich wegen der häufigen Verdünnung der Gärgemische kam es in beiden mesophilen Fermentern nochmals zu einem kleinen Rückgang des MQ in der Stressphase bevor das Maximum des MQ-Werts von ca. 6 am Versuchsende erreicht wurde. Die spezifische *mcrA/mrtA*-Transkription ging nur kurzfristig über den Normalbereich hinaus und sank zum Versuchsabbruch hin wieder ab. Der Versuch musste abgebrochen werden bevor die Biogasprozesse in den mesophilen Fermentern zusammenbrachen. Auf Basis der Prozesskennwerte wurde allerdings auch für diese Fermenter eine baldige Prozessstörung prognostiziert.

Die mesophilen methanogenen Archaeen waren den kleineren MQs zufolge deutlich weniger gestresst als die thermophilen. Ein wahrscheinlicher Grund war der deutlich geringere Ammoniakgehalt (**Abbildung 11**) und eventuell auch eine geringere Konzentration toxischer Metabolite (nicht geprüft) in den mesophilen Gärgemischen. Ein Grund für die relativ schwache spezifische *mcrA/mrtA*-Transkriptionsaktivität könnte eine (partielle) Inhibierung der Hydrolyse und/oder der Acidogenese, insbesondere der Acetatbildung und, wie die massive Propionsäure-Anreicherung (**Abbildung 10**) nahelegt, Hemmung des Propionatabbaus z.B. durch SPOB gewesen sein. Acetat ist das zentrale Substrat der acetoklastischen Methanogenen und der SAOB, die die Aktivität der hydrogenotrophen Methanogenen steuern (**Abbildung 1**). Die subnormale Produktion des wichtigen Methanvorläufers Acetat kann also die schwache Transkriptionsaktivität der Methanogenen erklären. Eine besonders in den mesophilen Fermentern nicht optimal effiziente Primärfermentation wurde durch den dort stärkeren Anstieg des Trockensubstanzgehalts (s. **Abbildung 12**) auf ca. 11% der FM bestätigt.

Wie schon in vorangegangenen Versuchen beobachtet (ANDRADE *et al.* 2009a, ANDRADE *et al.* 2009b) war der FOS/TAC-Wert auch in den vorliegenden Untersuchungen des TP2 bei der Fütterung von stickstoffreichem Substrat nicht für die Vorhersage einer Prozessstörung geeignet. Dies zeigte sich besonders in den thermophilen Fermentern: Die Propionsäurekonzentration war im gestressten, thermophilen Betrieb (BM1T, BM2T 27.03.2015) bereits über $5 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ angestiegen, während der FOS/TAC-Wert mit 0,55 aber noch relativ niedrig lag, nur knapp über dem Schwellenwert von 0,5. Der MQ hatte hier im Fermenter BM1T bereits einen äußerst hohen Wert von über 50 erreicht, und auch im Fermenter BM2T wurde Stress mit einem Wert von knapp über 4 indiziert. Zwar bestätigte sich somit die Eignung des MQ als Frühwarnsystem vor einer Prozessstörung, allerdings zeigte der Parameter Propionsäuregehalt im vorliegenden Fall noch früher als der MQ ein Problem im Prozessablauf an: er erreichte bereits am 02.07.2014 in den Fermentern BM1T und BM2T den kritischen Bereich von $1.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und war damit bei der thermophilen Vergärung von Grassilage der Diagnoseparameter, der am frühesten die Prozessstörung indizierte.

Auch im mesophilen Betrieb mit Grassilage war der Parameter FOS/TAC kaum als Frühwarnsystem vor einer Prozessstörung brauchbar: Die FOS/TAC-Werte überschritten in den Fermentern BM3M und BM4M erst im August 2015 die kritische Schwelle von 0,5 bis 0,7, während die Propionat-Gehalte bereits am 23.04.2015 den Schwellenwert von $1.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ erreichten (**Abbildung 10**). Am 23.04.2015 peakte auch der MQ das erste Mal und erreichte annähernd den kritischen Bereich von 3 (**Abbildung 21**). In der Folge ging der MQ mit dem TS wegen Gärgemisch-Verdünnung (**Abbildung 12**) vorübergehend etwas zurück und erreichte erst zu Versuchsende die genannten Maxima. Als Frühwarnsystem vor einer Prozessstörung schien sich demnach für den mesophilen, ähnlich wie oben für den thermophilen Betrieb ausgeführt, der Parameter Propionsäuregehalt besonders zu eignen. Es gibt allerdings eine Reihe von Berichten zu einem stabilen und effizienten Betrieb von Biogasanlagen auch bei hohen Propionsäuregehalten (JUNG & PRÖTER 2008), was eine alleinige Betrachtung des Pa-

rameters Propionsäuregehalt als fragwürdig erscheinen lässt. Auch der MQ eignete sich den Ergebnissen zufolge zur Prozessdiagnose, allerdings nur bedingt zur Frühwarnung vor Prozessstörungen, weil die Maxima wahrscheinlich wegen gleichzeitiger (partieller) Hemmung der syntrophen Acetat- (und Propionat-) Oxidation und der acetoklastischen Methanogenese nur wenig ausgeprägt waren.

3.2.3 Quantifizierung von AASF-Bakterien und methanogenen Archaeen

Neben den methanogenen Archaeen wurden auch acidogene, acetogene und syntrophe Fettsäure-oxidierende (AASF) Bakterien analysiert. Dazu wurde spezifisch das Gen *fhs* für ein Schlüsselenzym des Wood-Ljungdahl-Reaktionsweges, die Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase (FTHFS, EC: 6.3.4.3), nachgewiesen (RAGSDALE & PIERCE 2008). Nach bisherigen Kenntnissen liegt es ähnlich wie *mcrA/mrtA* meist als Einzelkopie-Gen, gelegentlich aber auch in 2 Kopien in *fhs*-tragenden Mikroorganismen vor. Daher entspricht die ermittelte Zahl der Genkopien in der untersuchten Probe zumindest grob der Zahl der dort vorhandenen Mikroorganismen.

Für das codierende Gen *fhs* wurde ein Primersystem an der LfL entwickelt (FRÖSCHLE 2011, **Tabelle 2**) und nach Evaluierung für die Biogas-Marker Fermenter angewendet. Damit wird der der Methanogenese vorgelagerte (syntrophe) Prozessschritt (**Abbildung 1**) untersucht, den Bakterien durchführen können, die mit dem Wood-Ljungdahl Stoffwechselweg ausgestattet sind. Es ergaben sich aber, wie schon am Ende des Abschnitts 2.4.3 angesprochen, Probleme mit der Spezifität der RT-PCR und RT-qPCR-Assays, die im Folgenden näher spezifiziert werden:

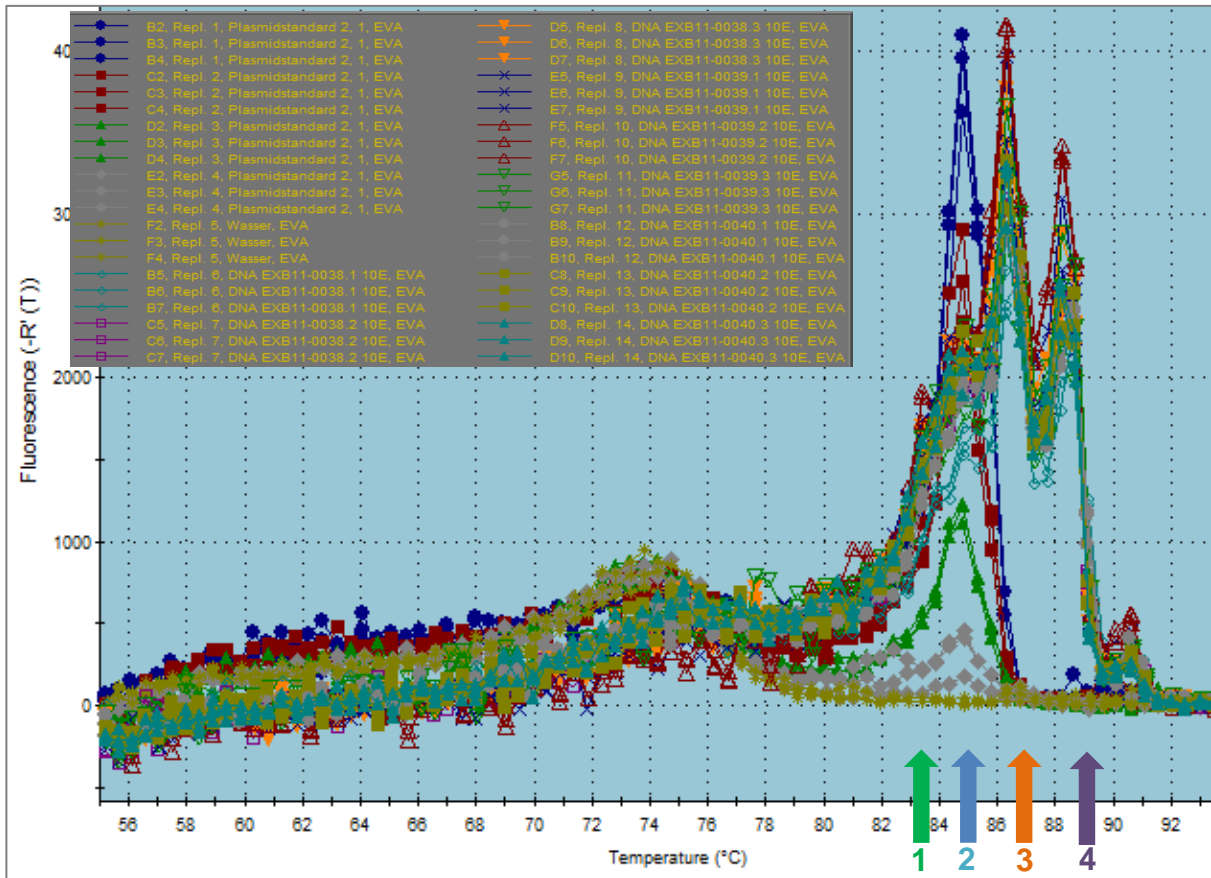


Abbildung 22: Schmelzkurvenanalyse von *fhs*-Plasmidstandard- und *fhs*-Gärgemisch-Extrakt-Amplikons (DNA-Ebene)

Abbildung 22 zeigt die Schmelzkurven von (ds-)DNA-Amplikons eines *fhs*-Plasmidstandards und eines *fhs*-Gärgemisch-Extrakts. Während sich für den *fhs*-Standard erwartungsgemäß nur ein Schmelzpunkt ergab (grüner Pfeil 1 in **Abbildung 22**, ca. 84,8°C), wurden für das *fhs*-PCR-Amplikon des Gärgemischextrakts drei weitere Schmelzpunkte erhalten (Pfeile 2, 3, 4 in **Abbildung 22**, ca. 86,2°C, ca. 88,2°C, ca. 90,2°C). Auch dies war zu erwarten, weil die Amplikons unterschiedliche Längen und verschiedene Basenzusammensetzungen (GC-Gehalte) aufweisen, woraus sich unterschiedliche Schmelzkurven und -punkte ergeben können.

Es war zu erwarten, dass die Schmelzkurvenanalyse der *fhs*-cDNA-Amplikons, die mit RT-qPCR aus dem RNA-Extrakt der gleichen (wie für **Abbildung 22** verwendeten) Gärgemisch-Probe hergestellt wurden, ein ähnliches Bild ergibt wie die Analyse der *fhs*-DNA-Amplikons. Dies war aber, wie **Abbildung 23** zeigt, nur teilweise der Fall. Der Peak 1 für den Plasmidstandard blieb an gleicher Stelle, was für die Reproduzierbarkeit des Assays spricht. Für die *fhs*-cDNA-Amplikons des RNA-Extrakts wurde aber kein Peak 1 und kein Peak 2 erhalten (**Abbildung 23**), und die Zuordnung des einzigen und zudem kaum ausgeprägten Peaks bei etwa 89°C (**Abbildung 23**) zu Peak 3, Peak 4 oder als neuer Peak 5 blieb unklar. Weiterhin ist festzustellen, dass die Fluoreszenz-ausbeute für die *fhs*-cDNA-Amplikons sehr gering war und kaum das Signal der Primer-Oligomere (bei etwa 74,2°C) erreichte (**Abbildung 23**).

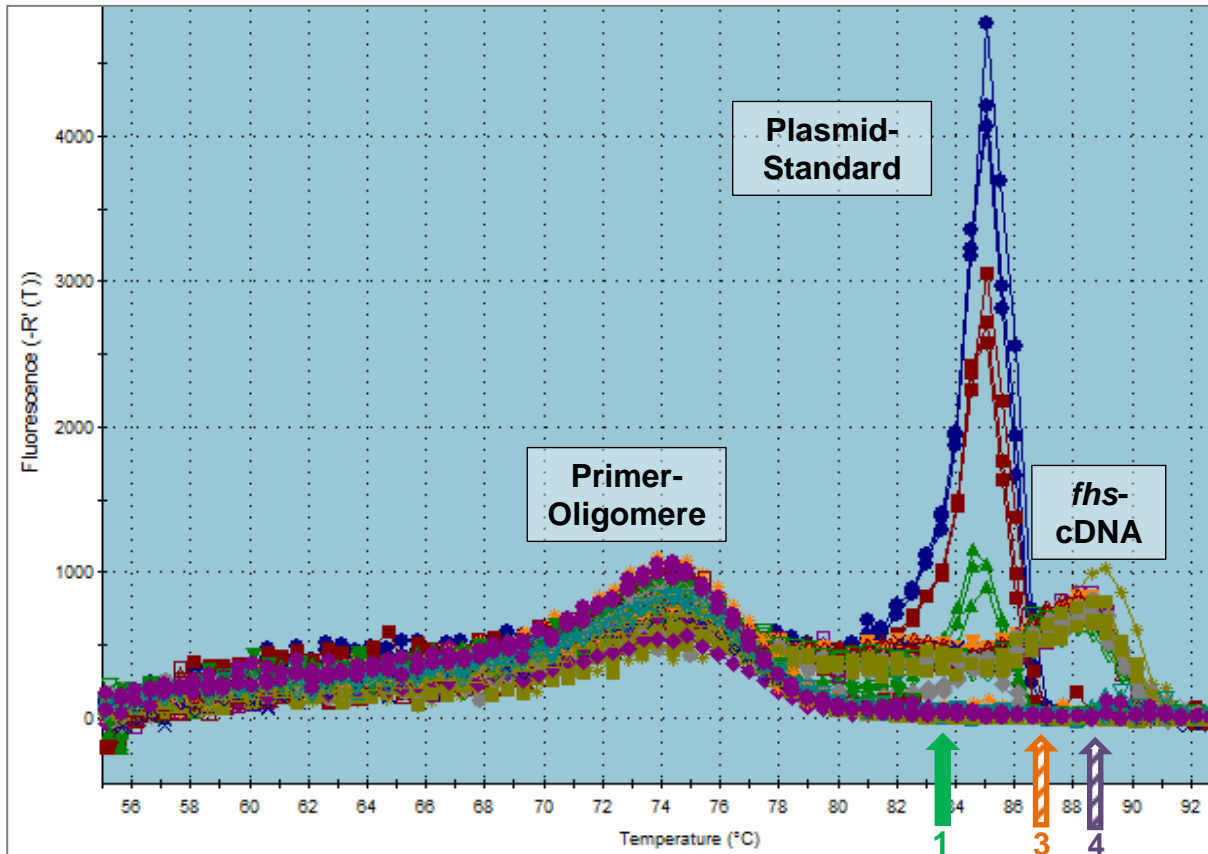


Abbildung 23: Schmelzkurvenanalyse eines *fhs*-Plasmidstandards und von *fhs*-cDNA-Amplikons, die mit RT-qPCR aus RNA-Gärgemisch-Extrakten erhalten wurden (RNA-Ebene)

Diese Ergebnisse können erklären, warum bislang zwar *fhs*-DNA verlässlich nachgewiesen und quantifiziert sowie kloniert und sequenziert werden konnte, dies jedoch für *fhs*-cDNA nicht in gleicher Weise der Fall war. Aus dem RNA-Extrakt konnte zwar mRNA mit dem *fhs*-Reverse-Primer in cDNA umgeschrieben und diese auch mit qPCR quantifiziert werden, die Identität der cDNA bleibt aktuell aber noch offen, da eine Klonierung (und damit eine Sequenzierung der Amplikons) bisher nicht erfolgreich war. Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist, dass die Reverse Transkription mit Primer *fthfs*-HP-b_r (**Tabelle 2**) nicht effizient und/oder nicht spezifisch genug war (vgl. Diskussion zu **Abbildung 23**), um sich gegenüber unspezifischen PCR-Produkten in der Klonierung durchzusetzen. Da in den Nukleinsäure-Extrakten zwar *fhs*-DNA nachgewiesen werden konnte, jedoch keine bzw. nicht ausreichend und nicht verlässlich *fhs*-cDNA, werden die Ergebnisse für *fhs* im vorliegenden Bericht nur auf DNA-Ebene dargestellt.

Allerdings kann aktuell noch nicht ausgeschlossen werden, dass das Transkriptionsniveau des nachzuweisenden Gens zu den Probenahmezeitpunkten zu gering war oder sogar generell zu gering ist. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf. Erste Tests mit *fhs*-Primern aus der neueren Literatur (MÜLLER *et al.* 2013), die sehr ähnliche Bindestellen wie die an der LfL designten Primer haben, lieferten zwar in der Summe höhere *fhs*-cDNA-Ausbeuten als die LfL-Primer, jedoch war ihre Spezifität den bioinformatischen Analysen zufolge geringer.

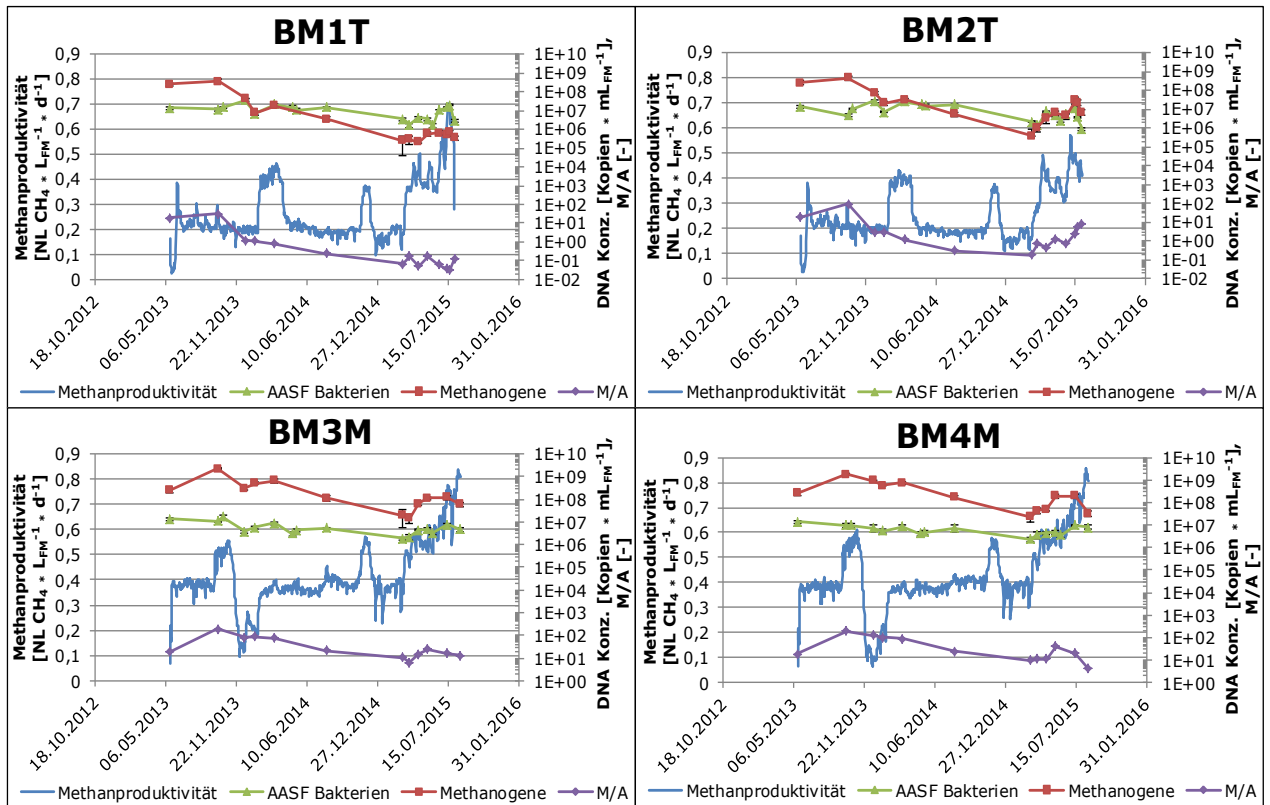


Abbildung 24: Methanproduktivität, *mcrA/mrtA*- (Methanogene) sowie *fhs*- (AASF Bakterien) Konzentration und Verhältnis von *mcrA/mrtA* zu *fhs* (M/A) Genkopien in den thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) Fermentern

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Methanogenen und der AASF-Bakterien (DNA-Ebene) sind in **Abbildung 24** dargestellt. Die Konzentration der AASF-Bakterien bewegte sich sowohl in den thermophilen als auch in den mesophilen Fermentern während des ganzen Experiments in einem engen Bereich von ca. $9 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^7$ *fhs*-Kopien * mL_{FM}⁻¹.

In den thermophilen Fermentern war die Konzentration der Methanogenen zu Versuchsbeginn höher als die Konzentration der AASF-Bakterien. Nach der ersten Steigerung der organischen Raumbelastung (OLR) verschob sich das Verhältnis durch Verminderung der Methanogenen zugunsten der AASF-Bakterien, die in der Folge meist um einen Faktor 1 – 10 stärker vertreten waren als die methanogenen Archaeen. Bis zur OLR-Steigerung am 12.03.2015 sank die *mcrA/mrtA*-DNA Konzentration in allen Fermentern kontinuierlich und stärker als die *fhs*-Konzentration. Mit der erhöhten OLR stieg dann auch die Konzentration der Methanogenen wieder an (**Abbildung 24**).

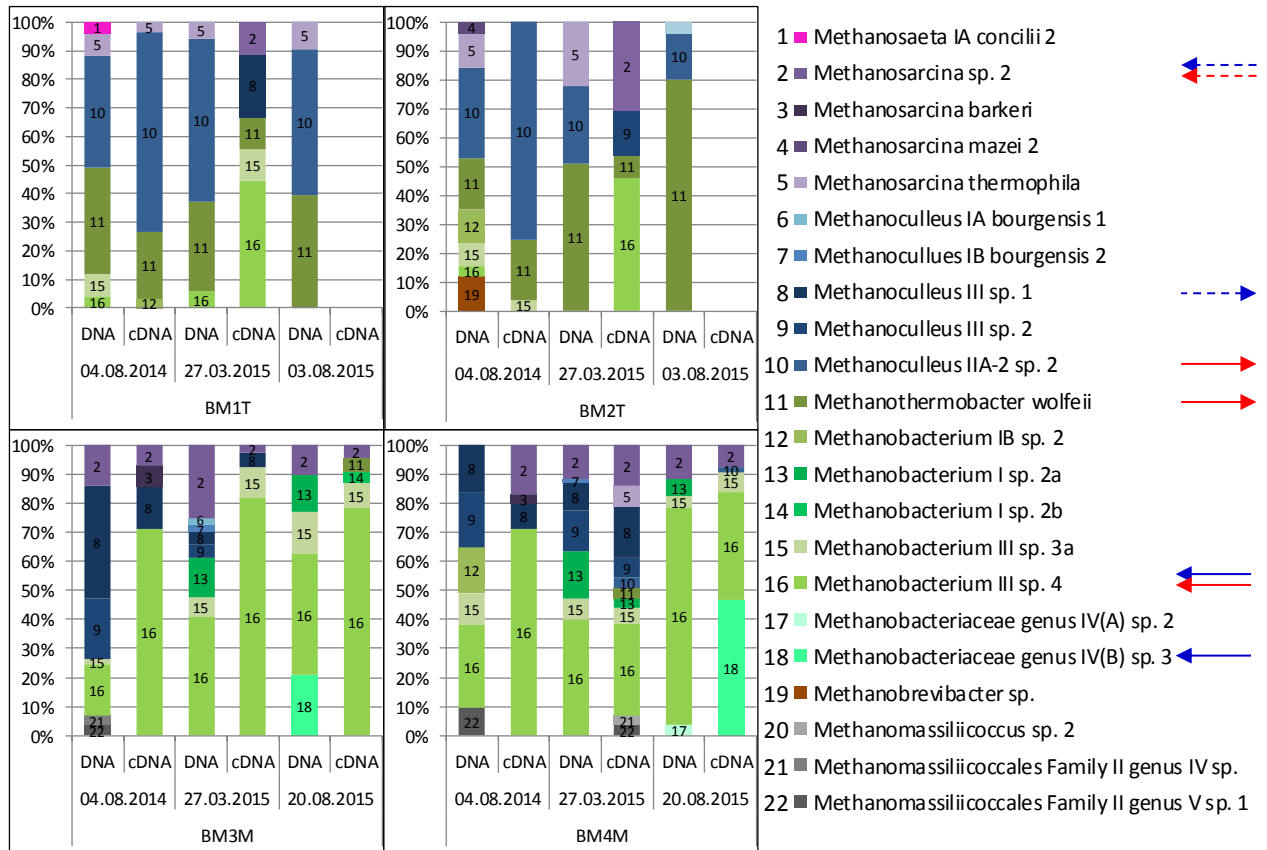
In den mesophilen Fermentern entwickelten sich die Populationen der AASF-Bakterien und der methanogenen Archaeen sehr ähnlich wie in den thermophil betriebenen Fermentern (**Abbildung 24**), nur waren in den mesophilen Gärgemischen durchwegs weniger (meist um einen Faktor 10 – 100) AASF-Bakterien als methanogene Archaeen. Das Verhältnis von Methanogenen zu AASF-Bakterien (M/A) war in den mesophilen Fermentern meist weiter als in den thermophilen Fermentern (**Abbildung 24**) und

schien sich im Versuchsverlauf (mit steigendem Stress) tendenziell zu verringern. Demzufolge scheinen die Methanogenen zumindest summarisch anfälliger gegenüber Stress (z.B. Ammoniak, toxische Metabolite) zu sein als die AASF-Bakterien. Der Flaschenhals des Prozesses schien also primär auf Seiten der Methanogenen und sekundär bei den syntrophen Acetat-oxidierenden Bakterien zu liegen.

3.2.4 Analyse der Gesellschaftszusammensetzung methanogener Archaeen

Ein weiteres wichtiges Ziel des TP2 waren die Identifizierung und Bestimmung von Bioindikatoren für den stabilen, gestressten und versauerten Betrieb, um eine Prozessdiagnose zu erstellen und fundierte Betriebsempfehlungen abgeben zu können. Primär wurden solche Bioindikatoren in der Gilde (physiologische Gruppe) der Methanogenen gesucht, da sich die methanogenen Archaeen als die empfindlichste Gilde im Biogasprozess herausstellte (LEBUHN *et al.* 2014a, vgl. Abschnitt 3.2.3). Die Zusammensetzung der meso- und thermophilen methanogenen Biozönosen wurde auf DNA-Ebene (Gesamtpopulation, inaktive und tote Organismen) sowie auch auf cDNA-Ebene (transkriptionell aktive Population) untersucht (**Abbildung 25**).

Im stabilen Betrieb (04.08.2014) wurden die thermophilen Fermenter mit einer OLR von $0,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ und die mesophilen mit $1,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ betrieben (**Abbildung 9**). Der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt (**Abbildung 11**) lag in den thermophilen Fermentern bei ca. $2,0 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und in den mesophilen bei ca. $0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$. In den thermophilen Fermentern zeigte sich vor allem auf cDNA-Ebene eine Dominanz von hydrogenotrophen *Methanoculleus* IIA-2 sp. 2. Daneben traten *Methanothermobacter wolfeii* und *Methanosarcina thermophila* auf, die beide für eine Präferenz thermophiler Bedingungen bekannt sind. In den mesophilen Fermentern waren auf DNA- und cDNA-Ebene verschiedene *Methanobacterium* spp. und *Methanoculleus* spp. dominant, auf Aktivitätsebene vor allem *Methanobacterium* III sp. 4. Auch cDNA von *Methanosarcina* spp. war in beiden Fermentern nachweisbar. Die entsprechenden Genospecies (**Abbildung 25**) werden als Bioindikatoren für den stabilen Betrieb mit Grassilage eingestuft. *Methanobrevibacter* sp. und *Methanosaeta* spp. waren nur auf DNA-Ebene und in geringer Konzentration nachzuweisen. Sie werden, wie schon von LEBUHN & MUNK (2015) beschrieben, als inaktives Relikt aus dem Anfahrbetrieb mit Rindergülle angesehen.



Blaue/rote Pfeile: mesophiler/thermophiler Betrieb; nach links/rechts weisend: Zunahme/Rückgang im Versuchsverlauf

Abbildung 25: Zusammensetzung der methanogenen Biozöosen (*mcrA/mrtA*-Genfragmente) auf DNA- und cDNA-Ebene in den thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) CSTR-Fermentern bei stabilem (04.08.2014), gestresstem (27.03.2015) und versauerstem (03.08.2015 bzw. 20.08.2015) Betrieb

Am 27.03.2015 liefen die thermophilen Fermenter (gestresster Zustand) bei einer OLR von $1,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ und die mesophilen (stabiler Zustand) bei OLR $1,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt lag in den thermophilen Gärgemischen bei ca. $1,8 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und in den mesophilen bei ca. $0,75 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ (**Abbildung 11**). Propionsäure-Konzentrationen von ca. $5 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und hohe MQ-Werte belegten metabolischen Stress der thermophilen Gärgemische (s. 3.2.2). In den mesophilen Fermentern waren die FFS-Konzentrationen dagegen noch unauffällig. In den thermophilen Gärgemischen waren auf DNA-Ebene weiterhin *Methanoculleus* II-A sp. 2 und *Methanothermobacter wolfeii* dominant, und *Methanosarcina thermophila* war noch nachweisbar. Auf cDNA-Ebene ergab sich aber eine andere Zusammensetzung: hier waren hauptsächlich *Methanobacterium* III sp. 4 (offenbar thermotolerant), *Methanoculleus* III sp. 1 bzw. sp. 2 und *Methanosarcina* sp. 2 transkriptionell aktiv. *Methanothermobacter wolfeii* und *Methanobacterium* III sp. 3a spielten auf cDNA-Ebene eine geringere Rolle und *Methanosarcina thermophila* war transkriptionell nicht mehr aktiv. Die beiden mesophilen Fermenter wiesen untereinander auf DNA-Ebene mit relativ hohem Anteil an *Methanobacterium* III sp. 4 eine sehr ähnliche Zusammensetzung auf, und BM4M war diesen auch auf cDNA-Ebene ähnlich. Die Diversität der aktiven methanogenen Gilde (cDNA-Ebene) von BM3M war dagegen

geringer. *Methanobacterium* III sp. 4 war hier dominant und in Fermenter BM3M relativ stark vertreten (**Abbildung 25**). Ein verstärktes Auftreten mit intensivierter (transkriptioneller) Aktivität dieser Genospecies scheint sowohl beim thermophilen als auch beim mesophilen Betrieb mit Grassilage ein Frühindikator einer anstehenden Prozessstörung zu sein.

Am 03.08.2015 wurden die thermophilen Fermenter bei einer OLR von $3,0 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ betrieben und waren versauert. Am 20.08.2015 betrug die OLR in den mesophilen Fermentern $4,5 \text{ kg}_{\text{OTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ und die Biozönosen zeigten Stresssymptome. Der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt lag in den thermophilen Fermentern bei ca. 0,9 (BM1T) bzw. 0,7 (BM2T) $\text{g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ und in den mesophilen bei ca. $0,55 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ (**Abbildung 11**). Die thermophilen Fermenter waren stark versauert, BM2T am stärksten (**Abbildung 10**). In den beiden thermophilen Fermentern war die Methanproduktivität bereits eingebrochen. Wahrscheinlich weil die Methanogenen hier nicht mehr (transkriptionell) aktiv waren (**Abbildung 21, Abbildung 25**), konnte aus diesen Fermentern nicht mehr ausreichend mRNA gewonnen werden. Auf DNA-Ebene waren wie beim vorherigen Probenahmezeitpunkt (noch) *Methanothermobacter wolfeii* und *Methanoculleus* II-A sp. 2 dominant. In den mesophilen Fermentern waren am 20.08.2015 im gestressten, angehend versauernden Zustand neben den dominanten *Methanobacterium* III sp. 4 noch *Methanosarcina* sp. 2 und *Methanobacterium* III sp. 3a vorhanden und aktiv. Vertreter von *Methanoculleus* spp. spielten keine Rolle mehr. Außerdem trat *Methanobacterium* IV(B) sp. 3 auf, eine Genospecies, die auch schon in anderen mesophil mit Grassilage betriebenen, versauerten Fermentern abundant gefunden wurde (LEBUHN & MUNK 2015). Diese *Methanobacterium*-Vertreter sind also bei verstärktem Auftreten Bioindikatoren für einen mesophilen, versauerten Betrieb mit Grassilage.

Sowohl in den thermophilen als auch in den mesophilen mit Grassilage betriebenen Fermentern waren praktisch ausschließlich hydrogenotrophe Methanogene vorhanden und aktiv. Diese Gilde der Archaeen kann offenbar die widrigen Bedingungen (hohe FFS- und Ammoniakkonzentration) besser tolerieren als acetoklastische Methanogene. Wegen ihrer kürzeren Generationszeiten haben sie einen Vorteil, können sich schneller vermehren und konnten sich wohl aus diesen Gründen im System länger halten (LEBUHN *et al.* 2014a). Die Dominanz von hydrogenotrophen Methanogenen wurde auch in kürzlich veröffentlichten Metatranskriptomstudien von landwirtschaftlichen Biogasanlagen gesehen (ZAKRZEWSKI *et al.* 2012, MAUS *et al.* 2016a). Die Daten bestätigen, dass der Großteil des produzierten Methans in landwirtschaftlichen Biogasanlagen der Aktivität hydrogenotropher methanogener Archaeen entstammt und nicht von acetoklastischen.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass zwischen der gesamten (DNA-Ebene) und der aktiven (cDNA-Ebene) Gildenzusammensetzung deutliche Unterschiede auftreten können. Dies wurde auch in anderen Studien gesehen (NIKOLAUSZ *et al.* 2013, LEBUHN *et al.* 2014a, MUNK & LEBUHN 2014, LEBUHN & MUNK 2015). Veränderungen der Gesellschaftsstruktur werden zuerst auf Transkriptionsebene erkannt, während die entsprechende Änderung auf DNA-Ebene bis zu Wochen später erfolgt. Da die aktiven Popula-

tionen für das aktuelle Prozessgeschehen relevant sind, müssen diese künftig verstärkt in den Fokus aktivitätsbasierter Untersuchungen gestellt werden.

3.2.5 Analyse der Gesellschaftszusammensetzung der AASF-Bakterien

Die Gesellschaftszusammensetzung der *fhs*-tragenden AASF-Bakterien wurde zu den gleichen Zeitpunkten wie die Gesellschaftszusammensetzung der methanogenen Archaeen analysiert. Da jedoch (bislang) cDNA der Gilde der AASF-Bakterien nicht verlässlich nachweisbar war (s. Abschnitt 3.2.3), konnten die Populationsanalysen bislang nur auf DNA-Ebene durchgeführt werden (**Abbildung 26**).

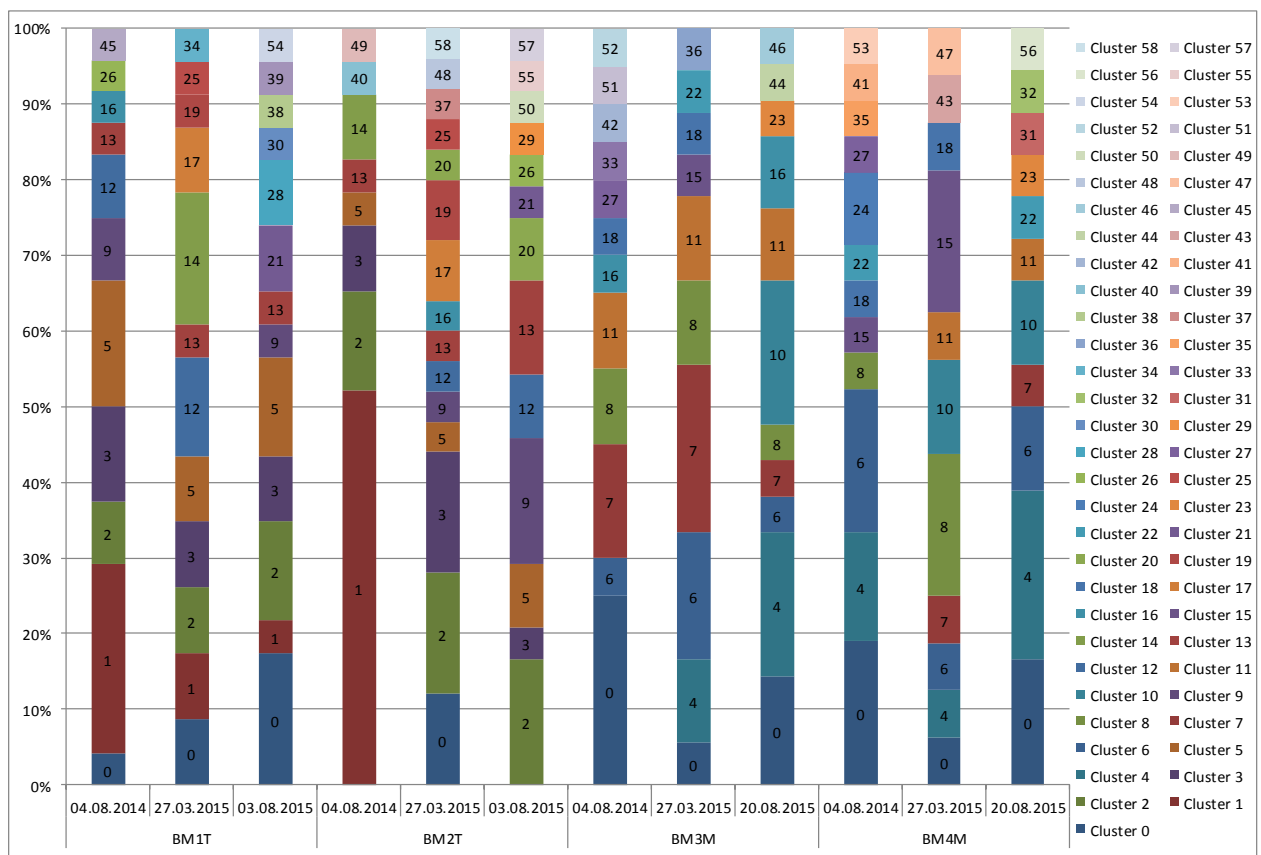


Abbildung 26: Populationsanalyse der *fhs*-tragenden Bakterien) auf DNA-Ebene in den thermophilen (BM1T, BM2T) und mesophilen (BM3M, BM4M) CSTR-Fermentern bei stabilem (alle Fermenter 04.08.2014; BM3M, BM4M 27.03.2016), gestresstem (angehend versauernd, BM1T, BM2T 27.03.2015; BM3M, BM4M 20.08.2016) und versauertem (BM1T, BM2T 03.08.2015) Betrieb

Die erhaltenen *fhs*-Sequenzen hatten zum größten Teil nur geringe Ähnlichkeit zu bereits in der NCBI Datenbank enthaltenen Einträgen. Die Sequenzen wurden auf Proteinebene in Cluster (operational taxonomic units, OTUs) mit einer Ähnlichkeit von 98% eingeteilt (cd-hit: http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi). Ein Vertreter eines Clusters wurde anschließend auf Proteinebene über NCBI BLASTp dem ähnlichsten, in der NCBI Datenbank annotierten Organismus zugeordnet (**Tabelle 9**).

Cluster 0 und 16 waren die einzigen, die sowohl in den mesophilen als auch in den thermophilen Fermentern vorkamen. Alle anderen Cluster lagen entweder in den mesophilen oder den thermophilen Fermentern vor. Bis auf die Cluster 0 und 16 scheinen die *fhs*-tragenden Bakterien in ihrem Wachstum also spezifisch an die unterschiedlichen Temperaturen adaptiert zu sein.

Für den Großteil der Cluster war keine eindeutige Tendenz einer Zu- oder Abnahme über die verschiedenen Prozesszuständen zu erkennen. Sie blieben bei den einzelnen Prozesstemperaturen über den gesamten Fermenterbetrieb eher konstant (z.B. Cluster 2, 4, 5, 6). Viele Cluster bestanden nur aus einer *fhs*-DNA-Sequenz, die auch nur in einem Fermenter zu einem Zeitpunkt vorkamen. Dies deutet auf eine hohe Diversität der AASF-Bakterien hin, die durch die geringe Anzahl der analysierten Sequenzen (16 - 21 Klone pro Fermenter und Zeitpunkt) nicht abgedeckt wurde.

Manche Cluster zeigten während des Fermenterbetriebs eine Zu- und manche eine Abnahme. Zum Beispiel war Cluster 1 im stabilen thermophilen Betrieb stark vertreten. Im gestressten und versauerten Zustand hatte dieser Cluster abgenommen (BM1T) bzw. war vollständig verschwunden (BM2T), wobei BM2T am Versuchsende auch eine stärkere Versauerung aufwies. Cluster 1 ist also ein potentieller Indikator für einen stabilen Prozess. Cluster 17, 19 und 25 wurden nur in den gestressten, mesophilen Fermentern nachgewiesen. Diese Cluster sind also potentielle Marker für hocheffizienten bis gestressten, mesophilen Betrieb mit Grassilage.

Auf Proteinebene lag die Sequenzidentität mit bekannten Organismen in der Datenbank zwischen 68% und 100% (**Tabelle 9**). Der Großteil der Cluster lag unter 95% Identität mit bekannten Organismen. Die *fhs*-tragenden Bakterien des Intermediärmetabolismus im Biogasprozess sind also noch weitgehend unbekannt. Nur wenige Cluster bzw. Sequenzen hatten eine hohe Sequenzidentität mit kultivierten Bakterien, viele Cluster waren nur mehr oder weniger ähnlich, und manche waren identisch mit unbekanntem, unkultivierten Bakterien aus anderen Studien. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit von weiteren Untersuchungen dieser Gilde.

Nachfolgend ist eine kurze Beschreibung von Organismen zu denen hohe Sequenzähnlichkeiten (>93%) auf Proteinebene gefunden wurden. Einige davon fallen in die Gilde der syntrophen acetatoxidierenden Bakterien (SAOB), wurden auch schon beim Betrieb mit anderen Substraten nachgewiesen (LEBUHN *et al.* 2014b) und scheinen daher typische SAOB-Vertreter in Biogasprozessen zu sein:

Syntrophaceticus schinkii ist als mesophiles SAO Bakterium beschrieben (WESTERHOLM *et al.* 2010).

Clostridium ultunense (mesophil) und *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (thermotolerant) können ebenfalls in der Anwesenheit eines hydrogenotrophen Methanogenen Acetat oxidieren (SCHNÜRER *et al.* 1996, WESTERHOLM *et al.* 2011a,b).

Thermacetogenium phaeum (thermophil) ist ebenfalls ein SAOB, das in Ko-Kultur mit einem hydrogenotrophen Methanogenen Acetat oxidiert. Es kann aber auch in Reinkultur

Acetat mit Hilfe von Sulfat oder Thiosulfat oxidieren (HATTORI *et al.* 2000).

Aminobacterium colombiense wurde als Aminosäureabbauendes Bakterium beschrieben, das Acetat, H₂, aber auch Propionat, Iso-Butyrat und Iso-Valerat produziert. In Ko-Kultur mit *Methanobacterium formicicum* konnte das Bakterium ein größeres Spektrum an Aminosäuren abbauen (BAENA *et al.* 1998).

Defluviitoga tunisiensis ist ein moderat thermophiles Bakterium. Es nutzt Cellulose auch andere Kohlehydrate, produziert vor allem Acetat, CO₂ und H₂ (HANIA *et al.* 2011) und ist damit ein idealer syntropher Partner für methanogene Archaeen (MAUS *et al.* 2016b).

Weissella spp., *Lactobacillus sakei* und *Leuconostoc mesenteroides* gehören zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien. Sie produzieren Säuren (hauptsächlich Milch-, Essigsäure) aus verschiedenen Zuckern (FUSCO *et al.* 2015, KLEIN *et al.* 1996).

Tabelle 9: Zuordnung der einzelnen *fhs*-OTUs (Cluster) zu den ähnlichsten Proteinsequenzen in NCBI (BLASTp)

	Organismus	Zugangsnummer (accession number)	Sequenzabdeckung	Sequenzidentität	Sequenzen pro Cluster
Cluster 0	<i>Clostridium ultunense</i>	WP_005586003	100%	88%	27
Cluster 1	<i>Dielma fastidiosa</i>	WP_022939329	100%	68%	21
Cluster 2	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	WP_013777661	100%	96%	18
Cluster 3	<i>Thermosediminibacter oceani</i>	WP_013275609	100%	82%	14
Cluster 4	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	CRZ34421	100%	87%	14
Cluster 5	uncultured bacterium	AFD97697	97%	91%	13
Cluster 6	<i>Herbinix</i> sp. SD1D	WP_058257848	100%	87%	12
Cluster 7	uncultured bacterium	AIE39639	97%	100%	10
Cluster 8	uncultured bacterium	AKA87394	97%	99%	9
Cluster 9	<i>Thermobrachium celere</i>	CDF59176	100%	84%	8
Cluster 10	uncultured bacterium	AIE39642	97%	99%	8
Cluster 11	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	CRZ34421	100%	84%	8
Cluster 12	<i>Bacillus smithii</i>	WP_003355066	100%	86%	8
Cluster 13	<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	WP_011955014	100%	75%	8
Cluster 14	<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	AAK20249	100%	85%	6
Cluster 15	uncultured bacterium	AKA87397	97%	99%	5
Cluster 16	<i>Weissella koreensis</i>	WP_013989725	100%	99%	5
Cluster 17	<i>Syntrophaceticus schinkii</i>	WP_044665140	100%	93%	4
Cluster 18	<i>Streptococcus didelphis</i>	WP_018365696	100%	79%	4
Cluster 19	<i>Caldicoprobacter oshimai</i>	WP_025747940	100%	90%	3
Cluster 20	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	WP_034770541	100%	84%	3
Cluster 21	<i>Weissella hellenica</i>	WP_042493297	100%	100%	3
Cluster 22	<i>Acholeplasma brassicae</i>	WP_030004079	99%	70%	3

	Organismus	Zugangsnummer (accession number)	Sequenzabdeckung	Sequenzidentität	Sequenzen pro Cluster
Cluster 23	uncultured bacterium	AIE39651	97%	99%	2
Cluster 24	<i>Clostridium beijerinckii</i>	WP_017209496	100%	82%	2
Cluster 25	<i>Clostridium ultunense</i>	WP_005586003	100%	88%	2
Cluster 26	<i>Clostridium ultunense</i>	WP_005586003	100%	91%	2
Cluster 27	Clostridiales bacterium mt11	WP_053965522	100%	87%	2
Cluster 28	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	WP_045088119	100%	100%	2
Cluster 29	<i>Thermacetogenium phaeum</i>	KUK36324	100%	96%	1
Cluster 30	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	WP_013777661	100%	92%	1
Cluster 31	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	WP_014795428	100%	85%	1
Cluster 32	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	WP_013777661	100%	84%	1
Cluster 33	uncultured bacterium	AFD97689	97%	87%	1
Cluster 34	<i>Thermosediminibacter oceani</i>	WP_013275609	100%	80%	1
Cluster 35	<i>Vagococcus lutrae</i>	WP_023607001	100%	83%	1
Cluster 36	<i>Sedimentibacter</i> sp. B4	WP_019227287	100%	89%	1
Cluster 37	uncultured bacterium	AFD97672	97%	100%	1
Cluster 38	<i>Clostridium scatologenes</i>	WP_046066042	100%	89%	1
Cluster 39	uncultured bacterium	AKA87395	97%	77%	1
Cluster 40	<i>Caldicoprobacter oshimai</i>	WP_025747940	100%	87%	1
Cluster 41	<i>Clostridium clariflavum</i>	WP_014253425	100%	75%	1
Cluster 42	<i>Defluviitalea phaphyphila</i>	WP_058485211	100%	77%	1
Cluster 43	<i>Clostridium termitidis</i>	WP_004624367	100%	84%	1
Cluster 44	<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	WP_014311722	100%	85%	1
Cluster 45	<i>Clostridium clariflavum</i>	WP_014253425	100%	87%	1
Cluster 46	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	CRZ34421	100%	89%	1
Cluster 47	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	CRZ34421	100%	85%	1
Cluster 48	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CEX21717	100%	85%	1
Cluster 49	<i>Lactobacillus sakei</i>	WP_016265107	100%	99%	1
Cluster 50	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WP_048592883	100%	99%	1
Cluster 51	<i>Weissella minor</i>	WP_057788267	100%	98%	1
Cluster 52	Synergistales bacterium 57_84	KUK61875	100%	88%	1
Cluster 53	<i>Aminobacterium colombiense</i>	WP_041459664	100%	100%	1
Cluster 54	<i>Clostridium ultunense</i>	WP_005586003	100%	95%	1
Cluster 55	<i>Clostridium ultunense</i>	WP_005586003	100%	88%	1
Cluster 56	Clostridiales bacterium mt11	WP_053965522	100%	87%	1
Cluster 57	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	WP_016837028	100%	86%	1
Cluster 58	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	WP_003775514	99%	75%	1

Grün markierte Cluster bezeichnen Bioindikatoren für stabilen Betrieb, pink markierte Cluster bezeichnen Bioindikatoren für (anstehende) Prozessstörungen

Mit dem *fhs*-Assay konnten einige (wenige) bekannte syntrophe Bakterien in mesophilen und thermophilen Biogasprozessen nachgewiesen werden. *fhs*-Cluster 1 stellt einen potentieller Bioindikator für den stabilen thermophilen Betrieb mit Grassilage dar, und mit den *fhs*-Clustern 17, 19 und 25 wurden potentielle Bioindikatoren für den gestressten mesophilen Betrieb mit Grassilage gefunden. Allerdings waren die meisten erhaltenen *fhs*-Sequenzen nur wenig zu entsprechenden Sequenzen kultivierter Bakterien ähnlich. Es besteht noch erheblicher Forschungsbedarf, um die Abläufe des Intermediat-Metabolismus besser zu verstehen. Es ist hervorzuheben, dass für das *fhs*-Gen noch keine bzw. kaum ausreichend cDNA für die PCR-Klonierung und die Bestimmung der aktiven Gesellschaftszusammensetzung gewonnen werden konnte. Hier muss noch Forschungs- bzw. Optimierungsarbeit geleistet werden, um spezifisch aktive Fraktionen der AASF-Bakterien analysieren zu können (s. Abschnitt 3.2.3). Es ist sehr wahrscheinlich, dass es auch für die AASF-Bakterien ähnlich wie für das *mcrA/mrtA*-Gen zu größeren Unterschieden zwischen der Zusammensetzung der Gesamtpopulation und der aktiven Fraktion kommen kann.

3.2.6 Untersuchung von Praxisanlagen

In den Zielsetzungen des Verbundvorhabens (s. Abschnitt 1.1) war ein Arbeitsinhalt vorgesehen, die entwickelten Assays zur Prozessdiagnose und zur Früherkennung von Prozessstörungen im Technikums- und Praxismaßstab anzuwenden.

Im Technikumsmaßstab wurden die Assays *mcrA/mrtA* und *fhs* zur Analyse von Methanogenen bzw. von AASF-Bakterien auf DNA-Ebene, *mcrA/mrtA* auch auf mRNA-Ebene, in den für das vorliegende Teilprojekt 2 betriebenen Fermentern BM1T, BM2T, BM3M und BM4M angewendet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.5 dargestellt.

In der Praxis werden landwirtschaftliche Biogasanlagen nicht nur wegen der verfahrenstechnischen und prozessbiologischen Schwierigkeiten (s. Abschnitt 1.2) nicht ausschließlich mit Grassilage betrieben. Typischerweise reicht das Substrat auch nicht bis in den Frühsommer, bis neue Silage bereitsteht. Daher werden landwirtschaftliche Biogasanlagen allenfalls mit einem hohen Anteil an Gras- oder Klee-grassilage in der Futtermischung betrieben, oder während der Winter/Frühjahrsmonate z.B. mit einem höheren Anteil an oder sogar ausschließlich mit Maissilage gefüttert. Die Prozesstemperatur wird meist im Bereich 40°C – 44°C gewählt. Für die Untersuchungen des TP2 wurde daher eine Anlage (Anlage 1) gewählt, die im genannten Temperaturbereich weitgehend permanent mit einem sehr hohen Anteil an Grassilage (dabei überwiegend Klee-gras) betrieben wurde. Für Anlage 1 lagen schon Daten aus vorangegangenen Untersuchungen vor. Sie wurden in den vorgestellten Datensatz integriert, um die zeitliche Entwicklung des Vergärungsprozesses besser dokumentieren und interpretieren zu können. Als Vergleich wurde eine Anlage (Anlage 2) beprobt, die mit einem hohen Anteil an Maissilage und einem variierenden (meist aber geringen) Anteil an Landschaftspflegegut betrieben wurde. Wichtige Prozesskennwerte zur Prozessdiagnose und Früh-

erkennung von Prozessstörungen in den Gärgemischen der beiden landwirtschaftlicher Praxis-Biogasanlagen sind in **Tabelle 10** zusammengestellt. Namen der Anlagen und der Betreiber sind aus Gründen des Datenschutzes nicht genannt.

Tabelle 10: Prozesskennwerte zur Prozessdiagnose und Früherkennung von Prozessstörungen in den Gärgemischen zweier landwirtschaftlicher Praxis-Biogasanlagen

Anlage 1 (überwiegend Grassilage in der Futtermischung)								
FOS/TAC	NH ₃ -N mg · kg _{FM} ⁻¹	TS %FM	Propionat mg · kg _{FM} ⁻¹	Isobutyrat mg · kg _{FM} ⁻¹	Methanoge- ne · mL _{FM} ⁻¹	<i>mcrA/mrtA</i> - cDNA/DNA	MQ	AASF-Bakt. · mL _{FM} ⁻¹
0,38	720	16,84	673	62	1,28 · 10 ⁸	1,25	2,49	1,07 · 10 ⁹
0,38	529	14,46	275	0	2,05 · 10 ⁸	1,01	2,10	1,22 · 10 ⁹
0,38	611	17,35	331	30	1,46 · 10 ⁸	3,40 · 10 ⁻¹	2,50	1,55 · 10 ⁹
0,46	658	16,45	3468	30	9,45 · 10 ⁷	4,00 · 10 ⁻¹	2,98	1,10 · 10 ⁹
0,48	503	14,37	3398	97	1,75 · 10 ⁸	2,02 · 10 ⁻¹	1,68	1,11 · 10 ⁹
0,33	606	15,31	251	0	7,62 · 10 ⁷	3,13 · 10 ⁻²	4,87	8,44 · 10 ⁸
Anlage 2 (überwiegend Maissilage in der Futtermischung)								
FOS/TAC	NH ₃ -N mg · kg _{FM} ⁻¹	TS %FM	Propionat mg · kg _{FM} ⁻¹	Isobutyrat mg · kg _{FM} ⁻¹	Methanoge- ne · mL _{FM} ⁻¹	<i>mcrA/mrtA</i> - cDNA/DNA	MQ	AASF-Bakt. · mL _{FM} ⁻¹
0,62	27	9,0	94	0	8,03 · 10 ⁷	8,13 · 10 ⁻²	7,49	3,98 · 10 ⁹
0,86	23	9,0	104	0	9,27 · 10 ⁷	5,04 · 10 ⁻²	6,52	6,35 · 10 ⁹
0,85	20	8,9	117	0	6,30 · 10 ⁷	3,20 · 10 ⁻²	10,40	3,14 · 10 ⁹

Gelbe Farben stellen grenzwertig kritische, rote Farben kritische und zusätzlich fett markierte Werte äußerst kritische Kennwerte dar

Beim Vergleich der Prozesskennwerte für die Gärgemische der beiden unterschiedlich betriebenen Praxis-Biogasanlagen (**Tabelle 10**) fallen verschiedene Charakteristika auf:

Symptomatisch für den Betrieb mit hohem Grassilageanteil in der Futtermischung (Anlage 1) waren die hohen TS- und NH₃-N-Gehalte sowie die (wegen Gegenmaßnahmen des Betreibers nur) teilweise sehr hohen Gehalte an Propionat (und Iso-Säuren) bei praktisch unauffälligen FOS-TAC-Werten (**Tabelle 10**). Dieses Bild bot sich in gleicher Weise und mit Kennwerten in ähnlicher Höhe für den Betrieb der Technikumsfermenter mit Grassilage (vgl. Abschnitte 3.1, 3.2.1 – 3.2.5). Auch an dieser Stelle muss also hervorgehoben werden, dass der FOS-TAC-Wert auch in der Praxis beim Betrieb mit Grassilage kein verlässlicher Parameter für die Prozessdiagnose ist. Wie schon für die Technikumsanlagen diskutiert schienen sich auch in Anlage 1 toxische Metabolite angereichert und den (leichten) Rückgang den AASF-Bakterien sowie die reduzierte transkriptionelle Aktivität bei zuletzt erhöhtem MQ der methanogenen Archaeen bewirkt zu haben. Die Prozessdiagnose auf Basis der o.g. Kennwerte und deren Entwicklung ist, dass Anlage 1 auf eine massive Prozessstörung zusteuert.

Für den Betrieb mit hohem Maissilageanteil in der Futtermischung (Anlage 2) waren dagegen die hohen MQ- und FOS-TAC-Werte bei relativ geringer *mcrA/mrtA*-Transkriptionsaktivität (und äußerst geringen TAC-Gehalten auffällig (**Tabelle 10**). Als Ursachen kommen verschiedene Faktoren wie z.B. Spurenelementmangel oder Fütterung verschimmelter Silagepartien in Frage (MUNK & LEBUHN 2014, LEBUHN *et al.* 2014a). Die Klärung dieser Fragestellung war nicht Aufgabe des TP2, es sollten aber an dieser Stelle die markant differenten Prozesskennwerte der beiden Betriebsweisen herauskristallisiert werden.

3.3 Verwertung

3.3.1 Standardisierung von Nukleinsäureextraktionen

Ein Fokus des Verbundvorhabens lag auf der Standardisierung der Nukleinsäure-Extraktionsprotokolle. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung desselben Kits bei Einsatz unterschiedlicher Probenvolumina z.B. infolge von PCR-Inhibition zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, und dass das Extraktionsziel (quantitative oder qualitative Analyse) über die Wahl der Methodik entscheidet. Die gesammelten Erfahrungen wurden zusammen- und die spezifischen Optimierungspotentiale dargestellt, auch um Ergebnisse verschiedener Studien vergleichbar zu machen. Wie gezeigt muss dabei die Extraktionseffizienz bestimmt werden, und es darf keine PCR-Inhibierung vorliegen, um eine verlässliche absolute Quantifizierung zu ermöglichen. Es wurde deutlich, dass hinsichtlich der RNA-Extraktion insbesondere bei Verwendung für die (Meta)Transkriptom-Analytik noch ein erhebliches Optimierungspotential besteht. Zur Stabilisierung vor allem der sehr labilen Messenger-RNA nach der Probenahme wurden praktikable Protokolle erarbeitet und vorgestellt.

Die Optimierung und Standardisierung von Nukleinsäureextraktionen betrifft eher die Grundlagenforschung im Bereich der Analytik. Dementsprechend wurden (und werden weiterhin) die Ergebnisse primär in schriftlichen Veröffentlichungen (s. Abschnitt 3.5.1) und Vorträgen (s. Abschnitt 3.5.2) für das wissenschaftliche Publikum kommuniziert.

3.3.2 Mono-Vergärung von Grassilage

Die einstufige Mono-Vergärung von Grassilage konnte sowohl im mesophilen, als auch im thermophilen Betrieb erfolgreich durchgeführt werden. Trotz der hohen Faser- und Ammoniakgehalte konnte ein stabiler Betrieb etabliert werden. Bei (besonders thermophil) relativ geringen Raumbelastungen wurden hohe spezifische Methanerträge zwischen 350 und 400 NL CH₄ * kg_{oTS}⁻¹ erreicht. Im Durchflussbetrieb nahm aber der Trockensubstanzgehalt kontinuierlich zu, und es reicherten sich Störstoffe an, was auf Dauer in eine Prozessstörung führt. Deshalb sollte die Grassilage periodisch oder anteilmäßig z.B. durch Maissilage und/oder Rindergülle substituiert werden, und über ca. 12% TS im Gärgemisch ist eine Verdünnung mit z.B. Wasser oder Prozessflüssigkeit zu empfehlen. Grassilage kann mit den genannten Einschränkungen als gute Alternative

zur Maissilage für die anaerobe Vergärung und die Produktion von erneuerbaren Energien empfohlen werden.

Diese Ergebnisse sind in wissenschaftlichen schriftlichen Veröffentlichungen und Vorträgen entsprechend kommuniziert worden und werden auch weiterhin kommuniziert. Da diese Ergebnisse auch für die Praxis von besonderer Bedeutung sind, werden sie auch über die insbesondere für die Praxis und die Öffentlichkeit gestalteten Veröffentlichungsplattformen wie das Biogas Forum Bayern (http://www.biogas-forum-bayern.de/De/themen-aktuelles_Home) und die AQU-Projektseite der LfL-Homepage (http://www.lfl.bayern.de/zentrale_analytik/048892/index.php) kommuniziert.

3.3.3 Frühwarnsysteme zur Prozessdiagnose

Der Metabolische Quotient (MQ), ein molekularbiologischer Parameter zur Früherkennung von Prozessstörungen, wurde im vorliegenden TP2 auch für die meso- und thermophilen Prozesse mit Grassilage erfolgreich angewendet. Prinzipiell bestätigte sich die Substrat- und Temperaturunabhängigkeit des Parameters. Auch das *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA Verhältnis spiegelte die aktuelle Aktivität der methanogenen Archaeen wider. Am ehesten reagierte aber der Parameter Propionsäure. Vor allem im Zusammenhang können die zeitlichen Verläufe dieser Parameter zuverlässige Prognosen zu Prozessstörungen ermöglichen und der Praxis helfen, Prozessstörungen und damit einhergehende ökonomische Verluste zu vermeiden.

Die Ergebnisse betreffen sowohl die Grundlagenforschung als auch die Praxis. Sie wurden deshalb und werden weiterhin über entsprechende Plattformen kommuniziert und veröffentlicht, einerseits in Form wissenschaftlicher schriftlicher und mündlicher Veröffentlichungen (s. Kapitel 3.5) und andererseits für eine breite Öffentlichkeit über das Internet (http://www.biogas-forum-bayern.de/De/themen-aktuelles_Home; http://www.lfl.bayern.de/zentrale_analytik/048892/index.php).

3.3.4 Bioindikatoren zur Prozessbewertung

Methanogene Archaeen sind der primäre Flaschenhals der anaeroben Vergärung. Weil sie das energiereiche Methan produzieren und sehr empfindlich auf sich ändernde Prozessbedingungen reagieren, eignen sie sich als Bioindikatoren für verschiedene Prozesszustände. Für die meso- und die thermophile Mono-Vergärung von Grassilage wurden Bioindikatoren für stabile, gestresste und versauerte Prozesszustände gefunden. Ihre Zunahme kann ebenfalls Prozessstörungen frühzeitig ankündigen und somit gemeinsam mit den Frühwarnparametern Propionsäure, MQ und cDNA/DNA-Verhältnis ein Benchmarksystem zur Prozessdiagnose darstellen. Weiterhin konnte am Beispiel der methanogenen Archaeen gezeigt werden, dass die Gesellschaftszusammensetzung der Biozösen auf DNA- (Gesamtpopulation) und cDNA-Ebene (transkriptionelle aktive Population) vor allem im gestressten Betrieb sehr verschieden sein kann. Deshalb sollte

in weiteren Projekten der Fokus vermehrt auf der Analyse des Transkriptoms liegen, um die aktiven Fraktionen der Mikroorganismen zu erfassen.

Die Identifizierung von Bioindikatoren zur Prozessbewertung ist im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelt. Dementsprechend wurden (und werden weiterhin) die Ergebnisse primär in schriftlichen Veröffentlichungen (s. Abschnitt 3.5.1) und Vorträgen (s. Abschnitt 3.5.2) für das wissenschaftliche Publikum kommuniziert.

3.4 Erkenntnisse von Dritten

Da Erkenntnisse von Dritten im unmittelbaren Sachzusammenhang mit den durchgeführten Untersuchungen stehen, wurden diese an jeweils passender Stelle in den Teil Ergebnisse und Diskussion integriert. Die Erkenntnisse von Dritten zum jeweils angesprochenen Sachverhalt sind im Text adäquat kenntlich gemacht und der gängigen Praxis entsprechend im Kapitel Literatur zitiert.

Auf Erkenntnisse von Dritten wird aus diesem Grund hier nicht näher eingegangen.

3.5 Veröffentlichungen

3.5.1 Schriftliche Veröffentlichungen

- LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016):** DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering* 3/7, pp. 24; doi:10.3390/bioengineering3010007
- LEBUHN M, HANREICH A, KLOCKE M, SCHLÜTER A, BAUER C, MARÍN PÉREZ C (2014):** Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe* 29, 10-21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.006>
- LEBUHN M, MARÍN PÉREZ C (2013):** Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. In: Proc. 8th International Symposium on Anaerobic Microbiology (ISAM8), Innsbruck, Austria, June 12-15, eds.: H. INSAM, S.M. PODMIRSEG, A.O. WAGNER, p. 30, ISBN 9778-3.902936-03-5
- LEBUHN M, MUNK B (2015):** Presence versus activity of microbes – what rules the biogas process? In: Proc. 9th International Symposium on Anaerobic Microbiology (ISAM9), June 25-27, Portoroz, Slovenia, p. 40, ISBN 978-961-6204-71-2
- LEBUHN M, WEIß S, MUNK B, GUEBITZ GM (2015):** Microbiology and Molecular Biology Tools for Biogas Process Analysis, Diagnosis and Control. In: *Biogas Science and Technology* (G.M. GUEBITZ, ed.), Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 151, 1-40. doi: 10.1007/978-3-319-21993-6_1
- MUNK B, ANDRADE D, LEBUHN M (2014):** Population shifts and activity changes of methanogenic Archaea in mesophilic grass silage fed fermenter. In: Proc. 2nd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM), June 10-12 (2014), Uppsala, Sweden, pp. 2
- MUNK B, GÜBITZ GM, LEBUHN M (2014):** Methanogenic *Archaea* in practice biogas plants operated with grass silage – occurrence, activity and bioindicators. In: Conference proceedings of the International Conference on Anaerobic Digestion, Biogas Science 2014, 26th -30th October 2014, Vienna, Austria, pp. 1

MUNK B, GUEBITZ GM, LEBUHN M (2017): Influence of nitrogen-rich substrate on biogas production and the methanogenic community under mesophilic and thermophilic conditions. Anaerobe, accepted for publication

MUNK B, LEBUHN M (2015): Occurrence and activity of methanogenic Archaea in agricultural biogas plants. In: Conference proceedings of the 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), pp. 1, 7th – 11th June 2015, Maastricht, Netherlands

MUNK B, LEBUHN M (2016): Influence of nitrogen-rich substrate on biogas production and the methanogenic community under mesophilic and thermophilic conditions. In: Proceedings of the conference Biogas Science 2016, 21.-24.08.2016, Szeged, Hungary, p. 15

3.5.2 Mündliche Wissensvermittlung

Mit den Erkenntnissen aus diesem Projekt wurde eine Vielzahl von Vorträgen, Seminaren und Fachgesprächen gestaltet. Weil diese zur Gänze nicht aufgeführt werden können, sind hier die wichtigsten Vorträge genannt.

Referent	Thema/Titel	Veranstalter/Datum	Ort
M. LEBUHN	Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates	8th International Symposium on Anaerobic Microbiology (ISAM8), June 12-15, 2013; 14.06.2013	Innsbruck
M. LEBUHN	Presence versus activity of microbes – what rules the biogas process?	9 th International Symposium on Anaerobic Microbiology (ISAM9), June 26, 2015	Portoroz, Slovenia
M. LEBUHN	Molecular process diagnosis and early warning systems of process failure in biogas systems	Universität Konstanz, Fachbereich Biologie, 06.07.2015	Konstanz
B. MUNK	Biogas-Marker Teilprojekt 2: Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen	Biogas Crops Network Verbundtreffen, 25.9.2013	Frankfurt
B. MUNK	Population shifts and activity changes of methanogenic Archaea in mesophilic grass silage fed fermenters	2nd International Conference on Biogas Microbiology ICBM, Uppsala (Sweden), 10. - 12.06.2014	Uppsala, Schweden
B. MUNK	Methanogenic Archaea in practice biogas plants operated with grass silage – occurrence, activity and bioindicators	International Conference on Anaerobic Digestion - Biogas Science, Vienna, 27.-29.10.2014	Wien (Austria)

Referent	Thema/Titel	Veranstalter/Datum	Ort
B. MUNK	Biogas-Marker - Bioindikatoren der Biogasfermentation, Teilprojekt 2: Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen	BMBF-PTJ BCN-Netzwerktreffen, 14.09.2015	Berlin (Beuth HS)
B. MUNK	Influence of nitrogen-rich substrate on biogas production and the methanogenic community under mesophilic and thermophilic conditions	Biogas Science, 21.-24.08.2016	Szeged, Ungarn

Literaturverzeichnis

- ANDERSSON AF, LUNDRÉN M, ERIKSSON S, ROSENLUND M, BERNANDER R, NILSSON P (2006):** Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome Biology* 7:R99
- ANDRADE D, HEUWINKEL H, GRONAUER A (2009a):** Optimierung der Prozesskette zur Methanergewinnung aus Grünlandaufwuchs mittels Biogastechnologie als Grundlage der Biogasgewinnung aus pflanzlicher Biomasse. Schlussbericht zum Teilprojekt im Biogas Crops-Network (BCN) "Grundlagen der Biogasgewinnung aus pflanzlicher Biomasse". <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01fb10/623440474.pdf>; pp. 45
- ANDRADE D, MARIN-PEREZ C, HEUWINKEL H, LEBUHN M, GRONAUER A (2009b):** Biogasgewinnung aus Grassilage: Untersuchungen zur Prozessstabilität. Kongressband Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/3, ISSN 1611-4159, 529-538
- BAENA S, FARDEAU M-L, LABAT M, OLLIVIER B, THOMAS P, GARCIA J-L, PATEL BKC (1998):** *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an Amino Acid-degrading Anaerobe Isolated from Anaerobic Sludge. *Anaerobe* 4:241-250
- BAUER C, KORTHALS M, GRONAUER A, LEBUHN M (2008):** Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology* 58:1433-1439
- BERGMANN I (2011):** Characterization of methanogenic Archaea communities in biogas reactors by quantitative PCR. Dissertation. Technische Universität Berlin
- BERGMANN I, MUNDT K, SONTAG M, BAUMSTARK I, NETTMANN E, KLOCKE M (2010A):** Influence of DNA isolation on Q-PCR based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* 33:78-84
- BERGMANN I, NETTMANN E, MUNDT K, KLOCKE M (2010B):** Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 56:440-444
- BLUME F, BERGMANN I, NETTMANN E, SCHELLE H, REHDE G, MUNDT K, KLOCKE M (2010):** Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology* 109:441-450
- BORREL G, O'TOOLE PW, HARRIS HM, PEYRET P, BRUGÈRE JF, GRIBALDO S (2013):** Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* 5:1769-1780

- BUNDESMINISTERIUM FÜR WIRTSCHAFT UND TECHNOLOGIE (2010):** Energietechnologien 2050 – Schwerpunkte für Forschung und Entwicklung. URL: <http://www.bmwi.de/Dateien/BMWi/PDF/politikbericht-energietechnologien2050,property=pdf,bereich=bmwi,sprache=de,rwb=true.pdf> [zuletzt aufgerufen am 06.01.11]
- EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, QUINCE C, KNIGHT R (2011):** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(16):2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- EFFENBERGER M, ANDRADE A, BACHMAIER H, LEBUHN M, MARÍN-PERÉZ C, SPATZ A (2011):** Verfahrenstechnik der Grasvergärung: Technik, Gärprozess, Klimabilanz. Kongressband der 20. Jahrestagung des Fachverbands Biogas e.V., 11.1. – 13.1. 2011, Nürnberg, 29-37
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE (2010):** Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. URL: http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/literatur/pdf_208-leitfaden_biogas_2010.pdf [zuletzt aufgerufen am 13.01.11]
- FREEMAN WM, WALKER SJ, VRANA KE (1999):** Quantitative RT-PCR: potential and pitfalls. *Bio-Techniques* 26:112-125
- FREITAG TE, PROSSER JI (2009):** Correlation of Methane Production and Functional Gene Transcriptional Activity in a Peat Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6679-6687
- FRÖHLING A, KLOCKE S, HAUSDORF L, KLOCKE M, SCHLÜTER O (2012):** A method for viability testing of *Pectobacterium carotovorum* in postharvest processing by means of flow cytometry. *Food Bioprocess. Technol.* 5:2871-2879
- FRÖSCHLE B (2011):** Eignung des Formyltetrahydrofolat-Synthetase-Gens (*fhs*) zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Populationen syntropher Bakterien in NawaRo-Biogasfermentern mit PCR-gestützten Methoden. Diplomarbeit, durchgeführt an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und vertreten an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- FUSCO V, QUERO GM, CHO G-S, KABISCH J, MESKE D, NEVE H, BOCKELMANN W, FRANZ CMAP (2015):** The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Microbiol.* 6:155
- GARCÉS G, EFFENBERGER M, NAJDROWSKI M, GRONAUER A, WILDERER PA, LEBUHN M (2005):** Quantitative real-time PCR for detecting *Cryptosporidium parvum* in cattle manure and anaerobic digester samples - Methodological advances in DNA extraction. Proc. 8th Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, Oct. 2-5, Punta del Este, Uruguay, ISBN 9974-7699-3-0, pp. 68-73
- GARCÉS G, EFFENBERGER M, NAJDROWSKI M, WACKWITZ C, GRONAUER A, WILDERER PA, LEBUHN M (2006):** Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. *Water Science and Technology* 53:195-202
- GARCÉS-SANCHEZ G, WILDERER PA, MUNCH JC, HORN H, LEBUHN M (2009):** Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Research* 43:2669-2678
- HANIA WB, GODBANE R, POSTEC A, HAMDY M, OLLIVIER B, FARDEAU ML (2011):** Isolation and characterization of *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov, sp. nov., a novel thermophilic bacterium pertaining to the order *Thermotogales*, isolated from a mesothermic anaerobic reactor treating cheese whey in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1377e82
- HANSEN KH, ANGELIDAKI I, AHRING BK (1998):** Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 32:5-12

- HATTORI S, KAMAGATA Y, HANADA S, SHOUN H (2000):** *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1601-1609
- HATTORI S (2008):** Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environment* 23:118-127
- HECHT C, GRIEHL C (2009):** Investigation of the accumulation of aromatic compounds during biogas production from kitchen waste. *Bioresour. Technol.* 100:654-658.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM (1996):** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994
- HENDERSON G, NAYLOR GE, LEAHY SC, JANSSEN PH (2010):** Presence of Novel, Potentially Homoacetogenic Bacteria in the Rumen as Determined by Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase Sequences from Ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2058-2066
- HERNANDEZ JE, EDYVEAN RGJ (2008):** Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *J. Hazard. Mater.* 160:20-28.
- HUBER T, FAULKNER G, HUGENHOLTZ P (2004):** Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20:2317-2319
- JUNG U, PRÖTER J (2008):** Stabiler Biogasprozess bei hohem Propionsäuregehalt. *Biogasjournal* 2/2008: 26-29
- KLEIN G, DICKS L, PACK A, HACK B, ZIMMERMANN K, DELLAGLIO F, REUTER (1996):** Emended Descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): Numerical Classification Revealed by Protein Fingerprinting and Identification Based on Biochemical Patterns and DNA-DNA Hybridizations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46:367-376
- KLOCKE M, NETTMANN E, BERGMANN I, MUNDT K, SOUIDI K, MUMME J, LINKE B (2008):** Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31:190-205
- KOCH K, WICHERN M, LUEBKEN M, HORN H (2009):** Mono fermentation of grass silage by means of loop reactors. *Bioresource Technology* 100:5934-5940
- LEBUHN M, EFFENBERGER, GRONAUER A, WILDERER PA, WÜRTZ S (2003):** Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Science and Technology* 48:97-103
- LEBUHN M, EFFENBERGER M, GARCÉS G, GRONAUER A, WILDERER PA (2004):** Evaluating Real-Time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Science and Technology* 50:263-270
- LEBUHN M, ANDRADE A, BAUER C, GRONAUER A (2010):** Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen, Abschlussbericht des Teilvorhabens 1 „Optimierung der Verfahrenstechnik und Prozessautomatisierung, Prozessmonitoring und Datenmanagement“ und des Teilvorhabens 6 „Identifikation und Quantifizierung funktionell relevanter Mikroorganismen bei der Vergärung LCB-reicher nachwachsender Rohstoffe“. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, pp. 132; http://www.lfl.bayern.de/itt/umwelttechnik/biogastechnik/40725/ibmn_abschlussbericht.pdf
- LEBUHN M, MUNK B, EFFENBERGER M (2014A):** Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy Sustain. Soc.* 4:21
- LEBUHN M, HANREICH A, KLOCKE M, SCHLÜTER A, BAUER C, PÉREZ CM (2014B):** Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe* 29:10-21

- LEBUHN M, WEIß S, MUNK B, GUEBITZ GM (2015):** Microbiology and Molecular Biology Tools for Biogas Process Analysis, Diagnosis and Control, in: G.M. GUEBITZ, A. BAUER, G. BOCHMANN, A. GRONAUER, S. WEISS (Eds.), Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 151:1-40.
- LEBUHN M, MUNK B (2015):** Mikrobiologische Prozessoptimierung in der Biogastechnologie – Diagnostik der mikrobiellen Populationen und Identifizierung von Schlüsselorganismen in Biogas-Fermentern. Abschlussbericht an das StMELF und StMUV, pp. 185
- LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016):** DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. Bioeng. 3:7
- MAUS I, KOECK DE, CIBIS KG, HAHNKE S, KIM YS, LANGER T, ... KLOCKE M (2016a):** Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. Biotechnol. Biofuels 9:171
- MAUS I, CIBIS KG, BREMGES A, STOLZE Y, WIBBERG D, TOMAZETTO G, ... SCHLÜTER A (2016b):** Genomic characterization of *Deffluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. Journal of Biotechnology 232:50-60
- MCKILLIP, JL; JAYKUS, LA; DRAKE, M (1998):** rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 64:4264-4268
- MUNK B, BAUER C, GRONAUER A, LEBUHN M (2010):** Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. Eng. Life Sci. 10:496-508
- MUNK B, BAUER C, GRONAUER A, LEBUHN L (2012):** A metabolic quotient for methanogenic *Archaea*. Water Sci. Technol. 66:2311-2317
- MUNK B, LEBUHN M (2014):** Process diagnosis using methanogenic *Archaea* in maize-fed, trace element depleted fermenters. Anaerobe 29:22-28
- NETTMANN E, BERGMANN I, PRAMSCHÜFER S, MUNDT K, PLOGSTIES V, HERRMANN C, KLOCKE M (2010):** Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. Applied and Environmental Microbiology 76:2540-2548
- NEUMANN M (2010):** Untersuchungen zum Vorkommen von *Arcobacter* spp. in gemüseverarbeitenden Betrieben und Entwicklung eines quantitativen realtime PCR Assays zum Nachweis und zur Differenzierung von *Arcobacter* spp. Bachelor-Arbeit. Beuth-Hochschule für Technik Berlin
- NIKOLAUSZ M, WALTER RFH, STRÄUBER H, LIEBETRAU J, SCHMIDT T, KLEINSTEUBER S, BRATFISCH F, GÜNTHER U, RICHNOW HH (2013):** Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:2251-2262
- NORDMANN W (1977):** Die Überwachung der Schlammfäulung. KA-Informationen für das Betriebspersonal. Beilage zur Korrespondenz Abwasser, 3/77
- NOBU MK, NARIHIRO T, KURODA K, MEI R, LIU WT (2016):** Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. The ISME Journal 10:10
- NOCKER A, CHEUNG CY, CAMPER AK (2006):** Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. Journal of Microbiological Methods 67:310-320
- OCTOVIANI A (2010):** Quantitative detection of phytopathogenic microorganisms in post-harvest handling. Diplomarbeit. Technische Universität Berlin

- POPP D, SCHRADER S, KLEINSTEUBER S, HARMS H, STRÄUBER H (2015):** Biogas production from coumarin-rich plants - inhibition by coumarin and recovery by adaptation of the bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91: UNSP fiv103
- RADEMACHER A, ZAKRZEWSKI M, SCHLÜTER A, SCHÖNBERG M, SZCZEPANOWSKI R, GOESMANN A, PÜHLER A, KLOCKE M (2012):** Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79:785-799
- RAGSDALE SW, PIERCE E (2008):** Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 1784:1873-1898
- RAJAGOPAL R, MASSÉ DI, SINGH G (2011):** A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143:632-641.
- RHEINHARDT S (2011):** Development of a multiplex PCR assay for the detection of *Arcobacter* spp. in food processing. Diplomarbeit. Universität Potsdam
- RIEGER C, WEILAND P (2006):** Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas J.* 4:18-20
- SCHIEDER D, GRONAUER A, LEBUHN M, BAYER K, BECK J, HIEPP G, BINDER S (2010):** Prozessmodell Biogas, pp. 38
http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf
- SCHINK B (1997):** Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:262-280
- SCHNÜRER A, SCHINK B, SVENSSON BH (1996):** *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1145-52
- SCHNÜRER A (2016):** Biogas Production: Microbiology and Technology, in: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–40.
http://link.springer.com/10.1007/10_2016_5 (abgerufen am 14. September 2016)
- SOBIELLA K (2008):** Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Arcobacter* im Nachernteprozess der Spinatproduktion. Diplomarbeit. Technische Universität Berlin
- STALEY JT, KONOPKA A (1985):** Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:321-346
- STANTSCHIEFF R, KUEVER J, RABENSTEIN A, SEYFARTH K, DRÖGE S, KÖNIG H (2014):** Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:5719-5735
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S (2007):** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S (2011):** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013):** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729
- THAMSIROJ T, NIZAMI AS, MURPHY JD (2012):** Why does mono-digestion of grass silage fail in long term operation? *App. Energy* 95:64-76
- VOß E, WEICHGREBE D, ROSENWINKEL KH (2009):** FOS/TAC: Herleitung, Methodik, Anwendung und Aussagekraft. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17

- WALL DM, ALLEN E, STRACCIALINI B, O'KIELY P, MURPHY JD (2014A):** Optimisation of digester performance with increasing organic loading rate for mono- and co-digestion of grass silage and dairy slurry. *Bioresour. Technol.* 173:422-428
- WALL DM, ALLEN E, STRACCIALINI B, O'KIELY P, MURPHY JD (2014B):** The effect of trace element addition to mono-digestion of grass silage at high organic loading rates. *Bioresour. Technol.* 172:349-355
- WATANABE T, KIMURA M, ASAKAWA S (2009):** Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41:276-285
- WESTERHOLM M, ROOS S, SCHNÜRER A (2010):** *Syntrophacetivibrio schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol. Lett.* 309:00e4
- WESTERHOLM M, ROOS S, SCHNÜRER A (2011a):** *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:260-266
- WESTERHOLM M, DOLFING J, SHERRY A, GRAY ND, HEAD IM, SCHNÜRER A (2011b):** Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environmental Microbiology Reports* 3:500-505
- WESTERHOLM M, MOESTEDT J, SCHNÜRER A (2016):** Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy* 179:124-135
- WORM P, FERMOSE FG, STAMS AJM, LENS PNL, PLUGGE CM (2011):** Transcription of *fdh* and *hyd* in *Syntrophobacter* spp. and *Methanospirillum* spp. as a diagnostic tool for monitoring anaerobic sludge deprived of molybdenum, tungsten and selenium. *Environmental Microbiology* 13:1228-1235
- 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
- ZAKRZEWSKI M, GOESMANN A, JAENICKE S, JÜNEMANN S, EIKMEYER F, SZCZEPANOWSKI R, ... SCHLÜTER A (2012):** Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J. Biotechnol.* 158:248-258

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema: **Bioindikatoren der Biogasfermentation**
Teilprojekt 3: Mikroorganismen der Cellulolyse

Förderkennzeichen: 22007012

Zuwendungsempfänger: Technische Universität München
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Emil-Ramann-Str. 4
85350 Freising-Weihenstephan

Berichtverfasser: Dipl.-Biochem. Alexander Pechtl
Dr. Wolfgang H. Schwarz
Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Kontakt: Dr. Wolfgang H. Schwarz
Tel.: 08161/71-5445, Fax: 08161/71-5475
Email: wschwarz@wzw.tum.de

Inhaltsverzeichnis

I	Ziele	149
I.1	Aufgabenstellung und Zusammenfassung	149
I.2	Stand der Technik	151
I.3	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	155
II	Ergebnisse	156
II.1	Erzielte Ergebnisse	156
II.1.1	AP 2.3 - Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus beiden Phasen der Biogasreaktoren.....	156
II.1.2	AP 3.3 - Identifizierung und Charakterisierung der in den Phasen vorhandenen und aktiven (hemi-) cellulolytischen Bakterienarten	159
II.1.3	AP 4.3 - Beteiligung bei der Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse in Bezug auf (hemi-)cellulolytische Gene	179
II.1.4	AP 5.3 - Etablierung der Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für (hemi-)cellulolytische Aktivitäten und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem	179
II.2	Verwertung	188
II.3	Erkenntnisse von Dritten	190
II.4	Veröffentlichungen	190
II.5	Referenzen	191

I Ziele

Der anaerobe Verdau von Abfallstoffen mit einem hohen Gehalt an pflanzlicher Biomasse zu methanhaltigem Biogas ist eine der effizientesten Arten der Nutzung der enthaltenen Energie. Der Abbau erfolgt durch verschiedene Konsortien von Bakterien, deren metabolische Aktivität die Umwandlung der Ausgangsstoffe zum Biogas gewährleistet. Eine Störung dieser Gemeinschaft führt hierbei im schlimmsten Fall zu einem kostspieligen Zusammenbruch des Fermentationsprozesses und somit der Biogasproduktion. Chemische Parameter als Frühindikatoren für solche Fälle spiegeln als Resultat eine Veränderung in der mikrobiellen Gemeinschaft nur sehr spät wieder, um noch gegenzusteuern zu können. Im Projekt Biogas-Marker wurden daher molekularbiologische Marker für verschiedene Bakterienkonsortien in Biogas-Reaktoren als Frühwarnsysteme entwickelt und in Praxisanlagen getestet.

Mit Fokus auf die Analyse der cellulolytischen und hemicellulolytischen Mikroorganismen wurden in diesem Teilprojekt die in den einstufigen und zweistufigen Fermentern vorhandenen Gemeinschaften auf dominante hydrolytisch aktive Spezies untersucht. Bisher sind nur wenige (insbesondere thermophile) anaerobe Bakterien bekannt und isoliert, die in der Lage sind, im Biogasprozess kristalline Cellulose vollständig und effizient abzubauen. Bei diesen wurden äußerst komplexe, aus vielen Proteinen zusammengesetzte Enzymsysteme beschrieben, die die Hydrolyse des schwer abbaubaren Polymers ermöglichen. Die Diversität der beteiligten Spezies und ihrer Enzyme, sowie das Fehlen von Referenzspezies und -genomen erschweren die Auswertung metagenomischer Daten der Biogas-Community. Diese ist weiterhin eine genomische „black box“, was die klare Identifizierung und somit das Monitoring der an der Biomassehydrolyse beteiligten Spezies schwierig gestaltet. Die für eine klare Klassifizierung nötige Charakterisierung von *ex vivo* isolierten Spezies sagt jedoch wenig über die tatsächliche Gemeinschaft im Fermenter aus, da die meisten Spezies nicht isolierbar sind. Die Entwicklung der Marker erfordert jedoch eine möglichst genaue Abbildung der vorhandenen Gemeinschaft und die Identifizierung der am Abbau beteiligten Spezies. Um diese gezielt zu analysieren bedienen wir uns einer Kombination aus *in vivo* Anreicherung mit anschließender taxonomischer Klassifizierung. Die metagenomische Analyse der angereicherten Gemeinschaft war dabei ein vielversprechender Ansatz.

I.1 Aufgabenstellung und Zusammenfassung

Das Verbundvorhaben BIOGAS-MARKER widmete sich der Frage, welche Mikroorganismen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen am anaeroben Abbau organischer, hier insbesondere pflanzlicher Biomasse zu Biogas beteiligt sind, und ob sie geeignete Marker-Spezies für den Verlauf des Fermentationsprozesses im Biogasreaktor sind. Im Fokus dieses Teilprojektes stehen die Analyse der cellulolytischen und hemicellulolytischen Mikroorganismen in zweistufigen, zweiphasigen Biogas-Fermentations-systemen und die Entwicklung von geeigneten Biomarkern zu deren Nachweis. Als Ziele wurden im Projektantrag folgende Punkte definiert:

1. Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus beiden Phasen der Biogasreaktoren (AP 2.3)
2. Identifizierung und Charakterisierung der (hemi-)cellulolytischen Bakterienarten (AP 3.3)
3. Entwicklung und Anwendung von molekularen Markern für wichtige an der Zellwandhydrolyse beteiligte taxonomische Einheiten (AP 3.3)
4. Beteiligung an der Transkriptom-Analyse der Projektfermenter in Bezug auf (hemi-)cellulolytische Gene (AP 5.3)
5. Etablierung der Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für (hemi-)cellulolytische Aktivitäten, und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem (AP 5.3)

Ziel der Arbeiten an der TUM war die Entwicklung von molekularen Markern zur Untersuchung cellulolytischer Mikroorganismen in den beprobten Biogasfermentern. Die mikrobielle Gemeinschaft wurde weitgehend durch kulturunabhängige Methoden, besonders durch Analyse der DNA der mikrobiellen Gemeinschaft analysiert. Um sicherzustellen, dass die analysierten Nukleinsäureextrakte eine möglichst genaue Abbildung der Biogas-Community sind und zu Standardisierungszwecken wurde zunächst ein DNA- Extraktions-Ringversuch durchgeführt. Jeder Projektpartner extrahierte dafür mit seinem etablierten Laborprotokoll die Gesamt-DNA aus parallel gezogenen Fermenterproben der Projektfermenter. Die Extrakte aller Protokolle wurden anschließend allen Partnern zur vergleichenden qPCR-Analyse zur Verfügung gestellt. Für diesen Vergleich wurden an der TUM die Gesamtanzahl der vorhandenen bakteriellen 16S rRNA-Kopien durch qPCR-Experimente bestimmt. Der Vergleich ergab einen signifikanten Unterschied sowohl im Vergleich der verschiedenen Extraktionsprotokolle als auch in Bezug auf die Quantifizierung durch die verschiedenen Partner, was die Wichtigkeit einer Standardisierung unterstreicht. Das Ergebnis wurde publiziert.

Die Datenlage war zu Beginn des Projektes für eine klare Identifizierung der aktiven cellulolytischen Spezies im Fermenter nicht ausreichend, da weder genügend Referenzgenome isolierter Spezies noch Metagenomdaten der untersuchten Fermenter vorlagen. Es ist dabei essentiell, die an den entsprechenden Prozessen beteiligten Mikroorganismen und deren Charakteristika zu kennen und die Unterschiede zu anderen Bakterien(gruppen) als Identifikationsgrundlage zu nutzen. Für eine Gruppe von 6 isolierten, vermutlich in der Hydrolysephase essentiellen cellulolytischen Spezies des Genus *Clostridium*, Gruppe III, wurden erfolgreich qPCR- Assays entwickelt.

Die gewonnen Fermenterextrakte wurden auf die Präsenz von *Clostridien* hin untersucht, jedoch konnte nur *Clostridium stercorarium* in geringer Anzahl im Fermenter nachgewiesen werden. Dies stellte die Rolle der Clostridien in der Hydrolysephase des beprobten Fermenters in Frage. Mit einer *in vivo*-Anreicherung auf kristalliner Cellulose in *in sacco*-Versuchen wurden die tatsächlich in den thermophilen und mesophilen einphasigen Projektfermentern aktiven Subpopulationen analysiert. Die taxonomische Zusammensetzung wurde anhand des 16S-rRNA-Gens ermittelt. In den Genbibliotheken fanden sich ausschließlich zuvor unkultivierte Spezies, und besonders in den thermo-

philen Fermentern waren zwei Gruppen dominant und machten ca. 80% der Gesamtsequenzen aus. Als nächster isolierter Verwandter dieser Gruppen wurden *Clostridium thermocellum* und *Halocella cellulosilytica* identifiziert, wobei es sich bei den gefundenen Spezies nur um Vertreter der gleichen Familie dieser Spezies handelte.

Um die Bedeutung dieser beiden Spezies im Fermenter zu verifizieren, wurden qPCR-Assays für die taxonomischen Gruppen entwickelt. Hiermit konnten die beiden Gruppen in den einphasigen und zweiphasigen Projektfermentern nachgewiesen werden. Es wurde offensichtlich, dass diese bisher unbekanntes Bakterien entscheidend an den hydrolytischen Prozessen mitwirken.

Als erstes Zwischenergebnis wurde gezeigt, dass ein induzierter Prozesszusammenbruch keine quantitative Veränderung der Speziesverteilung auf DNA- Ebene im Verlauf der Stressinduktion mit sich bringt. Somit sind die Spezies nur eingeschränkt als phylogenetischer Marker geeignet, da sie unsensibel gegenüber Veränderungen in den Prozessbedingungen sind. Da die Isolierungsversuche von Vertretern der identifizierten taxonomischen Einheiten zunächst ergebnislos blieben, wurde ein funktioneller Metagenomik-Ansatz gewählt. Dieser sollte aktive Enzyme der Gemeinschaft zu identifizieren. Weiterhin wurde ein Metagenom der Gemeinschaft sowie Fermenterschlamms erstellt und liegt zur Auswertung vor.

Wichtige Schlüsselenzyme der *in sacco*-Gemeinschaft zur Hydrolyse von Pflanzenbiomasse wurden durch ein Aktivitätsscreening identifiziert. Dafür wurde aus metagenomischer DNA eine Fosmid-Bibliothek konstruiert und diese in *E. coli* transformiert. So wurden im anschließenden Agarplatten-Aktivitätsscreening auf 3 Polymersubstraten (beta-Glukan, Xylan, Xyloglukan) eine Vielzahl metagenomischer Fragmente gefunden, die für Gene mit hydrolytischer Aktivität kodieren. Die zugrundeliegenden Enzyme wurden durch Sequenzierung der Fosmide identifiziert und liegen als Datensatz zur Charakterisierung und Nutzung vor.

Als abschließender Schritt wurde ein Metagenom-Datensatz der *in sacco*-Anreicherung und des Fermenterschlamms erstellt. Die bioinformatisch prozessierten Daten lagen zu Ende des Projektzeitraumes vor, konnten wegen des Projektendes jedoch noch nicht ausgewertet werden und bilden somit eine wichtige Grundlage für Folgeprojekte.

1.2 Stand der Technik

Heutzutage werden immer noch etwa 80% des globalen Energiebedarfs aus der Verbrennung fossiler Energieträger gewonnen. Der weltweite Energiebedarf wird in diesem Jahrhundert noch um das Zwei- bis Dreifache ansteigen. Ohne Gegenmaßnahmen wird dies in Zukunft durch die Anreicherung von CO₂ in der Atmosphäre zu drastischen klimatischen Veränderungen führen. In diesem Kontext wächst das Interesse an der Bereitstellung von Energie aus nachwachsenden Rohstoffen, die fossile Brennstoffe zum größten Teil ersetzen können (KAZAMIA & SMITH 2014). Die Biogas-Erzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen ist derzeit die attraktivste Technologie für eine nachhaltige

und Kohlenstoffdioxid-neutrale Energieproduktion für ein *drop-in-fuel* mit dem höchsten Energieertrag pro Hektar verglichen mit anderen Pflanzen-basierten Bioenergiequellen (ANTONI *et al.* 2007, WEILAND 2006).

Auch die energie- und umweltpolitischen Diskussionen in Deutschland werden maßgeblich durch die energiebedingten Umweltauswirkungen mitbestimmt (FNR 2013). Seit Inkrafttreten des Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) in Jahr 2000 hat die Erzeugung und Nutzung von Biogas erheblich zugenommen (**Abbildung 1**); der Zuwachs stagniert jedoch derzeit, was nur durch massive Effizienzsteigerungen des Prozesses wieder aufgebrochen werden kann. Hierzu soll dieses Projekt beitragen.

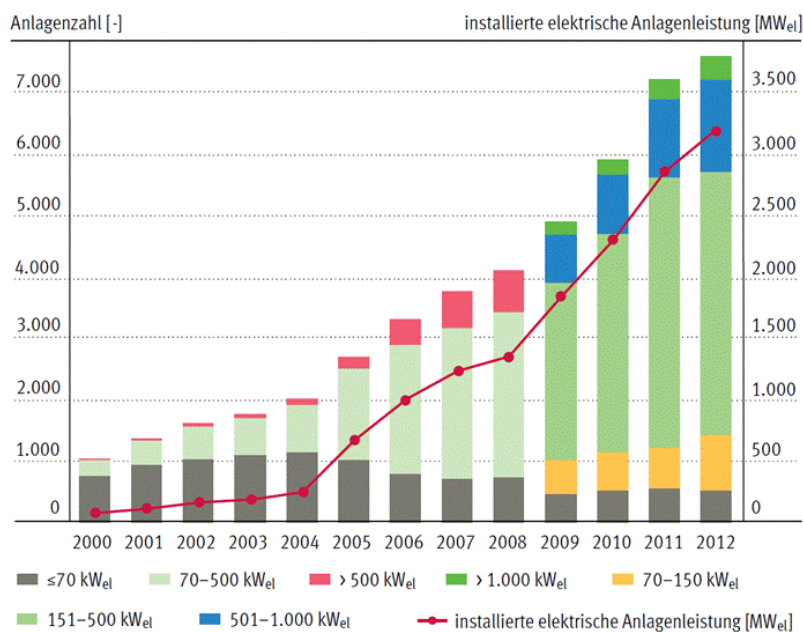


Abbildung 1: Entwicklung der Biogasanlagen in Deutschland – Anzahl der Anlagen differenziert nach Leistungsklassen und installierter elektrischer Anlagenleistung MW_{el} ohne Biogasaufbereitungsanlagen, Deponie- und Klärgasanlagen (FNR 2013)

Das primäre Ziel von Biogasanlagen ist es, organische Substanz, darunter zunehmend Cellulose haltige Biomasse, unter anaeroben Bedingungen mikrobiell zu einem überwiegend methanhaltigen Gas abzubauen. Ähnliche Abbauprozesse sind in der Natur weit verbreitet und findet z.B. auch in Flüssen, Seen, Sumpfen, Mooren, schlecht durchlüfteten Böden, sowie in Klärgruben statt. Abhängig von der Substratzusammensetzung und dem Fermentationsverfahren besteht das gebildete Gasmisch überwiegend aus Methan (50-75 Vol-%) und Kohlendioxid (FNR 2013). Aus dem im Biogas enthaltenen Methan wird durch kontrollierte Verbrennung in Blockheizkraftwerken (BHKWs) elektrische und thermische Energie erzeugt (GÖRISCH & HELM 2006). Der gesamte Abbauprozess im Biogasfermenter besteht im Wesentlichen aus vier Stufen, in denen jeweils unterschiedliche Bakteriengruppen aktiv sind.

In der ersten Stufe, der „**Hydrolyse**“, bauen in erster Linie hydrolytische Bakterien die eingespeisten hochmolekularen, organischen Substanzen (Proteine, Kohlenhydrate, Fette) mit Hilfe hydrolytischer Exoenzyme zu niedermolekularen Aminosäuren, Zuckern und Fettsäuren ab. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse ist dabei von der Aktivität der extrazellulären Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pectinasen, Amylasen, Proteasen, Xylanasen oder Lipasen abhängig (EDER & SCHULZ 2007). Bei mikrobiell schwer abbaubaren Stoffen (wie Cellulose) ist dieser Schritt im Gesamtprozess geschwindigkeitsbestimmend und daher für die Effizienz von Substratabbau und Biogasbildung von ganz besonderer Bedeutung; Clostridien sind in dieser ersten Stufe die dominierenden Organismen (GÖRISCH & HELM 2006). Sie verwenden die gebildeten Stoffe zum Teil selbst und stellen sie zum Teil anderen Mikroorganismen zur Verfügung.

Die durch die hydrolytischen Bakterien in ihrem Stoffwechsel gebildeten Zwischenprodukte werden in der zweiten Phase, der sogenannten „**Acidogenese**“ oder Fermentation, durch säurebildende Mikroorganismen in kurzkettige Carbonsäuren (z.B. Butter-, Essig-, Ameisen-, Propionsäure), niedermolekulare Alkohole, Wasserstoff, CO₂ und Wasser umgewandelt. Dabei wird der pH-Wert abgesenkt und der noch vorhandene Sauerstoff vollständig verbraucht. Dadurch werden die anaeroben Bedingungen für die methanogenen Archaeen sichergestellt (FNR 2013).

Durch weitere biochemische Umsetzungen produzieren acetogene Bakterien aus den genannten Stoffen hauptsächlich Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als Ausgangsprodukte für die anschließende Methanbildung. Dieser Vorgang wird auch als „**Acetogenese**“ bezeichnet. Diese Wasserstoff bildenden Bakterien sind sehr temperaturempfindlich (EDER & SCHULZ 2007). Der Abbau von Butter- und Propionsäure zu Essigsäure ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende und thermodynamisch schwierigste Schritt des Gesamtabbaus. Ein zu hoher Wasserstoffpartialdruck verhindert aus thermodynamischen Gründen die Umsetzung und führt zur Anreicherung der organischen Säuren, wodurch wiederum die Methanbildung gehemmt wird (Stams *et al.* 1993).

Im letzten Schritt der Biogasbildung, der „**Methanogenese**“, werden vor allem Essigsäure sowie Wasserstoff und Kohlendioxid von strikt anaeroben methanogenen Archaeen zu Methan umgewandelt. Man unterscheidet zwischen hydrogenotrophen Methanogenen, welche aus Wasserstoff und Kohlendioxid Methan produzieren, und acetoclastischen Methanogenen, welche durch Essigsäurespaltung Methan bilden. Unter den in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorherrschenden Bedingungen erfolgt die Methanbildung bei höheren Raumbelastungen vorwiegend über den Wasserstoff verwendenden Reaktionsweg und nur bei relativ geringer Raumbelastung über den Essigsäure spaltenden Reaktionsweg (BAUER *et al.* 2008).

Während die fermentativen Prozesse durch eine Reihe verschiedener Bakterien hauptsächlich aus den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes, aber auch durch Proteobacteria umgesetzt werden, besitzen nur Archaeen des Phylums Euryarchaeota die notwendige enzymatische Ausstattung zur Methanogenese. Jeder der Schritte von der Biomasse

bis zum Biogas kann im Prozess ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt sein und sollte analysiert werden. Nur ein gut aufeinander abgestimmtes Verhältnis der Reaktionskinetiken aller dieser vier Stufen (und damit der bakteriellen Zusammensetzung im Biogasfermenter) führt zu einer effizienten Methanproduktion.

Zur spezifischen Detektion von Mikroorganismen stehen generell drei alternative Analyseverfahren zur Verfügung: der Nachweis der Mikroorganismen *in situ*, die Kultivierung der Mikroorganismen mittels spezieller Nähr- und Selektionsmedien und der kulturunabhängige Nachweis der Mikroorganismen auf Basis artspezifischer Moleküle. Trotz einer Reihe von bereits durchgeführten Studien muss die Biogas-Mikrobiologie im Allgemeinen noch als „*black box*“, also als weitestgehend unbekannter Mikrokosmos angesehen werden (CIRNE *et al.* 2007, ZIGANSHIN *et al.* 2013). Deshalb wird die Aufklärung der mikrobiellen Zusammenhänge allgemein als Schlüssel für die weitere verfahrenstechnische Optimierung der Biogasfermentation betrachtet (WIETSCHER *et al.* 2010). Die mikrobiologische Analytik wird jedoch dadurch erschwert, dass die Mikrobengemeinschaft aus hunderten der unterschiedlichsten Arten von Mikroorganismen besteht, welche u.a. aufgrund der anaeroben Lebensweise und syntropher bzw. symbiotischer Wechselbeziehungen häufig (noch) nicht oder nur schwer kultivierbar sind. Viele der vorhandenen und im Fermenter hochaktiven Arten sind bislang weder taxonomisch noch physiologisch beschrieben.

In den letzten Jahren konnten durch verschiedene kulturunabhängige Hochdurchsatzverfahren in der mikrobiologischen Analytik technologische Durchbrüche erzielt werden, welche es möglich erscheinen lassen, die „*black box*“ der Biogas-Mikrobiologie allmählich zu entschlüsseln. Hierzu zählen insbesondere sog. OMIK-Technologien, wie Genomik (Analyse des gesamten Erbguts einer Zelle), Transkriptomik (Analyse der exprimierten Gene einer Zelle), Proteomik (Analyse der Proteine in einer Zelle) und Metabolomik (Analyse des Stoffwechsels einer Zelle). Alle diese Technologien können nicht nur auf Reinkulturen, sondern (mit allerdings sehr viel größerem Aufwand) auch auf Bakteriengemeinschaften angewendet werden (Meta-Techniken). Mit der Entwicklung neuer Sequenzierungstechnologien können ganze Metagenome mikrobieller Gemeinschaften schnell und relativ kostengünstig entschlüsselt werden (KRAUSE *et al.* 2008, RADEMACHER *et al.* 2012, SCHLUETER *et al.* 2008, ZAKRZEWSKI *et al.* 2013). Aufgrund mangelnder Referenzsequenzen von bereits beschriebenen Spezies und der hohen Anzahl an noch nicht beschriebenen Spezies, sowie der relativ kurzen DNA-Fragmentlängen sind die hiermit erhaltenen Datenmengen bislang jedoch nur ansatzweise auswertbar.

Im Rahmen der BMBF/PTJ geförderten Vorhaben FABES (03SF0346B) und BiogasPlusProjekt (03SF0349C) wurden in Zusammenarbeit Projektpartner ATB und CeBiTec mehrere Metagenom-Analysen von Biogasfermentationen durchgeführt. Bislang resultierten aus diesen Arbeiten DNA-Sequenzinformationen im Umfang von 441 Mio. Basenpaaren (Mb). Ein großer Anteil dieser Sequenzen (ca. 40 – 50%) ist bislang jedoch nicht interpretierbar, da in den verfügbaren Datenbanken keine vergleichbaren (bekannten) DNA-Sequenzen hinterlegt sind. Ein weiterer Teil dieser Sequenzen kann nur „ungenau“ bestimmten taxonomischen Gruppen und metabolischen Funktionen zu-

geordnet werden, da sie größere Unterschiede zu den verfügbaren Referenzsequenzen aufweisen. Eine Ursache hierfür liegt darin begründet, dass bislang nur wenige Mikroorganismen aus Biogasanlagen isoliert und mikro- bzw. molekularbiologisch charakterisiert worden sind. Eine allein auf der Kultivierung mit Standardmedien beruhende Beschreibung der Biozönose ist zu stark limitiert und repräsentiert nicht die tatsächlichen Verhältnisse im untersuchten mikrobiologischen Habitat (WENZEL 2002).

Die Entwicklung von spezifischen Markern für diese Bakteriengruppen erfordert jedoch eine genaue Kenntnis der zu untersuchenden Mikroorganismen und Gengruppen sowie deren metabolischer Eigenschaften. Die größte Herausforderung des Vorhabens stellt hierbei die einwandfreie Identifizierung der hydrolytischen Organismen und Enzyme aufgrund der schlechten Datenlage dar.

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

GATC Biotech AG

- Fosmidpräparation für die Fosmidsequenzierung
- Illumina-Sequenzierung des Metagenoms und *in sacco*-Metagenoms des thermophilen einphasigen Fermenters
- Sanger-Endsequenzierung der Fosmidinserts

Cebitec, Universität Bielefeld

- Bioinformatische Auswertung des Metagenoms und *in sacco*- Metagenoms des thermophilen einphasigen Fermenters

Landesanstalt für Landwirtschaft (Freising)

- Betrieb der einstufigen Laborfermenter, Durchführung der „in sacco“ Versuche
- Bereitstellung zahlreicher Gärrestproben zur Nukleinsäure-Extraktion
- Probenahmen

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie (Potsdam-Bornim)

- Betrieb der zweistufigen Laborfermenter
- Bereitstellung zahlreicher Gärrest- und Perkolatproben zur Nukleinsäureextraktion

II Ergebnisse

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 AP 2.3 - Optimierung und Standardisierung der Präparation von mikrobieller DNA und RNA aus beiden Phasen der Biogasreaktoren

II.1.1.1 Eigenschaften der Projektfermenter

Im Zuge des Verbundvorhabens Biogas- Marker wurde der stabile Betrieb von insgesamt 8 Biogas-Fermentern mit Rindergülle und Grassilage etabliert. An der LfL in Freising standen 4 einstufige, kontinuierlich betriebene *constantly stirred tank reactor (CSTR)*- Fermenter zur Verfügung, welche im mesophilen (Bm3m und Bm4M, 37°C) und thermophilen (Bm1t und Bm2t, 55°C) Bereich betrieben wurden. Am ATB in Potsdam wurden insgesamt 4 zweistufige Fermenter mit getrennter Hydrolyse- und Methanphase im batch-Betrieb etabliert und beprobt, auch hier je 2 bei mesophiler (Hr1t und Hr2t, 55°C) und thermophiler (Hr1m und Hr2m, 37°C) Prozesstemperatur. Aus allen 8 Fermentern wurden Proben für die Extraktion der Gesamt-DNA für den Extraktions-Ringversuch genommen, wobei es sich hier bei den einphasigen Fermentern um Fermenterschlämme und bei den zweiphasigen Fermentern um das flüssige Perkolat der Hydrolysephase handelte. Zur Simulation eines möglichen Prozessabbruches wurde die Raumbelastung der Fermenter sukzessive erhöht. Die daraus resultierende Anreicherung organischer Säuren, sowie hohen Konzentrationen organischen Stickstoffs war die Folge des Zusammenbruchs der Methanogenese und Acetogenese und führte schließlich zum Einbruch der Biogasproduktion.

II.1.1.2 DNA- Ringversuch

Als Grundlage für die qPCR-basierte Analyse der mikrobiellen Community des Projektfermenters sah das Arbeitspaket 2.3 einen DNA-Ringversuch zur Optimierung der Nukleinsäureextraktion aus den Fermenterproben vor. Hierfür wurde an der TUM DNA aus Material der einstufigen und zweistufigen Projektfermenter mit einem etablierten Protokoll extrahiert und allen Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Im zweiten Schritt wurden die Extrakte aller Partner mit qPCR-basierten Assays von 4 Projektpartnern, u.a. der TUM, untersucht. Zur Evaluierung der Extrakte wurde die Gesamtkopiezahl bakterieller 16S rRNA-Gene mit einem etablierten Assay bestimmt. Vier der verwendeten Protokolle basierten auf dem FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, **Tabelle 1**). Ein 5. Protokoll war optimiert für die Extraktion von hochmolekularen Nukleinsäuren für die Metagenomsequenzierung und basierte auf einer Chloroform: Isoamylalkohol/Isopropanol-Fällung.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten DNA-Extraktionsprotokolle

Protokoll		1	2*	3*	4	5
Extraktionsvolumen	Perkolat (HR)	2 mL	100 µL	40 µL	2 mL	26 g
	Schlamm (CSTR)	50 µL	40 µL	40 µL	50 µL	26 g
Vorbehandlung der Proben			60 s Ultra-Turrax, centrifuged, 2x 0.85% KCl-washed	60 s vortexed, centrifuged, 2x 0.85% KCl-washed	centrifuged, resuspended in ultrapure H ₂ O	washed with PBS
Zellyse		2x 20 s @ 5.0 bead beater (MP Biomedicals, Lysing Matrix E Tubes)	40 s @ 6.0 bead beater (MP Biomedicals, Lysing Matrix E Tubes)	40 s @ 6.0 bead beater (MP Biomedicals, Lysing Matrix E Tubes)	disruptor (Scientif. industr.); MP Bio-medicals Lysing Matrix E Tubes	CTAB/pronase/SDS/65°C
Verwendetes Kit		FastDNA Spin kit for Soil	FastDNA Spin Kit for Soil	FastDNA Spin Kit for Soil	FastDNA Spin Kit for Soil	no
DNA-Aufreinigung		Kit-Komponenten, Silica-Matrix basiert,	Kit-Komponenten, Silica-Matrix basiert,	Kit-Komponenten, Silica-Matrix basiert,	Kit-Komponenten, Silica-Matrix basiert,	chloroform:isomylalcohol, isopropanol
Elutionsvolumen		100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

* Wie beschrieben in LEBUHN *et al.* (2003) und MUNK *et al.* (2010) mit den beschriebenen Abweichungen.

Die Ergebnisse des DNA-Ringversuches wurden im wissenschaftlichen Fachmagazin „Bioengineering“ am 13. Januar 2016 unter dem Titel „DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison“ gemeinsam veröffentlicht.

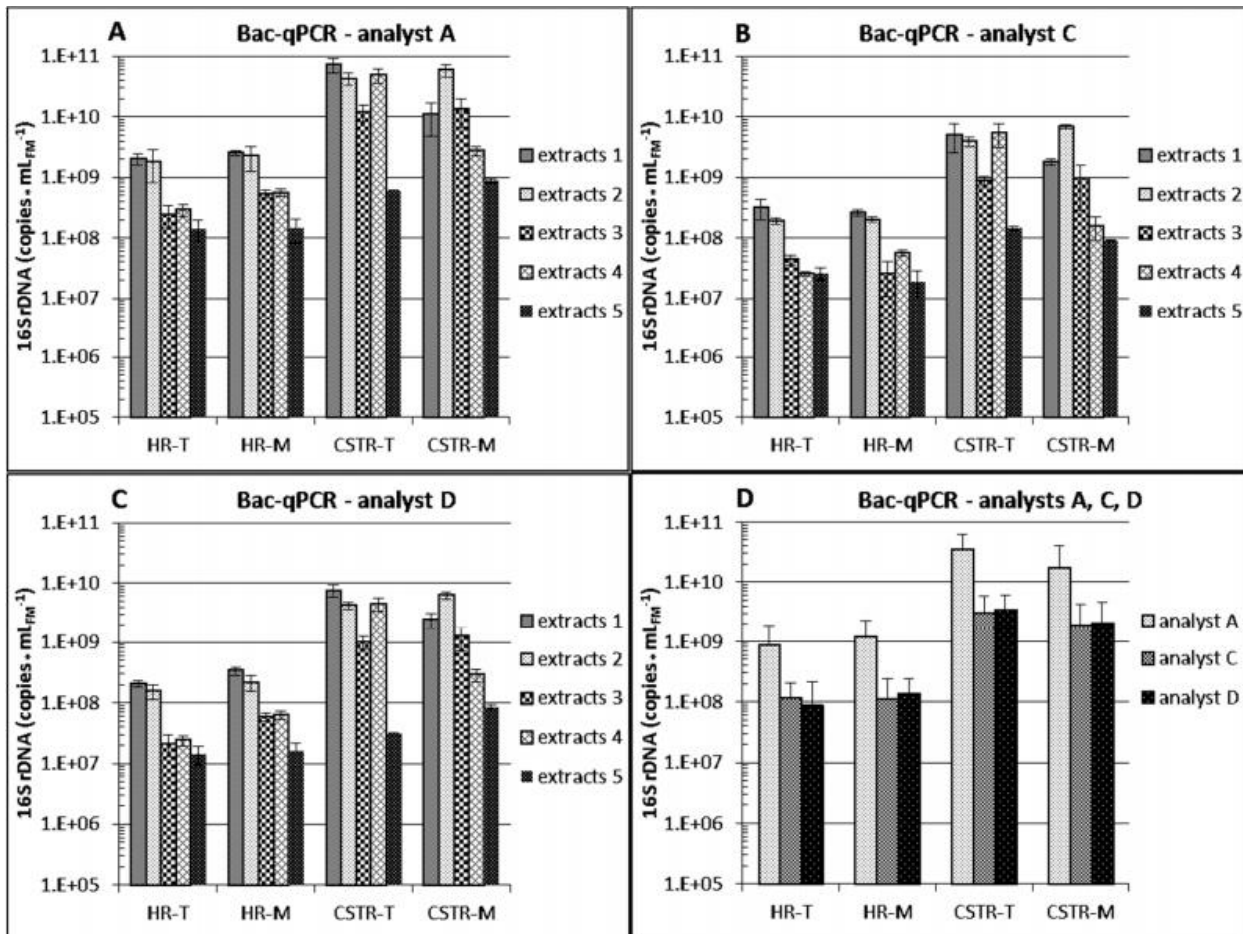


Abbildung 2: qPCR-Bestimmung der 16S rDNA-Kopiezahl für Bakterien (Bac). Alle Kopiezahl sind pro Volumen der frischen Probe angegeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier biologischer Replikate von vier verschiedenen Biogasreaktorproben sind gezeigt. Für jede Biogasreaktorprobe wurde die DNA in verschiedenen Laboratorien (Partner / Analysten) unter Verwendung ihrer etablierten Protokolle extrahiert A-E). Jedes Extrakt wurde bei den Analysten (A,C,D) mit zwei, meist sechs und gelegentlich 10 qPCR Replikaten analysiert. Abbildung D zeigt die Bac-qPCR-Daten als Gesamtmittel der Extraktionsprotokolle 1-5 und die entsprechenden Standardabweichungen. HR: "Hydrolyse" -Reaktor; CSTR: kontinuierlich gerührter Tankreaktor; T: thermophil; M: mesophil. Abbildung aus LEBUHN *et al.* 2016.

Wie aus **Abbildung 2** ersichtlich, gab es starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Extraktionsprotokollen auf den verschiedenen Biogasfermenterproben. Während Protokoll 2 am geeignetsten für die viskosen Proben der einphasigen Fermenter mit einer sehr resistenten Probenmatrix waren, erreichte das Protokoll 1 höhere Kopiezahl für die flüssigen Perkolatproben des Hydrolysereaktors des zweistufigen Prozesses. Die im Anschluss bestimmten Kopiezahl in der qPCR lagen bei Analyst C und D im Durchschnitt um eine Größenordnung unter den von Analyst A ermittelten Konzentrationen. Die Versuchsreihen zeigten, dass für die Gewinnung von DNA-Extrakten zur qPCR-Analyse eine Abstimmung des Protokolls auf die Probenmatrix notwendig ist. Als Folge wurde beschlossen, für hochviskosere CSTR-Proben das Protokoll 2 zu verwenden, wohingegen bei Perkolatproben das Protokoll 1 als Standard und Ausgangspunkt für zukünftige Optimierungen verwendet wurde.

II.1.2 AP 3.3 - Identifizierung und Charakterisierung der in den Phasen vorhandenen und aktiven (hemi-)cellulolytischen Bakterienarten

Wie bereits zuvor bemerkt, stellt der Flaschenhals jeglicher Auswertung metagenomischer Daten einer Biogas-Fermenter-Gemeinschaft die Menge an verfügbaren Referenzdaten dar. Zwar ist die Anzahl der verfügbaren Genome hydrolytische aktiver, anaerober Bakterien durch große Isolierungsanstrengungen in der jüngsten Vergangenheit gestiegen, jedoch sind andere Anreicherungsverfahren notwendig, um einen Einblick in die Zustände im Fermenter zu bekommen. Bei einer *ex vivo*-Anreicherung werden die Wachstumsbedingungen im Fermenter nur in stark vereinfachter Form nachgebildet und erlaubt wegen fehlender Rahmenbedingungen für das Wachstum einiger Bakterien somit nur einen sehr verzerrten Einblick in die tatsächlichen Zustände im Biotop. Als Konsequenz daraus haben wir eine Methode zur Anreicherung von Mikroorganismen in den Fermentern entwickelt und in den einstufigen Projektfermentern der LfL durchgeführt.

II.1.2.1 *In sacco*- Versuche

Ziel des Versuches war es, die an Cellulose bindende Bakteriengemeinschaft im Fermenter möglichst *in vivo* anzureichern und sie anschließend mit Kultur-unabhängigen Methoden zu analysieren. Hierfür wurden großporige Nylonsäckchen mit Whatman-Papier (kristalline Cellulose) befüllt und über einen Probenträger in den Fermenter eingebracht (**Abbildung 3**). Das offene System erlaubte den freien Transfer von Mikroorganismen auf die Probe und ihre direkte Versorgung mit den benötigten wachstumsfördernden Stoffen aus dem Fermenterschlamm. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Nylonsäcke entnommen und die DNA der adhärenen Mikroorganismen nach mehreren Waschschritten mit isotonischer Salzlösung extrahiert und analysiert.

Um zu überprüfen, ob mit der „*in sacco*“ Methode tatsächlich cellulolytische Bakterien „*in situ*“ (im Fermenter) angereichert werden konnten, und zu prüfen, ob es sich bei diesen um bereits isolierte Spezies oder neue, bisher unbekannte Vertreter der Gemeinschaft handelt, wurde eine 16S-rRNA-Amplikonsequenzierung der DNA Proben durchgeführt. Dazu wurde das Filterpapier von je 2 Entnahmezeitpunkten (1d und 7d) aus Bm1t, Bm2t, Bm3m und Bm4m homogenisiert und die DNA daraus isoliert. Anschließend wurde das 16S rRNA Gen, mit spezifischen Primern gegen bakterielle 16S-rRNA-Gene, durch PCR amplifiziert, in einen Plasmidvektor kloniert und die Plasmidlibrary in *E. coli* transformiert. Die Plasmide wurden anschließend aus *E. coli*- Kulturen isoliert und die DNA-Inserts sequenziert.

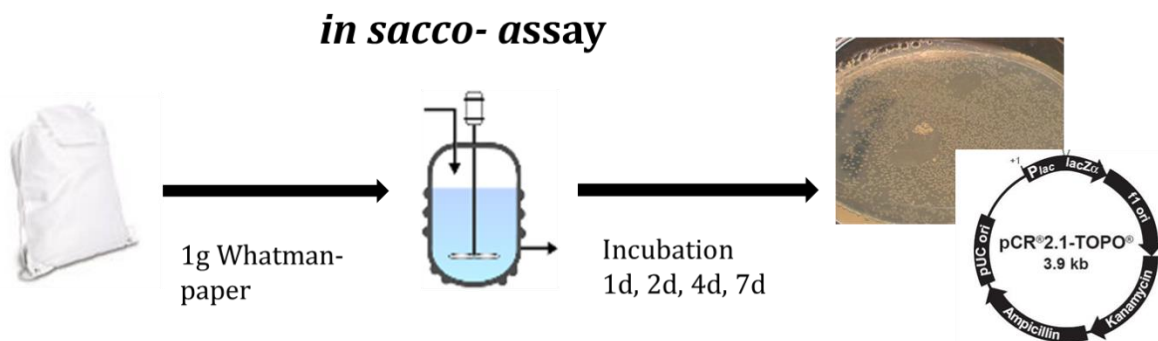


Abbildung 3: Nytonsäckchen wurden mit kristalliner Cellulose befüllt und in die Laborfermenter der LfL eingebracht. Anschließend wurden diese entnommen, die DNA der Gemeinschaft extrahiert und zunächst in 16S-rRNA-Bibliotheken sequenziert und analysiert. Oben: Nytonsäckchen und die beprobten Projektfermenter.

II.1.2.2 Taxonomische Charakterisierung der angereicherten Mikroorganismen

Bei der Erstellung der Klonbibliotheken aus den „in sacco“ Anreicherungen stammten zu über 80% der sequenzierten Klone aus zwei definierten taxonomischen Einheiten, innerhalb derer die Sequenzen >98% Ähnlichkeit aufwiesen (**Abbildung 4**). Diese wiesen die höchste 16S rRNA Gensequenzübereinstimmung mit bereits isolierten cellulolytischen Spezies auf. Die häufigste taxonomische Gruppe hatte als nächsten Verwandten *Halocella cellulosilytica* mit einer 16S rRNA Sequenzübereinstimmung von 89-96% und wurde der Familie der *Halanaerobiaceae* zugeordnet. Die zweithäufigste taxonomische Gruppe wies mit 91-96% Sequenzübereinstimmung den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *C. thermocellum* auf und gehörte zur Familie der *Ruminococcaceae*. Sowohl *C. thermocellum* als auch *H. cellulosilytica* Stämme sind in der Lage, kristalline Cellulose abzubauen (KOECK *et al.* 2014). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Anreicherung cellulolytischer Bakteriengemeinschaften in situ erfolgreich war.

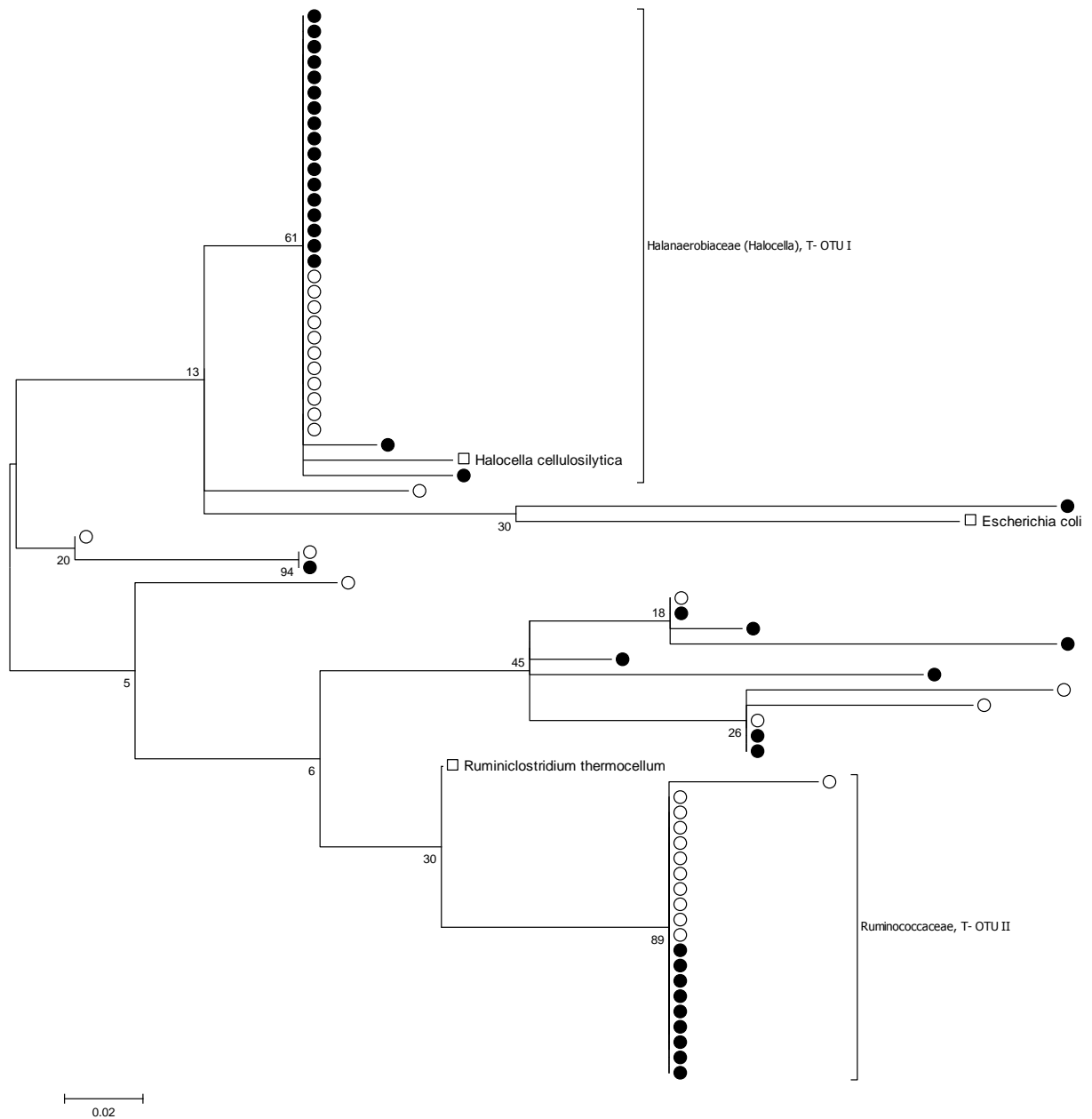


Abbildung 4: Molekularphylogenetische Analyse der Bm1t und Bm2t 16S rRNA- Bibliotheken durch die Maximum Likelihood Methode. Die Abbildung zeigt eine zusammengefasste Darstellung der Sequenzen der Proben der Tage 1 (●, n=37) und 7 (○, n=26) der beiden Fermenter. Die Sequenzen wurden auf 16S-rRNA Chimäre mit dem DECIPHER-Chimera Detection-Tool untersucht, mit ClustalW und die evolutionäre Geschichte mit einer Maximum Likelihood Methode basierend auf dem Tamura-Nei Modell nachgebildet.

Tabelle 2: Ähnlichkeiten der Sequenzen zu isolierten Spezies gefunden durch blastn-Suche gegen die 16S ribosomal RNA-Sequence Database und die Zuweisung durch den SINA classifier der BM1t und Bm2t-Fermenter.

<i>SINA classification (Silva)</i>	<i>Closest isolated relative (Blastn)</i>	<i>Homology</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Thermaerobacter litoralis</i> strain KW1	86%	
		<i>Desulfotomaculum geothermicum</i> strain DSM 3669	88%	
		<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> strain Nari2A	86%	
		<i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain LMG 18084	87%	
		<i>Hydrogenispora ethanolica</i> strain LX-B	90%	
		<i>Syntrophaceticus schinkii</i> strain Sp3	88%	
		<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> strain Nari2A	86%	
		<i>Desulfitibacter alkalitolerans</i> strain sk.kt5	90%	
		<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i> strain 3nP4	89%	
		<i>Acetomicrobium faecale</i> strain DSM 20678	88%	
		<i>Clostridia</i>		
		<i>Clostridiales</i>		
		<i>Caldicoprobacteraceae</i>		
		<i>Clostridia</i>	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> strain PML14	95%
		<i>Clostridiales</i>	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i> strain DSM 16624	94%
<i>Family XI</i>				
<i>Clostridia</i>	<i>Halocella cellulositytica</i> strain Z-10151	92-96%		
<i>Halanaerobiales</i>				
<i>Halanaerobiaceae</i>				
<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i> strain JCM 9322	91-96%		
<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i> strain ATCC 27405	91-96%		
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium alkalicellulosi</i> strain Z-7026	91-93%		
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Turicibacter sanguinis</i> strain MOL361	90%	
	<i>Haloplasmatales</i>			
	<i>Haloplasmataceae</i>			

Bemerkenswert ist, dass generell die Sequenzähnlichkeit mit kultivierten Bakterien 97% nicht übersteigt. Somit kann keiner der Klone direkt einer der genannten bekannten Arten zugeordnet werden. Auch war zu beobachten, dass zwischen den einzelnen Probenentnahmezeitpunkten eine geringe sukzessive Anreicherung der beiden Hauptpopulationen stattfanden; beide Populationen fanden sich aber in Bibliotheken beider Entnahmezeitpunkte (**Abbildung 5**).

Die angereicherten Gemeinschaften der mesophilen Fermenter zeigen eine größere Diversität, wobei auch die Zusammensetzung der Gemeinschaften zwischen den beiden Fermentern stark variiert, was bei den thermophilen Fermentern nicht zu beobachten war (**Abbildung 6** und **7**). In den Fermentern finden sich Spezies aus unterschiedlichen Familien; wie aber auch bei den thermophilen Fermentern sind es größtenteils Vertreter des Phylum *Firmicutes*. In diesem Phylum findet man fast alle anaeroben Celluloseabbauer. Viele der angereicherten Spezies haben Cellulose-abbauende Bakterien in ihrem näheren taxonomischen Umfeld. Die gefundenen Sequenzen weisen aber in der Regel noch niedrigere Homologien zu isolierten Spezies auf als in der thermophilen Anreicherung. Auch im mesophilen Fermenter wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit cellulolytische Bakterien angereichert, bei denen es sich um potentielle Key Player der Hydrolysephase des beprobten Reaktors handelt.

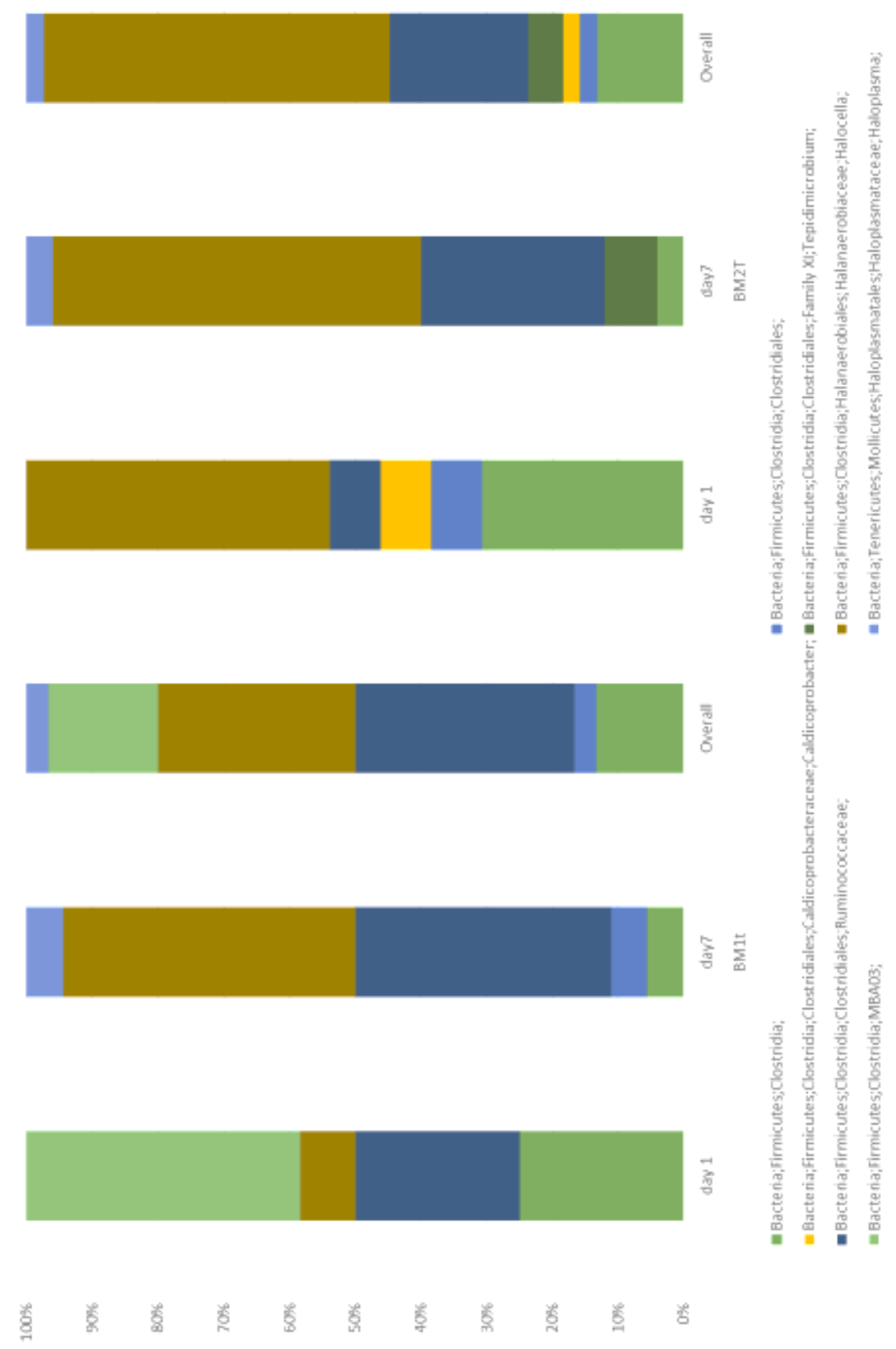


Abbildung 5: Taxonomische Zusammensetzung der *in sacco*-Proben zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten. Insgesamt 30 Sequenzen aus dem Bm1t- (Tag 1: 12, Tag 7: 18) und 37 Sequenzen aus den Bm2t- 16S rRNA-Bibliotheken (Tag 1: 13, Tag 7: 25) wurden untersucht. Gezeigt ist die taxonomische Zuweisung durch den SINA- Classifier.

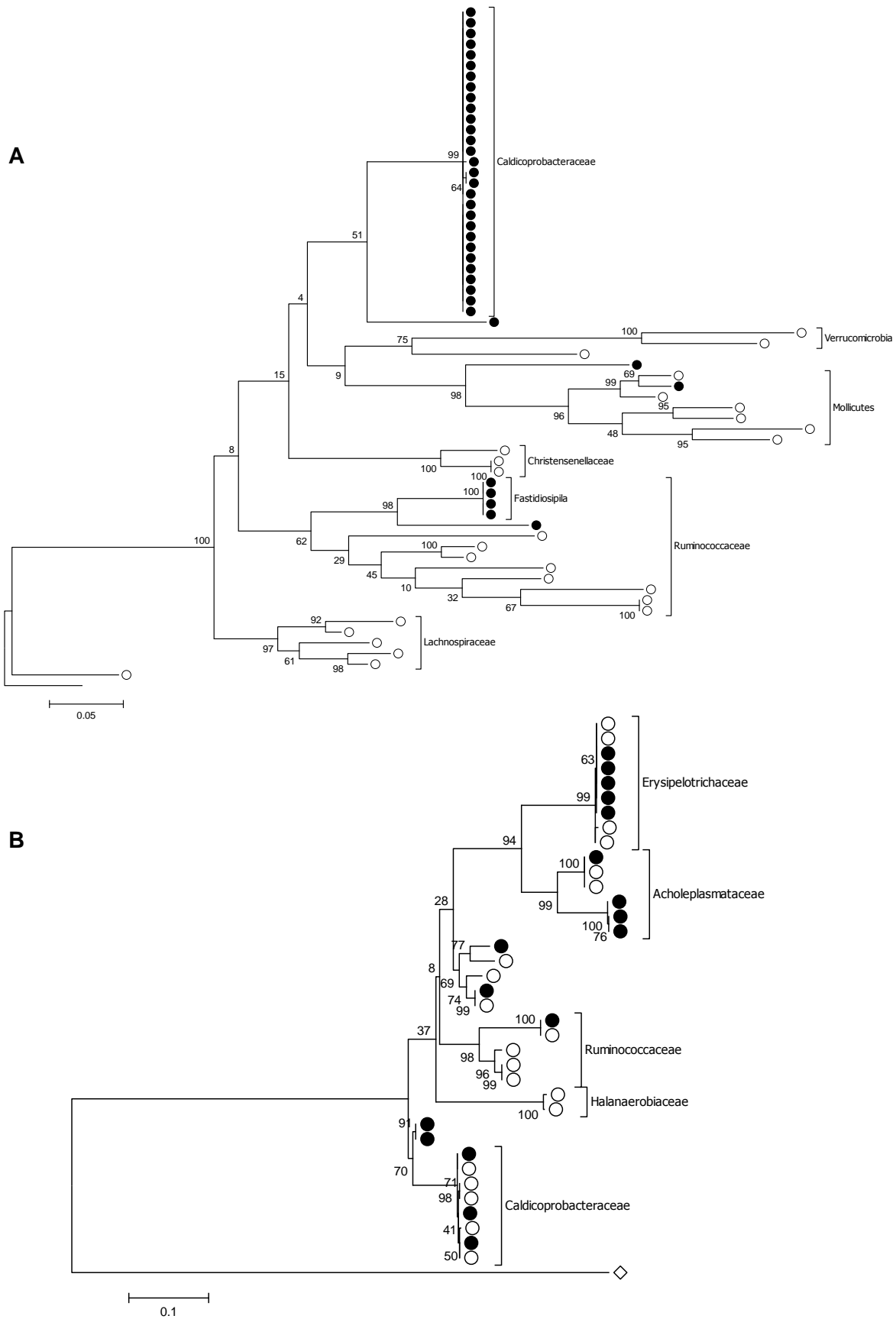


Abbildung 6: Molekularphylogenetische Analyse der Bm3m (A) und Bm4m (B) 16S rRNA- Bibliotheken durch die Maximum Likelihood Methode. Die Abbildungen zeigen eine zusammengefasste Darstellung der Sequenzen der Probenstage 1 und 7. Die Sequenzen wurden auf 16S rRNA Chimäre mit dem DECIPHER- Chimera Detection-Tool untersucht, mit ClustalW und die evolutionäre Geschichte mit einer Maximum Likelihood Methode basierend auf dem Tamura-Nei Modell nachgebildet.

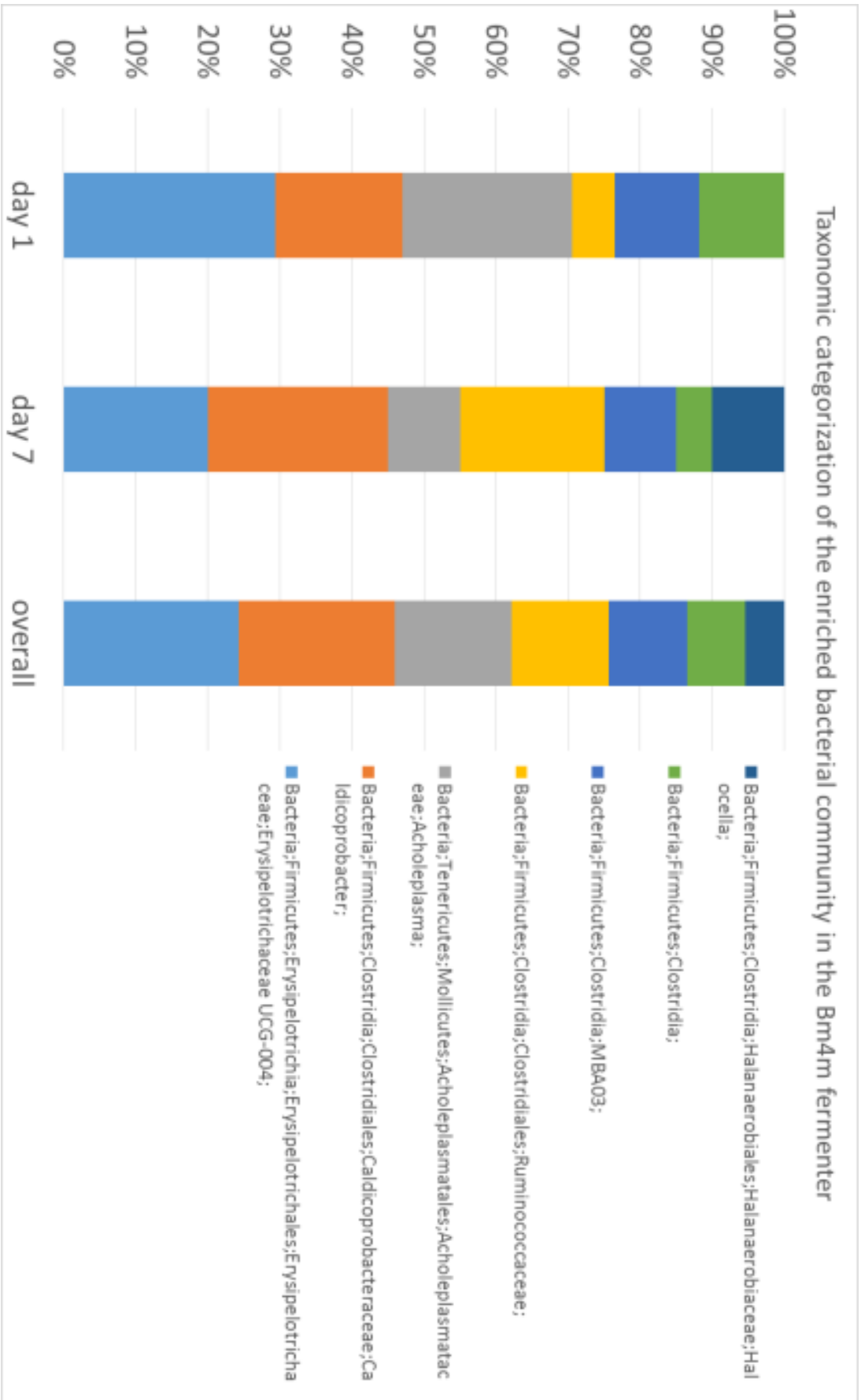
A

<i>SINA classification (Silva)</i>		<i>Closest isolated relative (Blastn)</i>	<i>Homology</i>
Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Dehalobacter restrictus</i> strain PER-K23	90%
		<i>Desulfotomaculum gibsoniae</i> strain DSM 7213	90%
		<i>Clostridium clariflavum</i> strain DSM 19732	89%
		<i>Desulfotomaculum arcticum</i> strain 15	90%
		<i>Ammoniphilus oxalivorans</i> strain RAOx-FS	90%
	<i>Clostridia</i>	<i>Ercella succinigenes</i> strain ZWB 16S	92%
	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridium straminisolvens</i> strain CSK1	98%
	<i>Ruminococcaceae</i>		
	<i>Clostridia</i>	<i>Acetomicrobium faecale</i> strain DSM 20678	88-89%
	<i>Clostridiales</i>	<i>Caldicoprobacter algeriensis</i> strain TH7C1	89%
	<i>Caldicoprobacteraceae</i>	<i>Brassicibacter thermophilus</i> strain Cel2f	89-90%
	<i>Clostridia</i>	<i>Halocella cellulositytica</i> strain Z-10151	87%
	<i>Halanaerobiales</i>		
	<i>Halanaerobiaceae</i>		
<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Eubacterium tortuosum</i> strain ATCC 25548	87%	
<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Dielma fastidiosa</i> strain JC13 16S	87%	
<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Holdemania filiformis</i> strain J1-31B-1	88%	
Tenericutes	<i>Mollicutes</i>	<i>Acholeplasma vituli</i> strain FC 097-2	92-93%
	<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Mycoplasma feliminutum</i> strain Ben	91-92%
	<i>Acholeplasmataceae</i>		

B

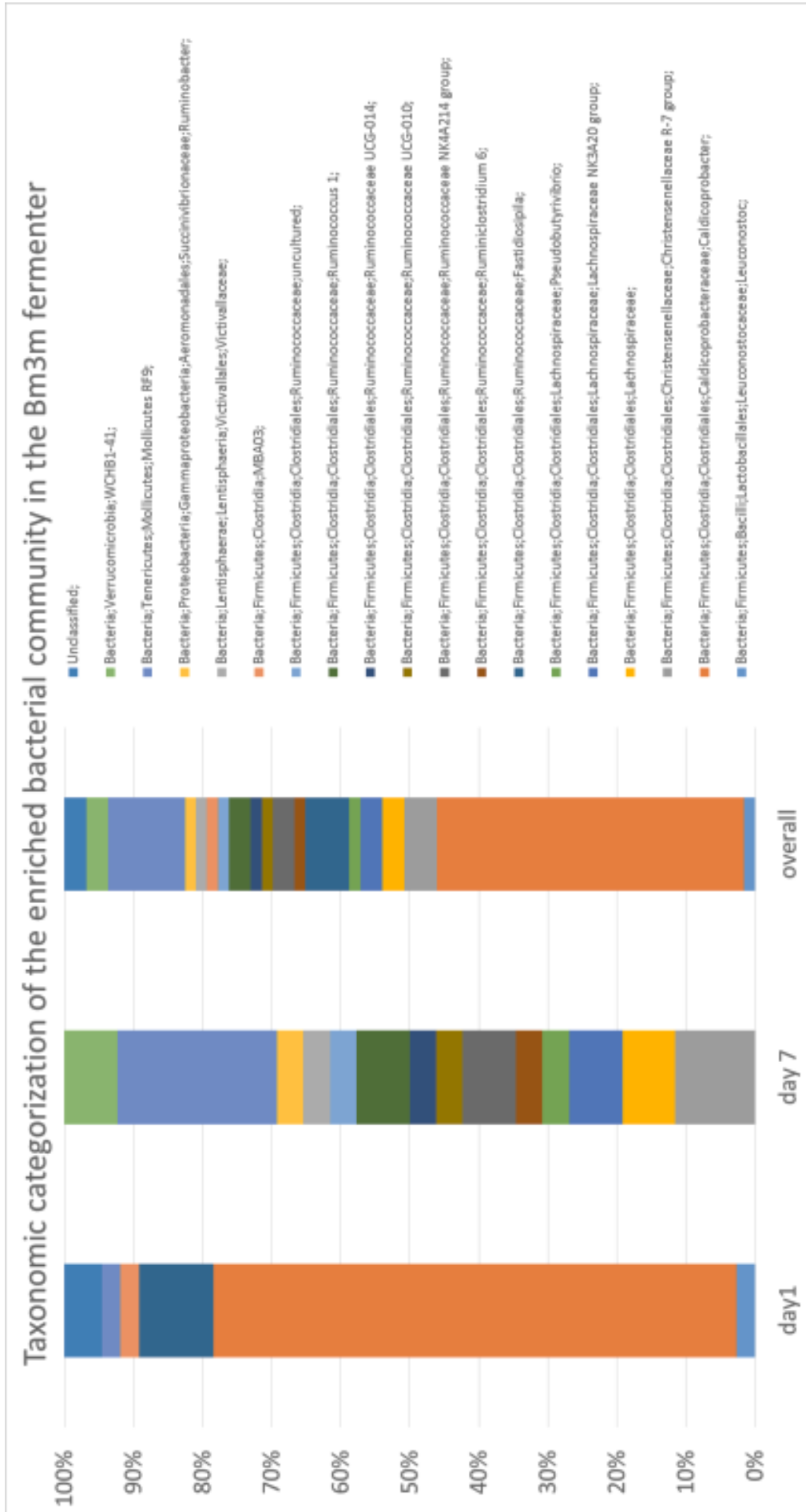
<i>SINA classification (Silva)</i>		<i>Closest isolated relative (Blastn)</i>	<i>Homology</i>	
Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Thermaerobacter litoralis</i> strain KW1	86%	
		<i>Desulfotomaculum geothermicum</i> strain DSM 3669	88%	
		<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> strain Nari2A	86%	
		<i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain LMG 18084	87%	
		<i>Hydrogenispora ethanolica</i> strain LX-B	90%	
		<i>Syntrophaceticus schinkii</i> strain Sp3	88%	
		<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> strain Nari2A	86%	
		<i>Desulfitibacter alkalitolerans</i> strain sk.kt5	90%	
		<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i> strain 3nP4	89%	
		<i>Clostridia</i>	<i>Acetomicrobium faecale</i> strain DSM 20678	88%
		<i>Clostridiales</i>		
		<i>Caldicoprobacteraceae</i>		
		<i>Clostridia</i>	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i> strain PML14	95%
	<i>Clostridiales</i>	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i> strain DSM 16624	94%	
	<i>Family XI</i>			
	<i>Clostridia</i>	<i>Halocella cellulositytica</i> strain Z-10151	92-96%	
	<i>Halanaerobiales</i>			
	<i>Halanaerobiaceae</i>			
	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i> strain JCM 9322	91-96%	
<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i> strain ATCC 27405	91-96%		
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium alkalicellulosi</i> strain Z-7026	91-93%		
Tenericutes	<i>Mollicutes</i>	<i>Turicibacter sanguinis</i> strain MOL361	90%	
	<i>Haloplasmatales</i>			
	<i>Haloplasmataceae</i>			

Abbildung 7: Taxonomische Zusammensetzung der in sacco-Proben zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten des Bm4m (A und C) und Bm3m- Fermenters (B und D). Zu sehen sind jeweils in den oberen Abbildungen die Gegenüberstellung der taxonomischen Klassifizierung durch blastn-Homologiesuche und die SILVA- Klassifizierung. Die unteren Abbildungen zeigen die Gesamtzusammensetzung der Genbibliotheken, wobei bei der Uweisung der Sequenzen in Gruppen die SILVA-Klassifizierung verwendet wurde



C

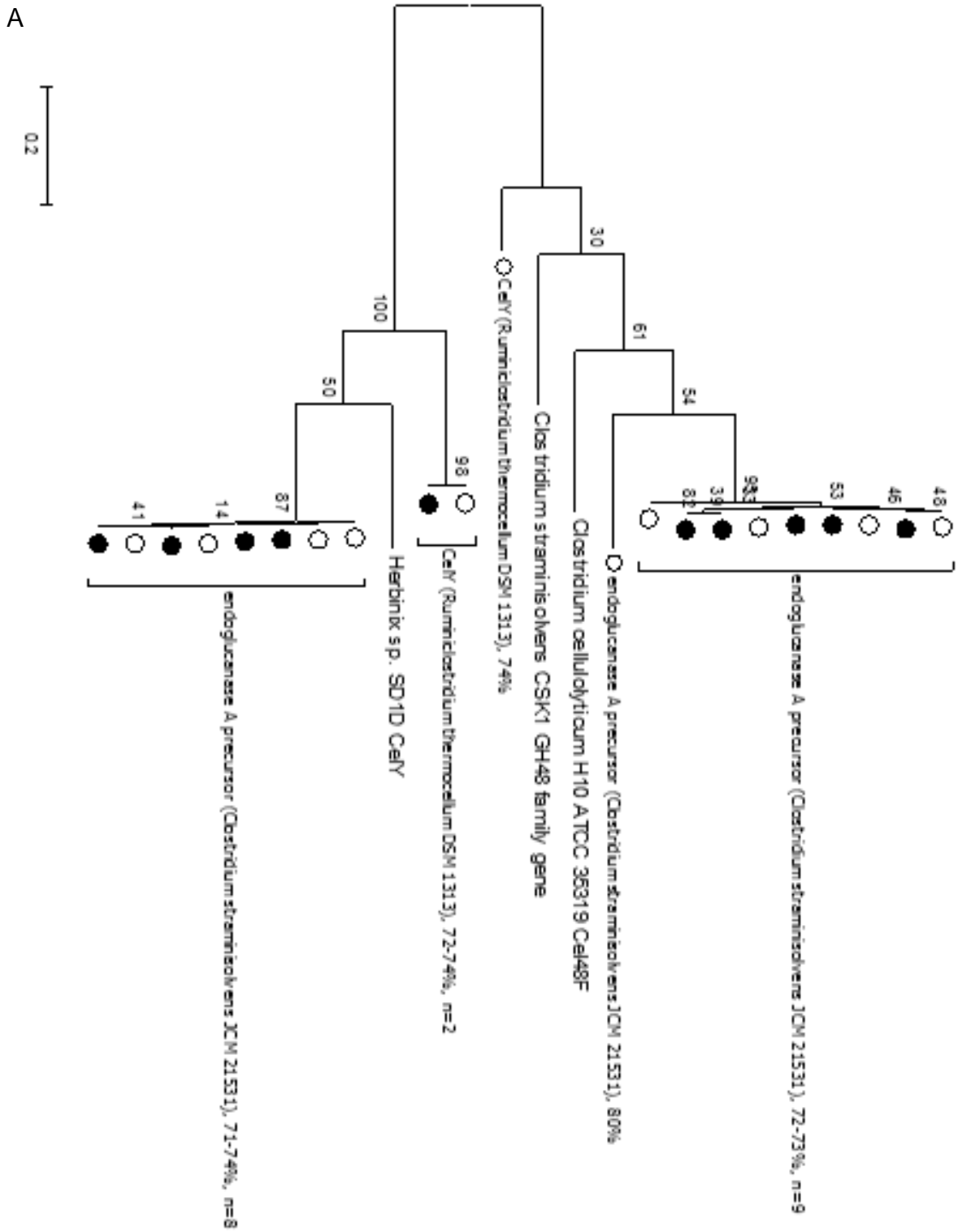
D



II.1.2.3 Analyse cellulolytischer Gene der Glykosidhydrolase-Familie 48

Analog der taxonomischen Analyse wurde Gene der Glykosid Hydrolasen der Familie 48 der angereicherten Gemeinschaft untersucht (**Abbildung 8**). Hier handelt es sich um Gene, die den Abbau von Cellulose katalysieren und somit charakteristisch für cellulolytische Spezies sind.

Alle gefundenen Sequenzen wiesen signifikante Ähnlichkeiten mit den GH48-Genen isolierter cellulolytischer Spezies auf. In den Proben der thermophile Fermenter zeigten sich die höchsten Homologien zu dem GH48-Gen von *Clostridium straminisolvens* CSK1 (70-73%). Die Amplikons der mesophilen Fermenterextrakte zeigten ebenfalls Homologien zu *Clostridium straminisolvens* CSK1 (71-79%) sowie weiterhin dem *exgS*-Gen aus *Clostridium cellulovorans* (69-72%). Starke Homologien zu den cellulolytischen Gene isolierter Spezies traten auch hier nicht auf.



B

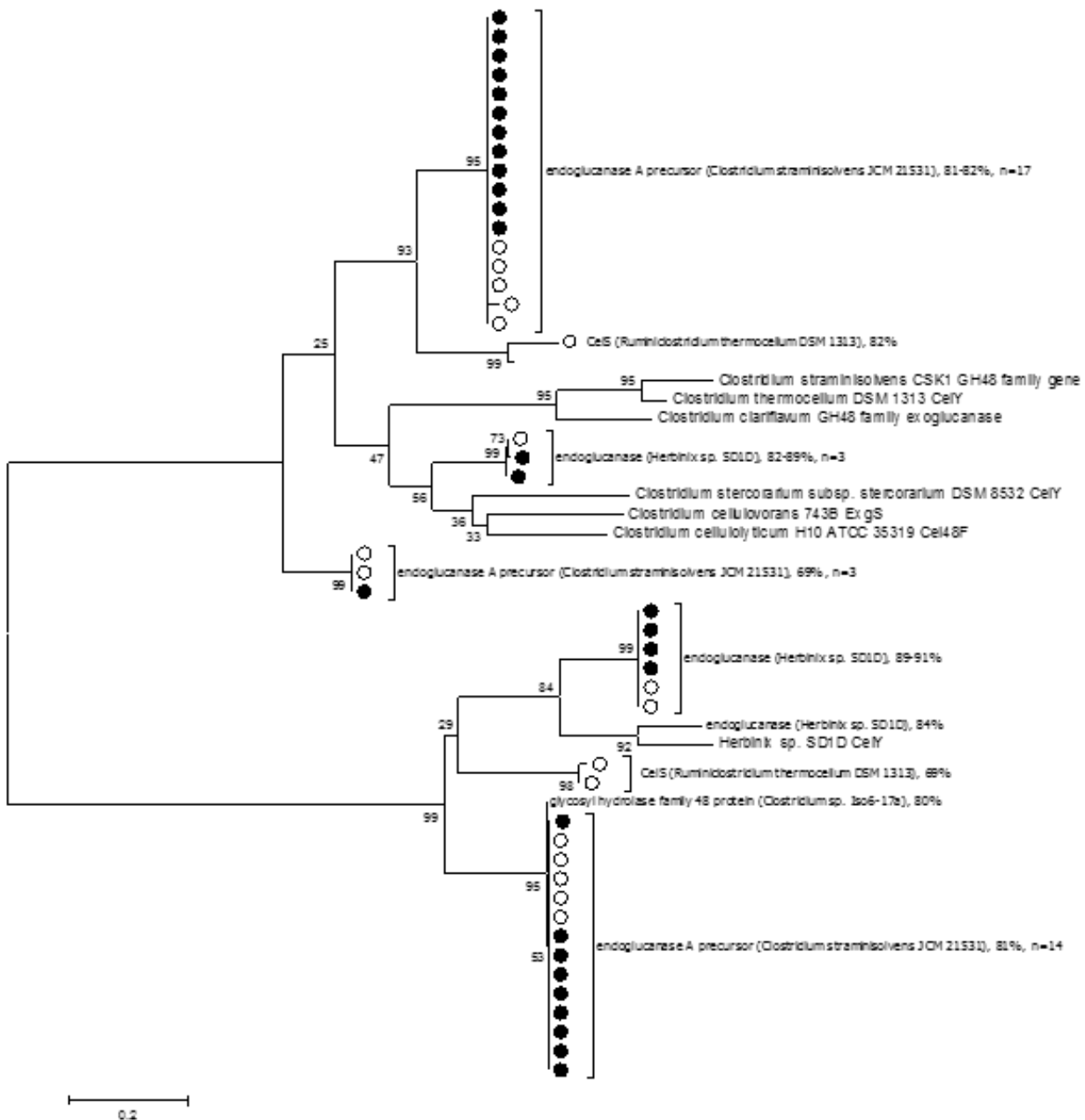


Abbildung 8: Phylogenetische Bäume der sequenzierten GH48-Gen-Amplifikons der Anreicherungen in den thermophilen (Bm1t und Bm2t, A, n=24) und mesophilen Fermentern (Bm3m und Bm4m, B, n=37). Es wurden jeweils analysierte Proben der Entnahme nach einem und sieben Tagen der Fermenter mit der gleichen Betriebstemperatur zusammengefasst und zur Konstruktion der Bäume genutzt. Das Ergebnis der Blastn-Suche (am nächsten verwandte kultivierte Spezies und Homologie) ist an den Ästen bzw. Kladen angegeben. Die Bäume wurden mit dem MEGA6-Softwarepaket unter Nutzung eines Maximum-Likelihood-Modells mit 500 Bootstrap-Wiederholungen erstellt.

II.1.2.4 Funktionelle Metagenomik

Die in den *in sacco*-Versuchen angereicherte mikrobielle Gemeinschaft besteht aus putativ cellulolytischen Mikroorganismen, aber neben den zum Celluloseabbau nötigen Enzymen beinhalten ihre Genome auch hemicellulolytische Enzyme. Diese sind notwendig, um andere Zellwandpolymere abzubauen und somit die Cellulosefasern zugänglich zu machen. Da es weiterhin schwierig ist, katalytische Aktivitäten den entsprechenden Sequenzen im Metagenom *in silico* zuzuweisen, wurden aktive Gene mit einer kulturunabhängigen, funktionellen Screening-Strategie direkt durch den Abbau von bestimmten im Fermenter vorkommenden Polymeren identifiziert.

II.1.2.4.1 Aktivitätsscreening der Fosmid-Bibliotheken auf Xylan, Xyloglukan und beta-Glukan

Zur funktionellen Identifizierung der Gene hydrolytischer Enzyme wurden metagenomische Fragmente der *in sacco*-DNA-Extraktes in einen Fosmidvektor ligiert und diese in *E. coli* transformiert. Die so generierte Bibliothek einzelner Fosmide mit unterschiedlichen Inserts ermöglichte die Identifizierung hydrolytisch aktiver Enzyme der angereicherten Gemeinschaft durch ein Aktivitätsscreening auf verschiedenen Substraten. Hierfür wurden Fosmid-Bibliotheken aus einem *in sacco*-Bm1t und *in sacco*-Bm3m-DNA-Extrakt konstruiert. Die dabei erhaltenen 960 und 300 *E. coli* EPI300 Klone tragen je einem Fosmid mit ca. 25-40 kb großen Inserts und wurden in einem Agarplatten-Aktivitätsscreening auf Xylan aus Haferspelzen, Xyloglukan und Hafer- β -Glukanen getestet (**Abbildung 9**).

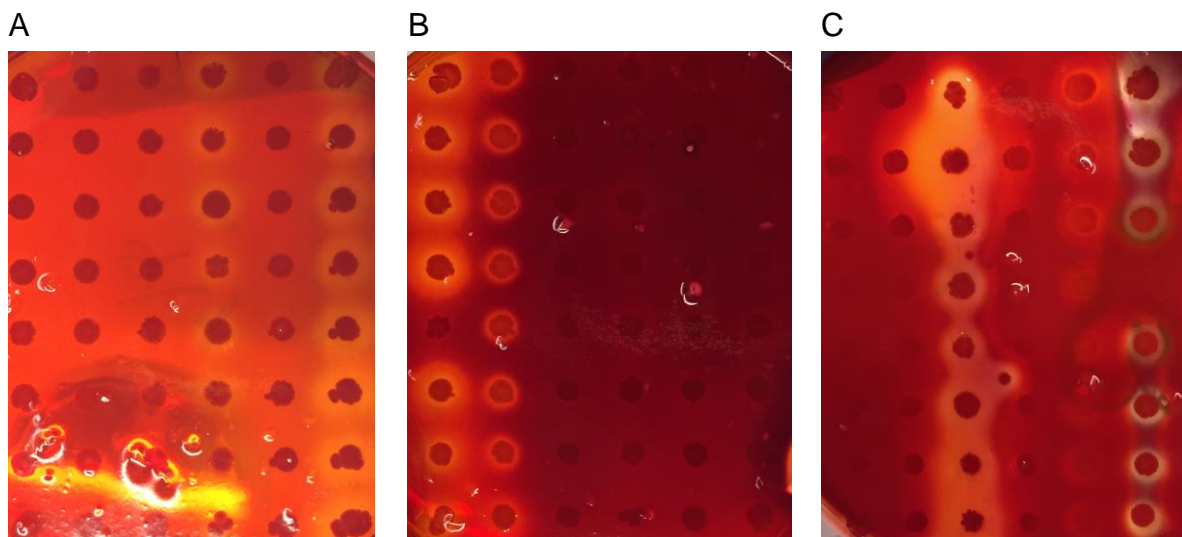


Abbildung 9: Kongorot-gefärbte Agarplatten der Aktivitätsassays auf Xylan (A), Xyloglukan (B) und Hafer- β -Glukan. Die Klone der Library wurden mithilfe eines Stempels aus Flüssigkulturen in 96-Well-Platten auf die Agarplatten übertragen. Nach dem Wachstum wurden die Zellen durch Hitze lysiert und mit einem Top-Agar, welcher das entsprechende Polymer enthielt, überschichtet. Die Aktivitätsassays wurden bei 38°C für die mesophile Bibliothek und bei 55°C für die thermophile Library in 3h-1d durchgeführt. Bei der anschließenden Färbung der Polymere mit Kongorot waren positive Klone am transparenten Hofe erkennbar, welcher sich den Abbau des Polymeren gebildet hatte.

In der thermophilen Bibliothek wurden so insgesamt 43 aktive Klone identifiziert, 14 zeigten Aktivität auf Xylan, 14 auf Xyloglukan und insgesamt 25 Klone zeigten Aktivität auf Hafer- β -Glukan (**Abbildung 10**). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Zellrohextrakte der positiven Klone in einem Aktivitätsassay getestet (**Abbildung 11**).

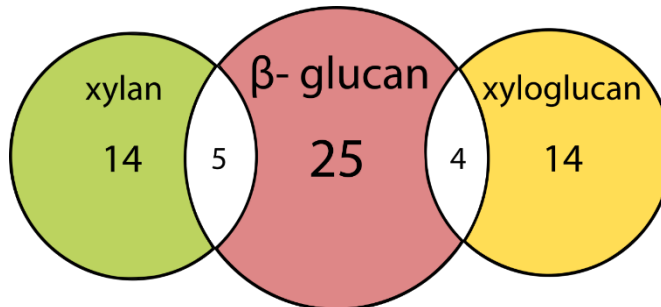


Abbildung 10: Übersicht der hydrolytisch aktiven Klone der Fosmid-Bibliothek

Die Hydrolysate der Assays wurden in der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, um das Produktspektrum der verschiedenen Enzyme zu ermitteln. Im Chromatogramm sind unterschiedlichste Abbaumuster der getesteten Substrate erkennbar, wobei sowohl längere als auch kürzere Fragmente der Substrate vertreten sind (**Abbildung 12**). Dies legt nahe, dass sich in den Fosmiden Gene sowohl für Endo- als auch für Exoglukanasen bzw. -xylanasen befinden. Die Fosmid-Library zeigte einen relativ hohen Anteil an aktiven Fosmiden, ca. 4% aller getesteten Klone, was für eine Anreicherung hydrolytischer Gene in der Gemeinschaft spricht.

cell lysates	agar plates			cell lysates	agar plates			pCT3FK																		
	xyloglucan	xyloglucan	xyloglucan		xyloglucan	xyloglucan	xyloglucan																			
barley β-glucan	0.47	1.83	1.39	0.33	0.3	4.98	13.7	0.79	17.1	15.7	0.25	4.24	1.32	2.23	1.38	0.27	0.49	3.32	0.26	0.66	0.24	1.29	5.88	1.81	0.37	
xyloglucan	4.87	0.32	12.4	0.3	0.3	7.48	7.48	4.48	8.63	6.38	0.38	3.22	0.68	2.77	7.74	9.96	4.48	7.74	9.96	0.24	0.36	5.69	0.4	0.66	0.37	0.66
barley β-glucan	4.85	0.32	12.4	0.3	0.3	7.48	7.48	4.48	8.63	6.38	0.38	3.22	0.68	2.77	7.74	9.96	4.48	7.74	9.96	0.24	0.36	5.69	0.4	0.66	0.37	0.66

Abbildung 11: Zusammenfassung der hydrolytischen Aktivität der aktiven Fosmidklone auf den drei getesteten Substraten. Die Aktivität auf der Agarplatte wurde semiquantitativ anhand des Halo-Durchmessers bestimmt (- - - niedrige Aktivität bis ++++ - hohe Aktivität). Die Aktivität der Zellysate wurde durch die Freisetzung von reduzierenden Zuckern mit einem DNSA-Reagenz bestimmt und ist in mU pro mL Zellysat angegeben. Für die Zellextrakte wurden die aktiven Klone nach Übernachts-Wachstum bei 37°C geerntet und durch Lysozym-Behandlung sowie einem freeze-thaw-Zyklus lysiert. Die Zellrümer wurden abzentrifugiert und die Extrakte für die Enzymassays verwendet. Der Assay wurde über 22 Stunden bei 55°C durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden 36 Fosmide mit den höchsten Aktivitäten bzw. einer Mehrfachaktivität isoliert und auf der Illumina-Plattform sequenziert. Dies ermöglicht zu-

nächst die taxonomische Zuordnung der Enzyme und die Identifizierung stark verteilter Gene in der Gemeinschaft. Die einzelnen Illumina-Sequencing-Reads wurden in *contigs* assembliert. Durch eine Sanger-Sequenzierung der Enden des Fosmidinserts wurde versucht, diese den verschiedenen Klonen bzw. Fosmiden zuzuordnen und somit den zuvor gefundenen Aktivitäten zuzuweisen.

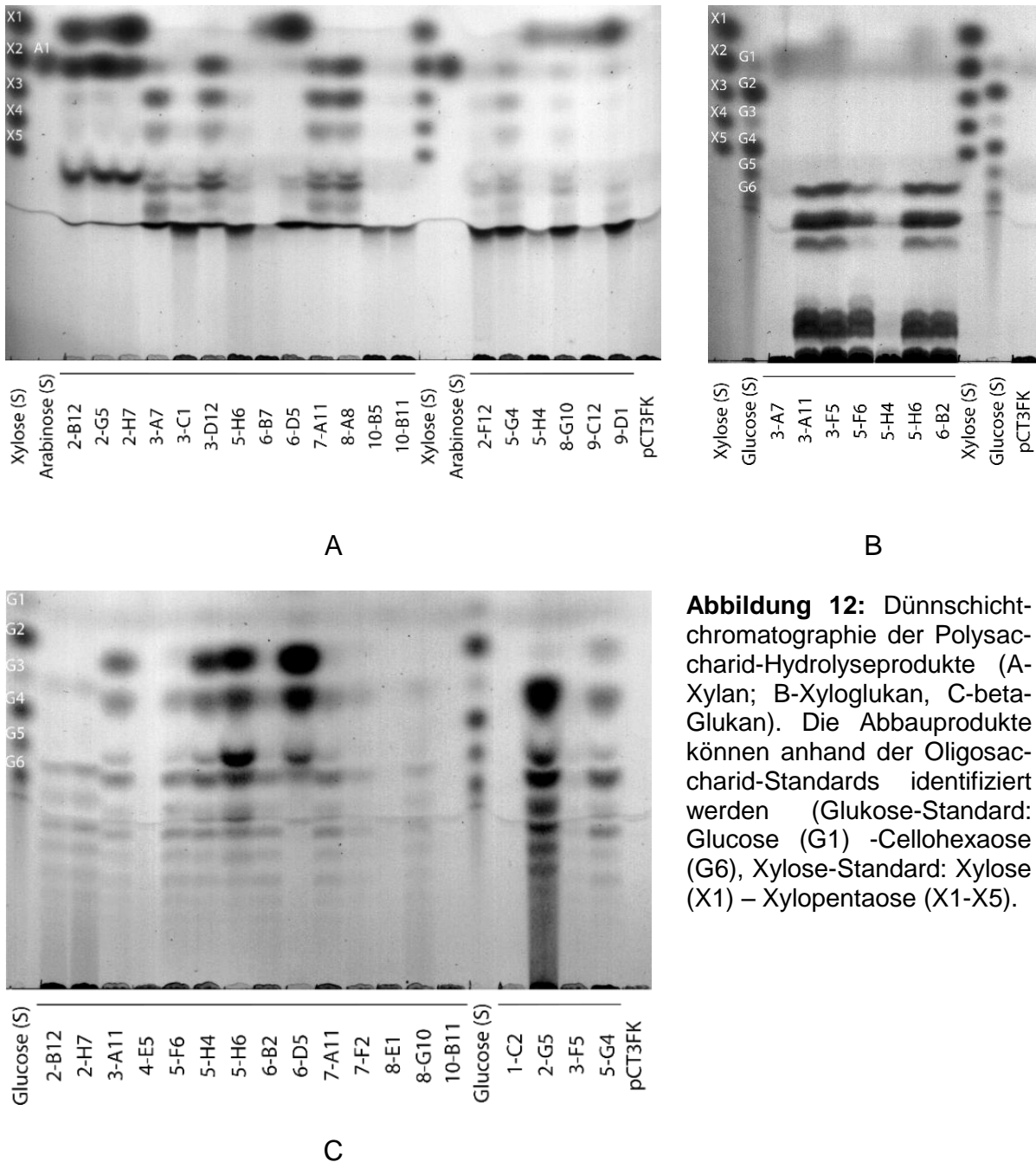


Abbildung 12: Dünnschichtchromatographie der Polysaccharid-Hydrolyseprodukte (A-Xylan; B-Xyloglucan, C-beta-Glucan). Die Abbauprodukte können anhand der Oligosaccharid-Standards identifiziert werden (Glucose-Standard: Glucose (G1) -Cellohexaose (G6), Xylose-Standard: Xylose (G6), Xylose-Standard: Xylose (X1) – Xylopentaose (X1-X5).

Aus der Assemblierung resultierten 15 komplett sequenzierte Fosmide, bei 3 konnte das Insert nicht identifiziert werden. Die verbliebenen Inserts waren unvollständig sequenziert, so dass die 1-2 *contigs* pro Fosmid in die Analyse einbezogen wurden. Die Annotation und Suche nach putativen Genen durch den RAST-Server identifizierte 729 *open reading frames* auf den assemblierten Inserts, von denen zunächst 42 als hydrolytisch aktive Kandidatengene identifiziert wurden (**Abbildung 13**, **Abbildung 14**).

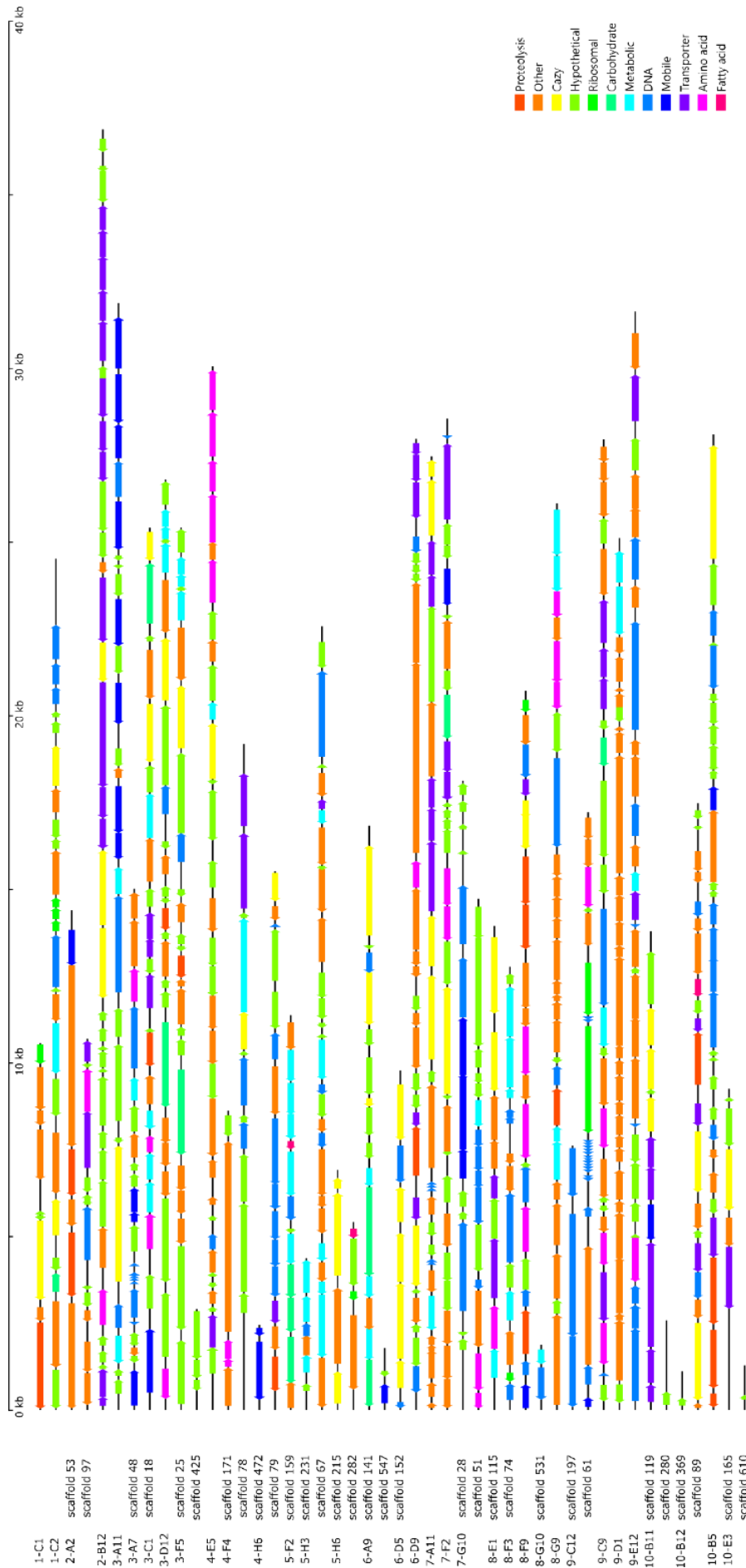


Abbildung 13: Graphische Darstellung der assemblierten und annotierten Fosmide (links). Die Farbcodierung zeigt die gefundenen Gen-
gruppen, welche über die Fosmide verteilt sind. Gelb codiert sind potentiell hydrolytisch aktive Enzyme, welche den Substratabbau in den
Assays bewirkt haben können (CAZymes)

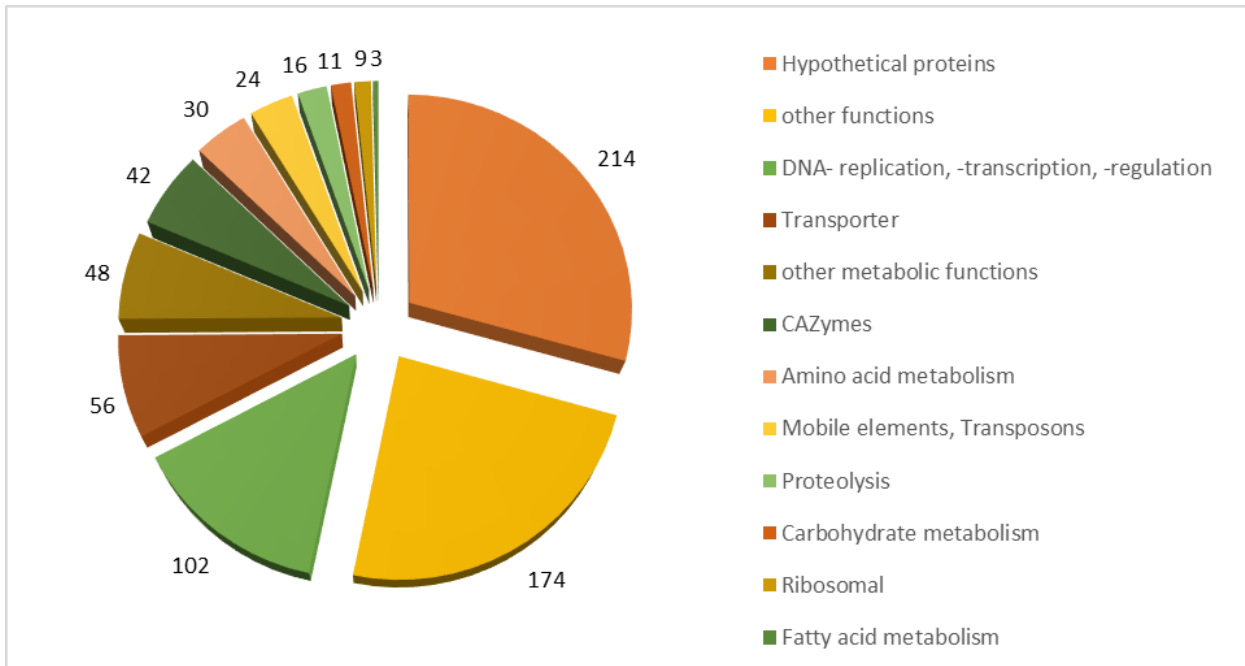


Abbildung 14: GO - Klassifizierung der RAST-annotierten *open reading frames* auf den sequenzierten Fosmiden der aktiven Klone. Neben den für Biomasse-abbauende Enzyme kodierenden Sequenzen wurden eine Vielzahl weiterer Gene erkannt, insgesamt 729, die wie oben beschrieben kategorisiert wurden.

Die gefundenen ORFs wurden mittels einer *Hidden Markov Model*-Suche nach CAZymes analysiert, wobei 11 weitere Kandidatengene identifiziert werden konnten. Insgesamt resultierte die Untersuchung in 53 potentiell hydrolytischen Kandidatengenen. In diesen Genen wurden insgesamt 111 Module erkannt: neben den katalytisch aktiven Glykosidhydrolase-Modulen finden sich auch Kohlenhydrat-Esterase- und Kohlenhydrat-Bindemodule, sowie Protein-Protein-Interaktionsmodule (Cohesine, Dockerine, **Tabelle 2**).

Etwa die Hälfte der ORFs enthielt eine Dockerin I-ähnliche Domäne, die der Interaktion mit Scaffoldin-ähnlichen Protein zur Rekrutierung in einen Cellulosom-ähnlichen Komplex dient. Dies lässt den Schluss zu, dass hochmolekulare extrazelluläre Proteinkomplexe in der *in sacco*-Gemeinschaft eine wichtige Rolle spielen. Die Blastp-Analyse der translatierten ORFs gab einen ersten Hinweis auf die taxonomische Klassifizierung und die möglichen Aktivitäten der Gene (**Tabelle 2**). Diese zeigten Homologien zwischen 38 und 83% zu hydrolytisch aktiven Proteinen, wie Xylanasen, Xylosidasen, Glukanasen und Arabinofuranosidasen.

Tabelle 3: Auf den sequenzierten Fosmiden fanden sich insgesamt 53 Gene, welche in den Aufbau von Biomasse direkt oder indirekt beteiligt sind. Bei einem Großteil der Enzyme finden sich neben den katalytischen Modulen auch Module, welche die Rekrutierung in einen Cellulosom-ähnlichen Multiproteinkomplex ermöglichen. Die gezeigten Proteine weisen nur geringe Ähnlichkeit zu bekannten Enzymen isolierter Bakterien auf und zeigen, dass das hydrolytische Potential für eine bioindustrielle Nutzung bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist und die weitere Erforschung der enzymatischen Systeme des Biomasseabbaus der Biogas-Community essentiell ist.

Fosmid	ORF #	Best Hit (blastp)	Homologie	Annotierte Proteinmodule (HMM)	Signal peptide (aa-aa)
1-C1	1	endoglucanase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	61%	GH48, dockerin I	1-32
	1	dockerin-like protein (<i>Clostridium</i> sp. BNL1100)	62%	CE6	1-32
1-C2	2	polysaccharide deacetylase (<i>Clostridium</i>) clariflavum)	67%	CE6	1-31
	3	1,4-beta-xylanase (<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3)	76%	GH11	
	4	glycoside hydrolase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	70%	GH9	
2-B12	1	alpha-glucuronidase (<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>)	61%	GH67, dockerin I	
	2	beta-xylosidase (<i>bacterium enrichment culture</i>)	99%	GH3, FN3- like	
	3	endo-1,4-xylanase (<i>bacterium enrichment culture</i>)	100%	GH10	1-25
	4	glycoside hydrolase family 43 (<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> 108)	64%	GH43, GH43	
	5	glycoside hydrolase family 43 (<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> 108)	64%	GH43	
3-A11	1	hypothetical protein (<i>Pseudobacteroides cellulosolvans</i>)	54%	dockerin I, CBM30, CBM4, CBM4, GH9	1-27
	2	hypothetical protein (<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3)	48%	cohesin	
	3	cellulosome anchor protein (<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3)	44%	cohesin, cohesin, cohesin, cohesin	
3-A7	1	endo-1,4-beta-xylanase (<i>Gracilibacillus lacisalsi</i>)	70%	GH11	
3-C1	1	endoglucanase (<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3)	72%	dockerin, GH5	1-27
	2	alpha-N-arabinofuranosidase (<i>Paenibacillus</i> sp. oral taxon 786)	80%	GH43	1-40
3-D12	1	hypothetical protein (<i>Clostridium straminisolvans</i>)	59%	CBM6, GH10, dockerin I	
3-F5	1	hypothetical protein (<i>Clostridium straminisolvans</i>)	59%	CBM6, GH10, dockerin I	
4-E5	1	endoglucanase (<i>Bacillus wakoensis</i>)	73%	GH5, CBM17	1-30
4-F4	1	hypothetical protein AA931_04805 (<i>Peptococcaceae bacterium</i> 1109)	68%	GT51	
	2	glycosyl transferase group 2 (<i>Dehalobacter</i> sp. UNSWDHB)	61%	GT2	
4-H6	1	dockerin-like protein (<i>Clostridium clariflavum</i>)	72%	CE6, dockerin I	
5-H6	1	beta-1,4-xylanase (<i>Clostridium clariflavum</i>)	55%	SLH, SLH, SLH	
	2	cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (<i>Clostridium straminisolvans</i> JCM 21531)	38%	dockerin I	
	3	carbohydrate-binding protein (<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3)	49%	dockerin I, CBM30, CBM4, CBM4, GH9	1-26

Fos- mid	ORF #	Best Hit (blastp)	Homologie	Annotierte Proteinmo- dule (HMM)	Signal peptide (aa-aa)
6-A9	1	glycoside hydrolase (<i>Clostridium clariflavum</i>)	61%	CBM44, GH44, dockerin I	1-26
	1	enterochelin esterase-like enzyme (<i>Clostridium clariflavum</i>)	63%	CE1	
	2	alpha-L-arabinofuranosidase (<i>Paenibacillus sp. OK076</i>)	69%	GH43, CBM6, CBM6, dockerin,	1-27
6-D5	3	alpha-N-arabinofuranosidase (<i>Lachnoclostridium phytofermentans</i>)	83%	GH43, CBM6	
	4	O-glycosyl hydrolase (<i>Clostridium clariflavum</i>)	47%	GH30, dockerin I	1-30
	5	beta-glucanase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	66%	GH16, dockerin I	1-22
		endoglucanase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	69%	GH5, dockerin I	1-47
6-D9	2	hypothetical protein AA931_04805 (<i>Peptococcaceae bacterium 1109</i>)	62%	GT51	
	1	alpha-xylosidase (<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>)	48%	PRK10658 (putative alpha- glucosidase)	
7-A11	2	Endo-1,4-beta-xylanase (<i>Pseudobacteroides cellulosolvens ATCC 35603</i>)	57%	GH11, CBM6, dockerin I, GH10	1-25
	3	endo-1,4-beta-xylanase Z (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	58%	CBM6, CE1, dockerin I	1-28
	4	glycoside hydrolase (<i>Caldicoprobacter oshimai</i>)	55%	GH9	
7-F2	1	endoglucanase (<i>Bacillus wakoensis</i>)	69%	GH5, CBM17, CBM17, dockerin I	1-30
	1	beta-glucosidase (<i>Pseudobacteroides cellulosolvens</i>)	69%	GH3, FN3- like	
8-E1	2	hypothetical protein (<i>Paenibacillus tyrfis</i>)	61%	GH5, CBM6, dockerin I	1-33
	1	glycoside hydrolase 43 family protein (<i>Herbinix luporum</i>)	63%	GH43	
8-F9	2	glycoside hydrolase 43 family protein (<i>Paenibacillus sp. FSL P4-0081</i>)	76%	GH43	
	1	hypothetical protein (<i>Clostridium sp. Bc-iso-3</i>)	48%	cohesin	
9-C9	2	cellulosome anchor protein (<i>Clostridium sp. Bc-iso-3</i>)	44%	cohesin, cohesin, cohesin, cohesin	
	1	1,4-beta-xylanase (<i>Bacillus sp. J37</i>)	54%	GH10	
10-B11	2	1,4-beta-xylanase (<i>Pedobacter sp. R20-19</i>)	43%	GH10	
	3	hypothetical protein (<i>Paenibacillus daejeonensis</i>)	58%	GH10	
	1	endoglucanase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	67%	CBM3, dockerin I, GH9	1-26
10-B12	2	endoglucanase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	69%	GH5, dockerin I	1-47
	1	alpha-L-arabinofuranosidase (<i>Clostridium sp. Bc-iso-3</i>)	41%	CBM42	1-22
10-B5	2	glycoside hydrolase (<i>Clostridium sp. Bc-iso-3</i>)	80%	CBM22, CBM22, CE1, dockerin I, GH10, CBM35	
	1	glycoside hydrolase (<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>)	69%	CBM35, GH26	1-32
10-E3	2	glycoside hydrolase (<i>Clostridium straminisolvens</i>)	69%	GH9, CBM3, dockerin I	

Eine Blastp-Analyse zeigte, dass nahezu alle kodierten Proteine die höchste Homologie zu Genomen des Phylums Firmicutes aufweisen. Viele Gene zeigten Homologie zu Genomen der Klasse *Clostridia* mit Mitgliedern der *Clostridiaceae* und *Ruminococcaceae* wie den bekannten Biomasse-Abbauern *Clostridium thermocellum* und *Clostridium clariflavum* als am häufigsten vertretene. Die zweitgrößte Gruppe zeigte Homologien zu Mitgliedern der Klasse *Bacilli* mit Genen aus *Paenibacillaceae*- und *Bacillaceae*-Spezies.

II.1.3 AP 4.3 - Beteiligung bei der Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse in Bezug auf (hemi-)cellulolytische Gene

Die DNA und RNA-Extraktion aus Gärresten der zweistufigen Fermenter wurde erfolgreich für die Metagenom- und Metatranskriptomsequenzierung optimiert und durchgeführt. Die Daten der Metagenom-Sequenzierung liegen vor, konnten aber bis zum Ende des Projektzeitraumes nicht mehr ausgewertet werden und sind zur Nutzung im weiteren Verwertungsplan vorgesehen. Sie bilden ein wichtiges Fundament für zukünftige weitere Forschungsvorhaben über die mikrobielle Hydrolysephase im Biogasreaktor.

Die Metagenomsequenzierung der *in sacco*-Anreicherung und der Fermenterschlammprouben des einstufigen thermophilen Fermenters wurde bei der Firma GATC Biotech durchgeführt und die Daten bioinformatisch an der Universität Bielefeld analysiert. Diese Daten bilden eine wichtige Grundlage für Folgeprojekte, wurden aber bis zum Ende des Projektzeitraumes noch nicht abschließend ausgewertet.

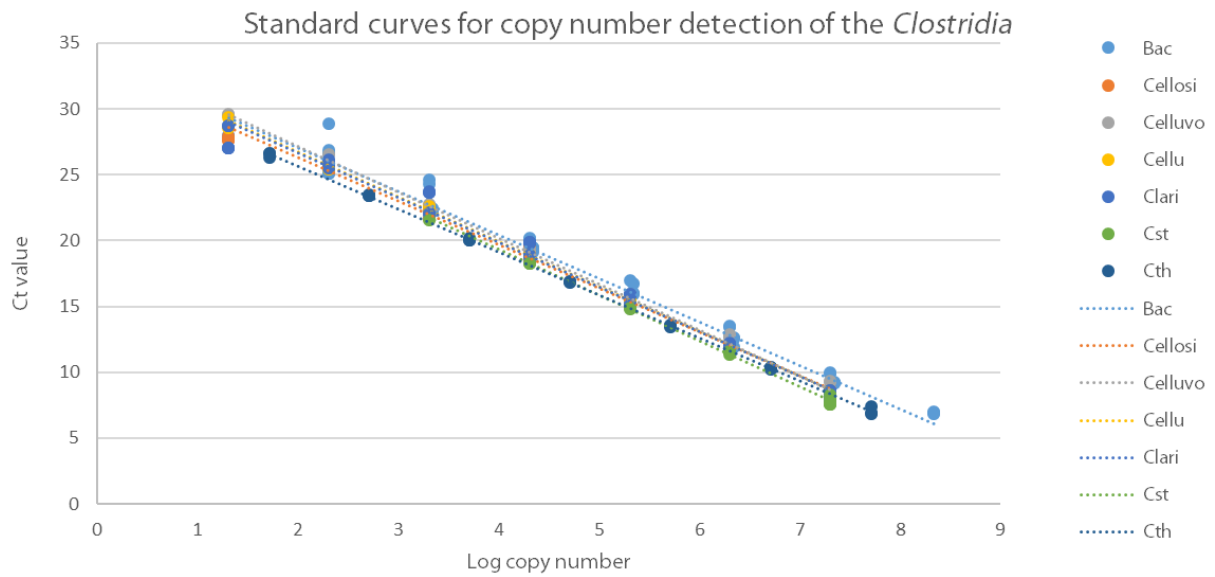
II.1.4 AP 5.3 - Etablierung der Assays auf Basis der quantitativen (realtime) PCR (qPCR) unter Verwendung von Markern für (hemi-)cellulolytische Aktivitäten und Anwendung auf das zweiphasige Reaktorsystem

Die (RT)-qPCR ist aufgrund ihrer extrem hohen Sensitivität und universellen Anwendbarkeit der *gold standard* zur Detektion von DNA-Zielmolekülen in Umweltproben. Im Arbeitspaket wurde untersucht, ob die gefundenen Spezies als Marker für einen Prozesszusammenbruch geeignet sind. Eine Markerspezies müsste entweder im gesunden oder im gestressten Zustand nachweisbar sein und so durch diesen verschwinden oder im Wachstum gefördert werden, so dass ein Unterschied im Vorkommen bzw. der Zellmenge klar nachweisbar ist. Zudem sollten diese möglichst ubiquitär vorkommende Spezies in Biogasanlagen sein, so dass die entwickelten Markersysteme einfach und universell in der Praxis angewendet werden können. Zur Bestimmung der Zelldichte und Detektion von Veränderungen in hydrolytischen Populationen wurden 11 qPCR-Assays entwickelt und verifiziert. Mit 6 Assays sollten die Umweltproben auf das Vorhandensein von Gruppen zuvor isolierter cellulolytischer Bakterien aus dem Genus der *Clostridien* untersucht werden, um ihre Rolle im Biomasseabbau zu verifizieren. Weitere 5 Assays hatten das Ziel, die Kopienzahl der dominanten taxonomischen Einheiten aus den *in sacco*-Assays zu bestimmen.

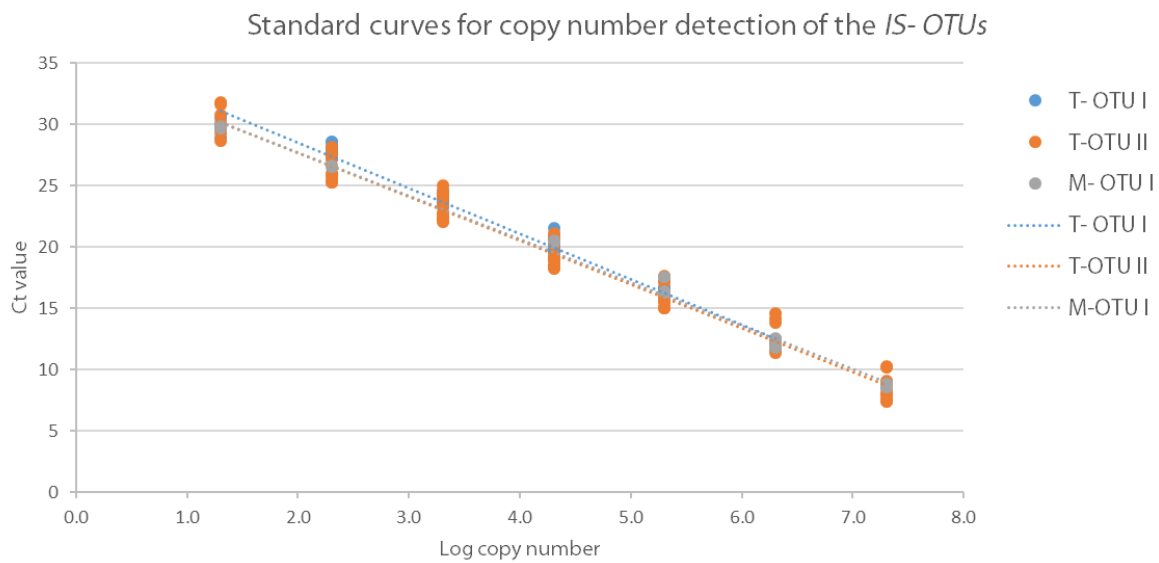
Tabelle 4: Übersicht der entwickelten qPCR- Assays mit Zielspezies, Isolaten und Länge des amplifizierten Fragmentes.

	Assay	Zielorganismus	Isolate aus dem Reaktor	Fragment in bp
Bekannte cellulolytische Spezies	CTH	<i>C. thermocellum</i>	X	274
	CST	<i>C. stercorarium</i>	X	261
	CLARI	<i>C. clariflavum</i>	X	280
	CELLU	<i>C. cellulolyticum</i>		277
	CELLUVO	<i>C. cellulovorans</i>		165
	CELLOSI	<i>C. cellulosi</i>	X	250
in sacco- OTUs	T-OTU I	<i>Halanaerobiaceae</i> (<i>H. cellulositytica</i>)- OTU		450
	T-OUT II	<i>Ruminococcaceae</i> (<i>C. thermocellum</i>)- OTU	X	260
	M-OTU I	<i>Erysipelotrichaceae</i> (<i>E. tortuosum</i>)- OTU		310
	M-OTU II	<i>Acholeplasmataceae</i> (<i>Mycoplasma feliminutum</i>)- OTU		217
	M-OTU IV	<i>Caldicoprobacteraceae</i> (<i>Acetomicrobium faecale</i>)- OTU		227

Die Primer wurden durch Sequenz-Alignment in variablen Bereichen des 16S-rRNA-Gens gesetzt und mittels TestPrime und Blastn *in silico* auf ihre Spezifität getestet. Danach wurden mittels qPCR Spezifitätstest durchgeführt und die Assaybedingungen (Annealing-Temperatur, Primerkonzentration etc.) optimiert. Die Effizienz der optimierten Assays zu bestimmen, welche besonders durch die Eigenschaften der Primer, aber auch durch die gewählten Reaktionsparameter beeinflusst wird, wurden Standardgeraden gemessen (**Abbildung 15, Tabelle 4**).



A



B

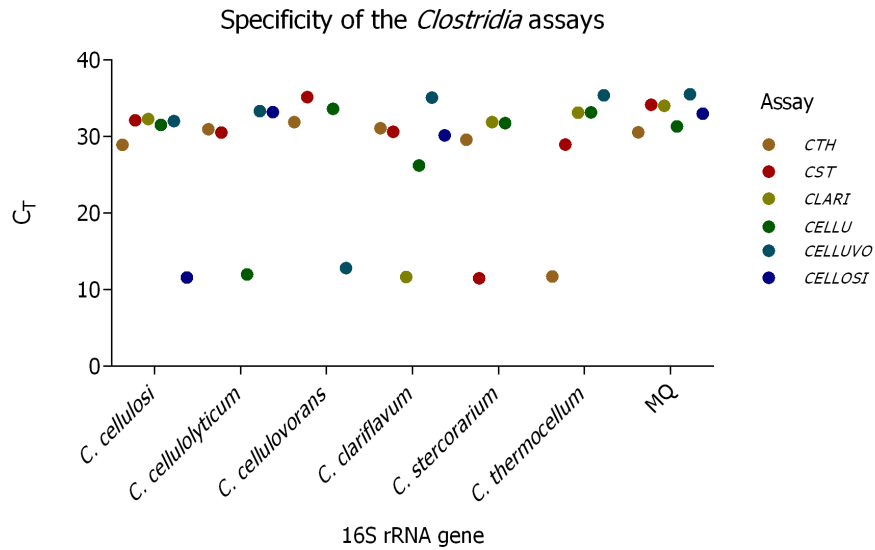
Abbildung 15: Übersicht über die zur Quantifizierung der Spezies in den Fermentern verwendeten Standardkurven. Die Abbildungen zeigen die Standardkurven der Assays zur Detektion der bekannten cellulolytischen Clostridien (A) und der *in sacco* OTUs (B). Ein idealer Assay besitzt in der Standardkurve einen y-intercept-Wert zwischen C_T und 32 und 38 sowie eine Assayeffizienz zwischen 90% und 100% mit einem R^2 größer 0.98.

Tabelle 5: Zusammenfassung der wichtigsten Kenngrößen für die entwickelten qPCR- Assays.

<i>Assay</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²	<i>Effizienz (in %)</i>	<i>Dynamic range (Kopien/Reaktion)</i>
<i>BAC</i>	-3.31	33.6	0.98	100.7	2.02E+01 - 2.18E+08
<i>CTH</i>	-3.32	33.0	0.99	100.1	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>CST</i>	-3.48	34.1	0.99	93.8	2.02E+03 - 2.02E+07
<i>CLARI</i>	-3.41	33.5	1.00	96.6	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>CELLULO</i>	-3.39	33.4	0.99	97.2	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>CELLUVO</i>	-3.47	33.2	1.00	94.1	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>CELLOSI</i>	-3.26	32.2	1.00	102.9	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>T-OTU I</i>	-3.67	35.8	0.99	87.2	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>T-OTU II</i>	-3.58	34.9	0.98	90.3	2.02E+01 - 2.02E+07
<i>M-OTU I</i>	-3.55	34.8	0.99	91.4	2.02E+01 - 2.02E+07

Als essentieller Teil der Assay-Etablierung wurden in qPCR-Messungen die Spezifität der Primersysteme getestet. Dies geschah durch die Verwendung aller sechs 16S rRNA-Gene in Reaktionen mit allen sechs Primerpaaren. Wie in **Abbildung 16** sichtbar, fand eine DNA-Amplifizierung und somit ein schnelles Anwachsen der Signalintensität nur in den Reaktionen statt, in denen ein Primersystem mit dem Template verwendet wurde, das die Zielsequenzen beinhaltet.

A



B

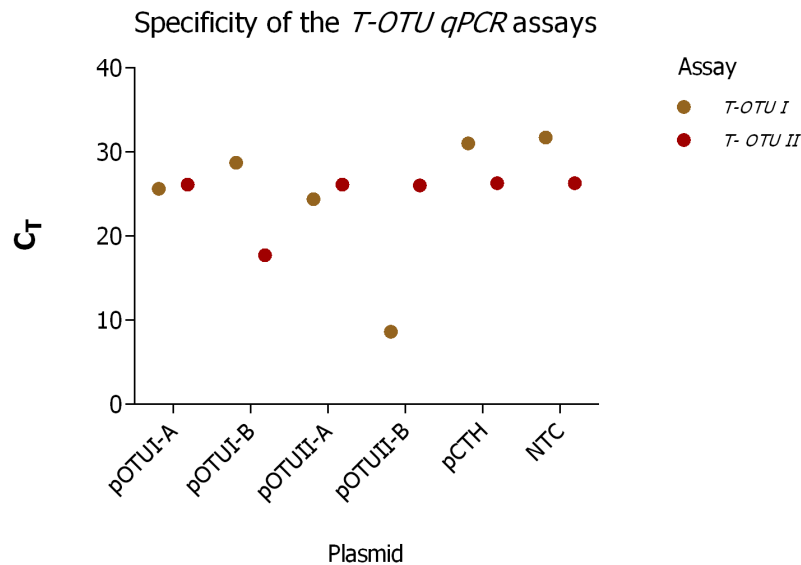


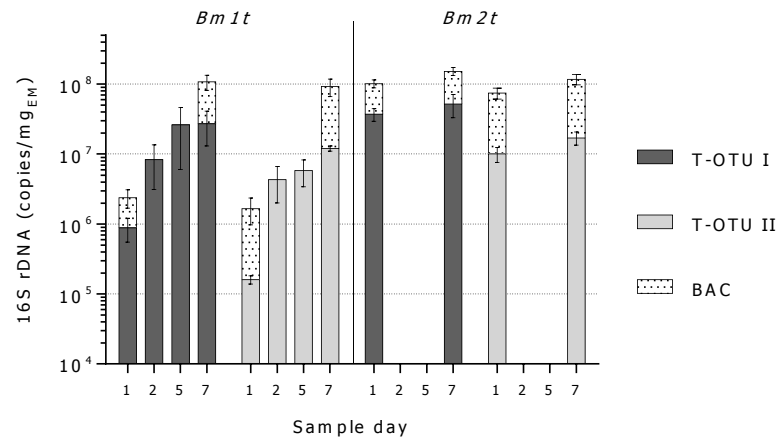
Abbildung 16: qPCR- Spezifitätskontrolle der Clostridien- und in sacco OTU Assaysysteme. Für die Spezifitätstests wurden Plasmide, die das gesamte 1,5 kb-16S-rDNA-Gen der jeweiligen Clostridia oder *in sacco*-OTU enthielten, in gleichen Konzentrationen verwendet (alle Clostridia- und T-OTU-I-Assays: 2×10^7 Kopien / Reaktion und die T-OTU II -Assays: 2×10^4 Kopien / Reaktion). Jeder Assay wurde mit den verfügbaren Negativkontrollen getestet und der C_T -Wert der als Determinante der Spezifität gemessen. **Abbildung 16 A** zeigt, dass eine Amplifikation mit daraus resultierenden raschen Fluoreszenzanstieg und niedrigem C_T -Wert nur in den Reaktionen mit dem jeweiligen Ziel-16S rDNA-Gen stattfand. Die Plasmide mit 16S-rDNA-Inserts von eng verwandten Spezies führten zu C_T -Werten nahe der *no template control* (NTC). Dies war auch in den *in sacco* qPCR-Assays, in **Abbildung 16 B** gezeigt, zu beobachten: Jeder Primer-Satz wurde an zwei oder mehr Plasmiden mit den jeweiligen OTU- und Outgroup-16S rDNA-Inserts getestet. Exemplarisch sind hier die Daten der in den thermophilen Anreicherungen identifizierten taxonomischen Gruppe aufgezeigt. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde für alle qPCR-Messungen durchgeführt, um Primerdimer-Bildung oder unerwünschte Nebenprodukte in der PCR-Reaktion auszuschließen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von 2-3 Replikaten.

In der 16S rRNA-PCR-Amplifizierung werden Spezies, die in der analysierten Gemeinschaft unterrepräsentiert sind, mit jedem Amplifikationsschritt sukzessive aus dem resultierenden Amplikongemisch verdünnt. Dies verzerrt das Bild der Gemeinschaft und schließt diese aus der finalen Bibliothek aus. Auch die Bibliotheken der *in sacco* Gemeinschaften wurden höchstwahrscheinlich durch diesen Effekt verfälscht. Da interessanterweise isolierte cellulolytische Bakterien vollkommen abwesend waren, wurden die *in sacco*-DNA-Extrakte mit den zuvor entwickelten, deutlich sensibleren *Clostridien*-qPCR-Assays analysiert.

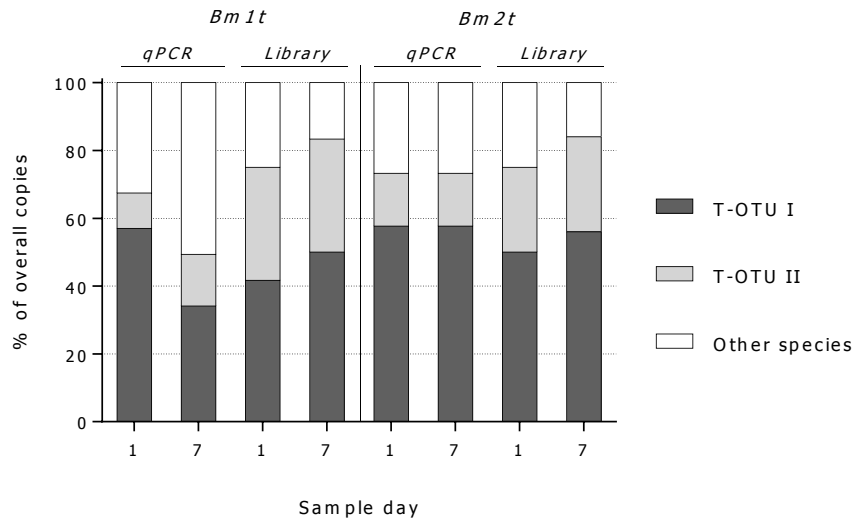
Interessanterweise konnten die meisten bereits bekannten Spezies nicht in den Proben nachgewiesen werden. Nur das thermophile *Clostridium clariflavum* wurde in niedrigen Kopiezahlen in der Bm2t-Gemeinschaft nach sieben Tagen Anreicherung detektiert. Um die Befunde der *in sacco*-16S-rDNA-Gen-Bibliotheken zu bestätigen, wurden die ausgewählten OTUs in den *in sacco*-DNA-Extrakten der mesophilen und thermophilen Anreicherung quantifiziert (**Abbildung 17**).

Nach einem Tag Inkubation wurden in den Bm1t- und Bm2t-Reaktoren je ca. 9×10^5 und 1×10^7 Kopien der T-OTU I pro Milligramm Whatman-Papier detektiert, wobei diese Zahl bis zum Tag 7 auf 3×10^7 (Bm1t) und 2×10^7 (Bm2t) anwuchs. Auch für die T-OTU II war eine deutliche Zunahme der Kopienzahl zu erkennen. Dies spricht für eine zunehmende Besiedlung der Probe durch die beiden taxonomischen Gruppen. Die Kopienzahl für die T-OTUs I (*Halanaerobiaceae*, **Tabelle 4**) und II (*Ruminococcaceae*) stieg z.B. in der Bm1t-Probe kontinuierlich von Tag 1 zu Tag 7 um das 31- bzw. 76-fache auf Endwerte von 4×10^7 und 2×10^7 . In dem biologischen Replikat Bm2t hat sich die Kopienzahl nur vom ersten bis zum siebten Tag verdoppelt, wobei die Kopienzahl der am siebten Versuchstages genommenen Probe für die beiden OTUs sich unter den biologischen Replikaten nur geringfügig unterscheiden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Amplikon-Bibliothek und unterstreicht die starke Präsenz der beiden taxonomischen Gruppen in der Anreicherung, besonders, da sich die biologischen Replikate kaum unterscheiden.

A



B



C

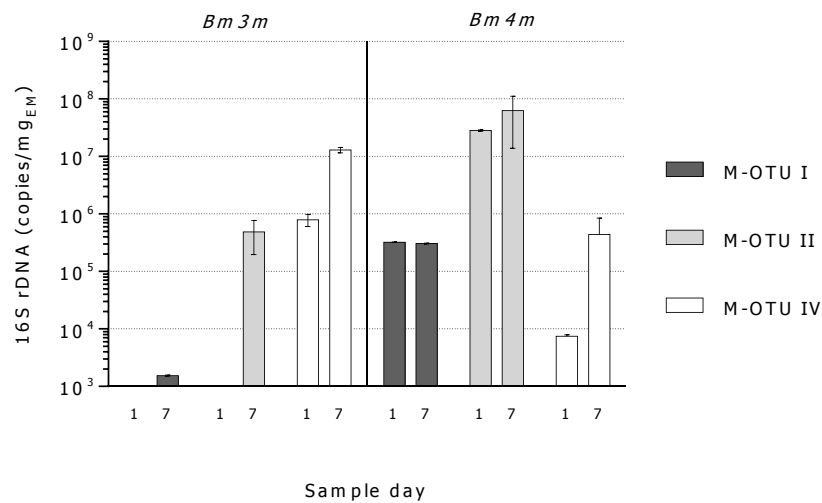


Abbildung 17: Mit den qPCR-Assays wurden die dominanten taxonomische Gruppen der mesophilen und thermophilen *in sacco*-Experimente mit den spezifischen Assays in den *in sacco*-Proben quantifiziert werden (siehe **Tabelle 3**). In **Abbildung 17 A** sind die detektierten Kopie-

zahlen der thermophilen *in sacco* OTUs (OTU I und II) sowie die Kopienzahl bakterieller 16S rRNA-Gene (BAC) in den *in sacco*-DNA-Extrakten gezeigt. Eine Zunahme und damit eine Anreicherung der Spezies von der Tag-1-Probe bis zur Tag-7-Probe ist bei beiden OTUs in den Proben zu erkennen. Besonders in der Probe des Bm1t-Reaktors ist eine lokale Anreicherung der beiden OTUs zu erkennen. **Abbildung 17 B** zeigt eine Gegenüberstellung der Anteile der T-OTUs in den angereicherten *in sacco* Gemeinschaften. Verglichen sind hier die unterschiedlichen Daten der beiden Experimente, der qPCR und der Plasmid-Bibliotheken-Sequenzierung. Zwar variiert der gemessene Anteil der Spezies in der Gemeinschaft bei den unterschiedlichen Untersuchungen, jedoch stellen sie in beiden Fällen den Großteil der bakteriellen Spezies. Auch die mesophilen taxonomischen Gruppen waren in den angereicherten Gemeinschaften mit zunehmender Verweildauer im Fermenter in steigender Anzahl nachweisbar (C).

Die mesophilen OTUs zeigten eine stärkere Variabilität in den Extrakten: Die M-OTU I wurde im Bm3m-Fermenter nur am Versuchstag 7 nachgewiesen, während sie im Bm4m-Reaktor in beiden Proben detektierbar war. Die M-OTU II verhielt sich ähnlich: In Bm3m-Probe war sie nur am Versuchstag 7 nachzuweisen, hier jedoch mit einer Kopienzahl von ca 3×10^6 Kopien pro mg Probenmaterial. Im biologischen Replikat Bm4m lag die Kopienzahl schon am ersten Versuchstag deutlich höher und stieg nach der 7-tägigen Inkubation um das 3fache. Bei der M-OTU IV war in beiden biologischen Replikaten eine deutliche Anreicherung im Laufe des Experiments sichtbar, jedoch unterschieden sich die Kopiezahlen um mehrere Größenordnungen.

Auch in den Gärresten der Hydrolysereaktoren der zweistufigen Fermenter, welche mit dem gleichen Inokulum gestartet und mit dem gleichen Grassilage-Substrat gefüttert wurden wie die CSTRs, sind die T-OTUs nachweisbar. Interessanterweise sind die Bakteriengruppen auch in zwei thermophilen Labor-CSTRs mit gleichem Initial-Inokulum aber Maissilage-Fütterung (D, C1 und C2) sowie einer zweistufigen Produktionsanlage ohne aktive Inokulation mit einer optimierten Mikrobengemeinschaft detektierbar (D, Viersen, siehe Text). Die mesophilen OTUs II (Acholeplasmataceae) und IV (Caldicoprobacteraceae) sind in den beiden CSTRs Bm3m und Bm4m nachweisbar. Quantitativ war nur ein geringer Unterschied zwischen den beiden Fermenterzuständen zu erkennen, auch die Variation zwischen den Fermentern war bei der OTU IV gering. Von der OTU II hingegen war im mesophilen Fermenter Bm4m eine 4-mal höhere Konzentration zu bestimmen als im biologischen Replikat Bm3m.

Da es sich bei der Anreicherung nur um einen Auszug der Gemeinschaft im Fermenter handelt, wurden die *Clostridien*- und -OTUs auch in Fermenterschlammextrakten nachgewiesen. Die Zielspezies wurden daher in DNA-Extrakten aus einem stabilen und einem gestressten Fermenterzustand quantifiziert, um deren Reaktion auf eine erhöhte Belastung durch den Zusammenbruch der Methanogenese mit folgender Anreicherung von organischen Säuren und Ammoniak zu untersuchen. Nur das stark hemicellulolytische *Clostridium stercorarium* wurde in den thermophilen Bm1t und Bm2t Reaktor-Proben nachgewiesen, dies jedoch sowohl im stabilen als auch im gestressten Fermenterzustand.

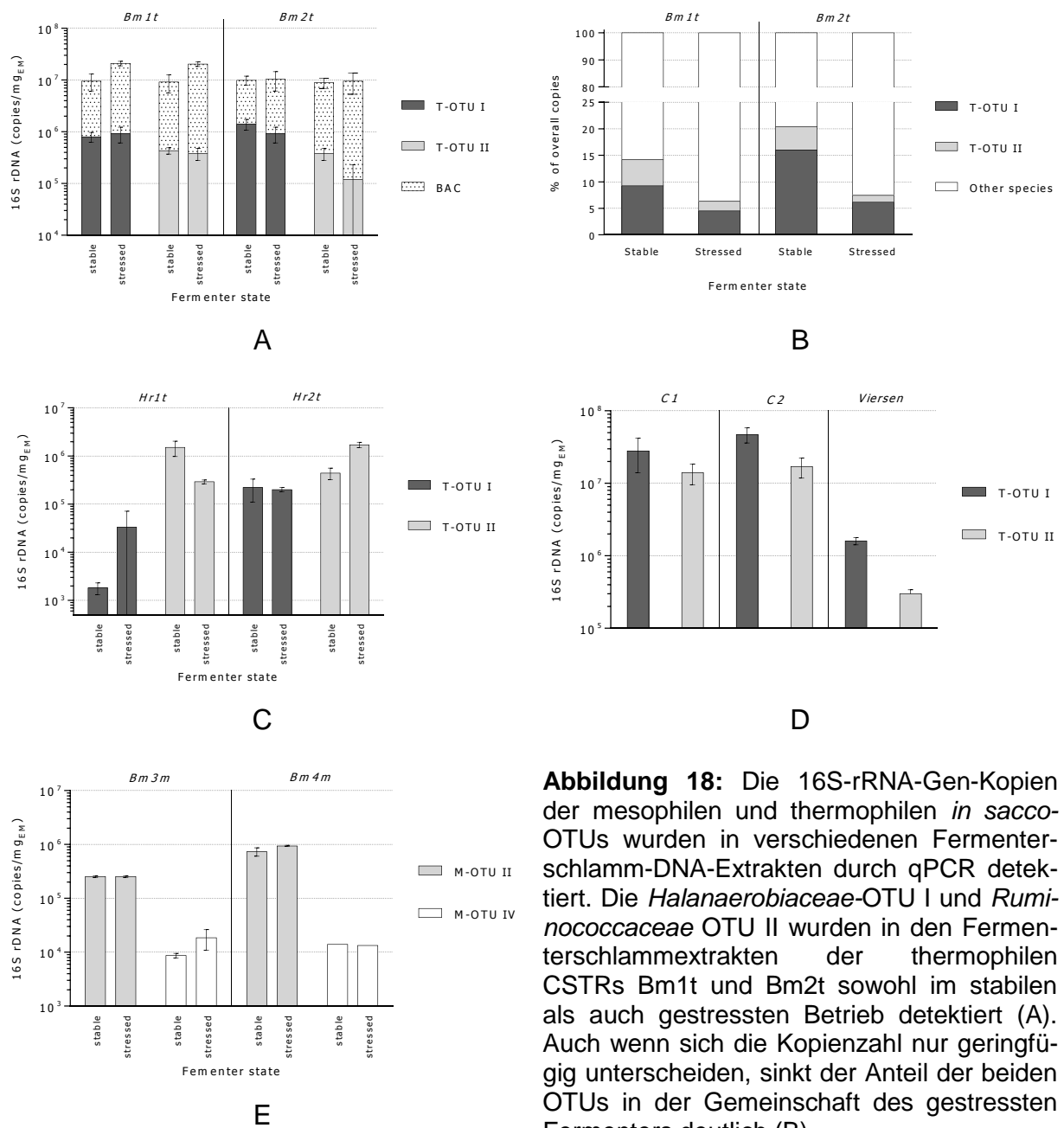


Abbildung 18: Die 16S-rRNA-Gen-Kopien der mesophilen und thermophilen *in sacco*-OTUs wurden in verschiedenen FermenterschlammdNA-Extrakten durch qPCR detektiert. Die *Halanaerobiaceae*-OTU I und *Ruminococcaceae* OTU II wurden in den Fermenterschlammeextrakten der thermophilen CSTRs Bm1t und Bm2t sowohl im stabilen als auch gestressten Betrieb detektiert (A). Auch wenn sich die Kopienzahl nur geringfügig unterscheiden, sinkt der Anteil der beiden OTUs in der Gemeinschaft des gestressten Fermenters deutlich (B).

Mit einer Ausnahme waren hingegen die auf kristalliner Cellulose angereicherten Haupttaxa in den Fermenterschlammeextrakten der CSTRs vertreten. In den thermophilen Fermenten wurden dabei in den Extrakten Kopienzahlen der T-OTUs gemessen, die in der Größenordnung denen des ersten Versuchstages der *in sacco*-Versuche entsprechen (**Abbildung 18**). Die Proben des gestressten Fermenterzustandes zeigte nur eine geringfügig niedrigere Kopienzahl, die Auswirkungen der veränderten Bedingungen im Biotop schienen nur geringen Einfluss auf das Vorhandensein der thermophilen OTUs zu haben (**Abbildung 18 B**). Die angereicherten Spezies scheinen robust im Fermenter etabliert zu sein und nicht, wie z.B. die methanogene Archaeen-Community sehr stark auf Prozessveränderungen zu reagieren.

Auch in weiteren einstufigen Anlagen mit gleichem Inokulum, aber einer Maissilage/Rindergülle-Fütterung, konnten beide thermophilen OTU nachgewiesen werden. Zusätzlich waren beide Gruppen in Extrakten der vom Biogas-Core-Projekt beprobten thermophilen Fermenter der Firma 4Biogas NOVA-Fermenter in Viersen nachweisbar, welche nicht das Startinokulum der LfL verwendeten. Es ist also möglich, dass die gefundenen OTUs sehr stark in Biogasanlagen verbreitet sind. Sicherheit würden hier qPCR-Analysen weiterer Fermenter und eine tiefere Auswertung der im Zuge des Projektes generierten Metagenom- und Metatranskriptom-Daten geben.

Für die M-OTU IV wurde in beiden mesophilen Reaktoren ähnliche Kopiezahlen quantifiziert. Sie konnte in beiden Prozesszuständen nachgewiesen werden, im gestressten Fermenter war sogar eine leicht erhöhte Zellzahl auszumachen. Die M-OTU II wurde in den stabilen Bm3m- und Bm4m-Reaktoren nachgewiesen, der gestresste Zustand führte jedoch zu einem Verschwinden der M-OTU II im Bm3m-Reaktor, im Bm4m-Reaktor fand keine signifikante Änderung statt. Im Gegensatz dazu konnte die M-OTU I der mesophilen Bibliotheken nicht in den Fermenterschlammeextrakten nachgewiesen werden.

Die hier untersuchten Bakterien sind mit der derzeitigen Analytik jedoch nicht als Markerspezies für einen Prozesszusammenbruch geeignet.

Keine der detektierten Spezies konnte jedoch klar als Markerspezies identifiziert werden, dafür waren die Abweichungen zwischen den Prozesszuständen zu gering und/oder die Ergebnisse zwischen den biologischen Fermentern nicht kohärent. Zudem wurden die meisten untersuchten Fermenter mit dem gleichen Inokulum und somit der gleichen Mikrobengemeinschaft gestartet, so dass man die Universalität der als Marker verwendeten Bakterien weiter überprüfen muss. Allerdings konnte die hydrolytischen Eigenschaften der thermophilen Gemeinschaft durch die hohe Inzidenz hemicellulolytischer Gene im Fosmid-Screening unterlegt werden, was eine weitere Untersuchung dieser Bakteriengruppen imperativ erscheinen lässt.

II.2 Verwertung

- *der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans*
- *Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende bzw. Aussichten für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse*
- *wirtschaftliche Erfolgsaussichten*

Die Identifizierung der wichtigsten Akteure für den Celluloseabbau im Biogasfermenter wird durch das begrenzte Wissen über echt cellulolytische („truly cellulolytic“) Bakterien beschränkt. Einige wichtige Cellulose abbauenden Bakterien in der Natur scheinen immer noch unentdeckt, insbesondere in Biogasfermentern. Die Anwendung von kulturunabhängigen Methoden zu Analyse der cellulolytischen Gemeinschaft resultierte in wichtigen Erkenntnissen über die cellulolytische Bakterien der Hydrolysephase der be-

proben Biogasreaktoren. In neuartigen *in vivo*-Anreicherungsversuchen in den thermophilen Fermentern wurden zuvor unbekannte Bakterien, nah verwandt mit *Clostridium thermocellum* und *Halocella cellulositytica*, mit vermutlich stark hydrolytischen Eigenschaften erkannt und taxonomisch charakterisiert. Sie konnten im Fermenterschlamm nachgewiesen werden, was ein weiteres Indiz für ihre besondere Anpassung an die Bedingungen im Fermenter ist. Diese begründet sich u.a. auf hocheffizienten Enzymsystemen, so dass in einem funktionellen Screening einzelne hydrolytische Enzyme der Gemeinschaft identifiziert wurden. Diese Informationen wurden mit den Ergebnissen einer Fosmid-Sequenzierung ergänzt, um direkte Aussagen über die vorhandenen Gene treffen zu können.

Alle gefundenen Gene sind zuvor unbekannte Enzyme, welche durch ihren thermophilen Ursprung und teilweise hohe Temperaturstabilität Anwendung in industriellen Biomasseabbauprozessen finden könnten.

Die Metagenomsequenzierung der *in sacco*-Proben stellt einen weiteren wichtigen Schritt zur Charakterisierung dieser nicht isolierbaren Bakterien dar und dient als Grundlage, ihr Vorkommen und ihre hydrolytischen Eigenschaften weiter zu untersuchen. Zudem würde die genauere Untersuchung ihrer Eigenschaften eine Grundlage für die Entwicklung neuer Isolierungsstrategien zur Gewinnung von Reinkulturen der dominantesten Vertreter. Solche Stämme mit hohem cellulolytischen Potential scheinen sehr gut an die Bedingungen in Biogasanlagen angepasst zu sein und könnten z.B. als gezieltes Inokulum in Biogas-Fermentern zum Einsatz kommen, um den Biomasseabbau zu verbessern. Vorangegangene Untersuchungen belegen, dass durch gezielte Inokulation mit einem besonders effizient hydrolysierenden Bakterienstamm die Abbaurate und der Biogasertrag verbessert werden können (KÖLLMEIER 2013). Um das Inokulum optimal zu etablieren und so die Biogausausbeute zu erhöhen, ist allerdings eine kontinuierliche Bakterienzugabe der einmaligen Inokulation vorzuziehen (SCHMACK & REUTER 2010). Das Wissen um die Schlüsselorganismen wird auch dazu beitragen, die optimalen Bedingungen für die Substrathydrolyse zu definieren und die optimale Bakterienkultur zur Inokulation von Biogasfermentern zu ermitteln, mit dem Ziel einer besseren Substratverwertung und einer höheren Raumzeitausbeute. Eine weitere Anwendung der *in sacco*-Anreicherung in Kombination von qPCR und *deep sequencing* Metagenomics/Metatranscriptomics ist ein vielversprechender Ansatz, welcher parallel zur Isolierung hydrolytischer Bakterien weiter betrieben wird. Wichtige Ergebnisse dieses Teilprojektes werden in themenverwandten anderen Projekten (wie MODISTO, oder ValorPlus) dieses Lehrstuhls oder anderer Projektpartner weiterverarbeitet und finden dort Anwendung in anderen Gebieten der Biomassenutzung. Der wissenschaftliche Austausch mit den Projektpartnern wird weiterbestehen und in naher Zukunft werden auch noch weitere gemeinsame Publikationen verfertigt werden. So ist eine gemeinsame Publikation über die zusammengefassten Ergebnisse der Analyse der zweistufigen Projektfermenter in Vorbereitung.

II.3 Erkenntnisse von Dritten

- während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Yu Xia, Yubo Wang, Herbert HP Fang, Tao Jin, Huanzi Zhong & Tong Zhang. Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. *Scientific Reports* 4 (2014) 4:6708.

Campanaro S, Treu L, Kougias PG, De Francisci D, Valle G, Angelidaki I (2016): Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 26.

Dollhofer V, Callaghan TM, Dorn-In S, Bauer J, Lebuhn M (2016): Development of three specific PCR-based tools to determine quantity, cellulolytic transcriptional activity and phylogeny of anaerobic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 28–40.

Güllert S, Fischer MA, Turaev D, Noebauer B, Ilmberger N, Wemheuer B, ... Streit WR (2016): Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1),

Maruthamuthu M, Jiménez DJ, Stevens P, van Elsas JD (2016): A multi-substrate approach for functional metagenomics-based screening for (hemi)cellulases in two wheat straw-degrading microbial consortia unveils novel thermoalkaliphilic enzymes. *BMC Genomics*, 17(1), 86.

II.4 Veröffentlichungen

Aus diesem Projekt sind folgende Publikationen und Vorträge hervorgegangen:

Koeck DE, Pechtl A, Zverlov VV, Schwarz WH *Genomics of cellulolytic bacteria*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29, 171–183 (2014).

Pechtl A, Koeck DE, Zverlov VV, Schwarz WH *Characterization of the cellulolytic bacterial community in mesophilic and thermophilic biogas fermenters*. Poster-Präsentation auf der Jahrestagung 2016 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)

Lebuhn M, Derenkó J, Rademacher A, Helbig S, Munk B, Pechtl A, ... Klocke M (2016): *DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison*. *Bioengineering*, 3(1), 7.

In Planung sind weiterhin:

Pechtl A, Koeck DE, Zverlov VV, Schwarz WH *Characterization of the cellulolytic community enriched in a grass-silage digesting thermophilic biogas plant*.

Konferenzbeiträge

Pechtl A, Koeck DE, Zverlov VV, Schwarz WH Characterization of the cellulolytic bacterial community in mesophilic and thermophilic biogas fermenters. Poster-Präsentation auf der Jahrestagung 2016 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)

II.5 Referenzen

- ANTONI D, ZVERLOV VV, SCHWARZ WH (2007):** Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 23-35.
- BAUER C, KORTHALS M, GRONAUER A, LEBUHN M (2008):** Methanogens in biogas production from renewable resources--a novel molecular population analysis approach. *Water science and Technology* 58: 1433-1439.
- CIRNE DG, LEHTOMAKI A, BJORNSSON L, BLACKALL LL (2007):** Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology* 103: 516-527.
- EDER B, SCHULZ H (2007):** *Biogas Praxis; Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit.* Staufen: Freiburg.
- FNR (2013):** Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.: Gülzow-Prüzen.
- GÖRISCH U, HELM M (2006):** *Biogasanlagen:* Stuttgart.
- KAZAMIA E, SMITH AG (2014):** Assessing the environmental sustainability of biofuels. *Trends in Plant Science* 19: 615-618.
- KOECK DE, PECHTL A, ZVERLOV VV, SCHWARZ WH (2014):** Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* 29: 171-183.
- KÖLLMEIER T (2013):** Analyse spezialisierter Bakteriengemeinschaften und deren cellulolytische Hauptvertreter für die Hydrolyse in thermophilen Biogasanlagen. PhD thesis, Technische Universität München, München.
- KRAUSE L, DIAZ NN, EDWARDS RA, GARTEMANN K-H, KRÖMEKE H, NEUWGER H et al. (2008):** Taxonomic composition and gene content of a methane producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotech.* 136: 91-101.
- LEBUHN M, EFFENBERGER, GRONAUER A, WILDERER PA, WÜRTZ S (2003):** Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Science and Technology* 48: 97-103.
- MUNK B, BAUER C, GRONAUER A, LEBUHN M (2010):** Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng. Life Sci.* 10: 496-508.
- RADEMACHER A, ZAKRZEWSKI M, SCHLUTER A, SCHONBERG M, SZCZEPANOWSKI R, GOESMANN A et al. (2012):** Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 785-799.
- SCHLUETER A, BEKEL T, DIAZ NN, DONDRUP M, EICHENLAUB R, GARTEMANN KH et al. (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136: 77-90.
- SCHMACK D, REUTER M (2010):** Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität der Biogasprozesses.

- STAMS AJM, VAN DIJK JB, DIJKEMA C, PLUGGE CM (1993):** Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1114-1119.
- WEILAND P (2006):** Biomass Digestion in Agriculture: A Successful Pathway for the Energy Production and Waste Treatment in Germany. *Eng. Life Sci.* 6: 302-309.
- WENZEL W (2002):** Mikrobiologische Charakterisierung eines Anaerobreaktors zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe. PhD thesis, Technische Universität Berlin, Berlin.
- WIETSCHEL M, ARENS M, DÖTSCH C, HERKEL S, KREWITT W, MARKEWITZ P *et al.* (2010):** Energietechnologien 2050. Politikbericht. Fraunhofer Verlag: Stuttgart.
- ZAKRZEWSKI M, BEKEL T, ANDER C, PUHLER A, RUPP O, STOYE J *et al.* (2013):** MetaSAMS--a novel software platform for taxonomic classification, functional annotation and comparative analysis of metagenome datasets. *Journal of Biotechnology* 167: 156-165.
- ZIGANSHIN AM, LIEBETRAU J, PROTER J, KLEINSTEUBER S (2013):** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 5161-5174.

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

- Thema:** **Bioindikatoren der Biogasfermentation**
Teilprojekt 4: Charakterisierung des Biogas-Transkriptoms
- Förderkennzeichen:** 03SF0440C
- Zuwendungsempfänger:** Universität Bielefeld
Centrum für Biotechnologie – CeBiTec
Institut für Genomforschung und Systembiologie
Universitätsstraße 27
33615 Bielefeld
- Berichtverfasser:** Prof. Dr. Alfred Pühler
Dr. Andreas Schlüter
Yvonne Stolze
Irena Maus
- Kontakt:** Dr. Andreas Schlüter
Prof. Dr. Alfred Pühler
Tel.: 0521/106-8757 bzw. 0521/106-8750
Email: aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de,
puehler@cebitec.uni-bielefeld.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	196
1 Aufgabenstellung	197
1.1 Aufgabe des Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)	197
2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	197
2.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	197
2.1.1 DNA- und RNA-Isolierung aus Fermentationsproben, rRNA Abreicherung und Metagenom- und Metatranskriptomsequenzierung.....	197
2.1.2 Bioinformatische Aufbereitung der Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzdaten.....	202
2.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand	204
2.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	205
3 Eingehende Darstellung der Projektergebnisse	206
3.1 Optimierung der RNA-Isolierung aus Fermenterproben	206
3.1.1 Anpassung der DNA- und RNA-Isolierung für Fermenterproben aus Produktions- und Technikumsanlagen	206
3.1.2 DNA- und RNA-Isolierung aus Praxisanlagen	207
3.1.3 DNA und RNA Isolierung aus Technikumsanlagen	209
3.2 Abreicherung ribosomaler RNAs aus Gesamt-RNA Präparationen	210
3.2.1 Analyse korrespondierender Metagenome und Metatranskriptome ohne vorherige rRNA Abreicherung.....	210
3.2.2 Erfolgreiche rRNA Abreicherung aus Gesamt-RNA für Technikumsanlagen und anschließende Metatranskriptomsequenzierung	212
3.3 Bioinformatische Aufarbeitung und Charakterisierung der mRNA Se214sequenzen.....	214
3.3.1 Bioinformatik einer integrativen Metatranskriptom/Metagenom Analyse	214
3.3.2 Bioinformatik für die Analyse von Metagenom-Sequenzdaten aus vier Biogas-Praxisanlagen	221
3.3.3 Genom-zentrierte Metatranskriptom-Analyse	224
3.3.4 Bioinformatische Metagenom- und Metatranskriptom-Auswertung mittels des Elastic Metagenome Browsers EMGB	230

3.4	Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus Technikums- und Praxisanlagen	235
3.4.1	Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus vier Praxisanlagen	235
3.4.2	Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus Technikumsanlagen	236
4	Fazit zu Teilprojekt 4	246
4.1	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	247
4.2	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleitete Arbeit	247
4.3	Nutzen und Verfügbarkeit der Ergebnisse	247
4.4	Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	248
4.5	Geplante Veröffentlichungen der erzielten Ergebnisse.....	249
4.6	Präsentation der Ergebnisse in der Öffentlichkeit.....	249
I	Referenzen	251
II	Anhang	254

Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
ATB	Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e. V.
Beuth HS	Beuth Hochschule für Technik Berlin
BGA	Biogasanlage
Bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DOE JGI	Joint Genome Institute, United States Department of Energy
LfL	Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
qPCR	Quantitative Realtime-PCR ("Echtzeit"-PCR)
max.	Maximal
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
TP	Teilprojekt
TS	Trockensubstanz
TUM	Technische Universität München
z.B.	Zum Beispiel

1 Aufgabenstellung

1.1 Aufgabe des Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)

Im Rahmen des Verbundvorhabens 'Bioindikatoren der Biogasfermentation (BIOGAS-MARKER)' arbeitet das CeBiTec im Teilprojekt 4 (TP4) an der Charakterisierung des Biogas Transkriptoms in Praxis- und Technikumsanlagen. Die insgesamt vier Arbeitspakete (APs) beinhalten die Optimierung der DNA- und RNA-Isolierung aus Biogas-Fermentationsproben, sowie die Etablierung der Abreicherung ribosomaler RNAs aus Gesamt-RNA Präparationen und Erzeugung von sequenzierbaren cDNA Bibliotheken. Metagenom- und korrespondierende Metatranskriptom-Sequenzierungen für mikrobielle Gemeinschaften aus Technikums- und Praxisanlagen und die bioinformatische Aufarbeitung und Charakterisierung der Sequenzen schließen sich an. Der Fokus dabei liegt auf dem Auffinden von Genen, deren differentielle Transkription Veränderungen im Stoffwechsel der bakteriellen und archaealen Spezies als Reaktion auf sich verändernde Prozessparameter aufzeigen. Das Gesamt-Ziel des Projektes ist die Entwicklung molekularer Marker auf Basis identifizierter Schlüssel-Gene und deren Anwendung mittels der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR), um die Detektion von Prozess-Störungen zu ermöglichen.

2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Neben der Optimierung der RNA-Isolierung in Kooperation mit den anderen Verbundpartnern, war die Abreicherung der ribosomalen RNAs aus Gesamt RNA-Proben und die Erstellung von Sequenzier-Bibliotheken ein wichtiges, am CeBiTec durchgeführtes, Arbeitspaket. Das CeBiTec besitzt durch langjährige Erfahrungen im Bereich der Analyse von mikrobiellen Biogas-Gemeinschaften eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung des Projektes. Außerdem sollten am CeBiTec Metatranskriptom-Sequenzierungen und die entsprechende Verarbeitung der gewonnenen Sequenzdaten durchgeführt werden. Hier war die Verfügbarkeit der Technologie-Plattform für die Hochdurchsatz-Sequenzierung von Metagenomen und Metatranskriptomen auf dem Illumina MiSeq System entscheidend. Für die Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten konnten sowohl bestehende Software-Lösungen verwendet, als auch die Expertise zur Entwicklung von neuen bioinformatischen Lösungen bereitgestellt werden.

2.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

2.1.1 *DNA- und RNA-Isolierung aus Fermentationsproben, rRNA Abreicherung und Metagenom- und Metatranskriptomsequenzierung*

Im Rahmen des BIOGAS-MARKER Projektes sollten in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern des ATB, des LfL, der TUM und der Beuth-Hochschule in Berlin biologische Marker entwickelt werden, die in Zukunft für die frühzeitige Erkennung von Prozessstörungen in Biogas-Anlagen mittels qPCR eingesetzt werden sollen. Die Arbeitspakete

des Teilprojektes 4, welches durch das CeBiTec durchgeführt wurde, beinhaltete unter anderem die Arbeitspakete zur Optimierung der Nukleinsäure-Isolierungsmethoden (AP1), der Abreicherung ribosomaler RNAs aus Gesamt-RNA Proben (AP2) und der Sequenzierung von Metagenomen und korrespondierenden Metatranskriptomen aus Biogas-produzierenden Reaktoren (AP4). In **Abbildung 1** ist das Flusschema dieser Arbeitspakete gezeigt. Da sich die Vorgehensweisen unterschieden, werden im Folgenden die APs für die Praxis- und Technikumsanlagen jeweils separat kurz beschrieben.

Die Untersuchung der Praxisanlagen wurde ausschließlich durch das CeBiTec und den Sequenzierpartner *Joint Genome Institute (JGI)* des *U.S. Departments of Energy (DOE)* durchgeführt. Es wurden zunächst vier verschiedene Biogasanlagen ausgewählt, von denen zwei bereits in der Vergangenheit untersucht wurden. Die Isolierung der DNA- und RNA erfolgte unmittelbar nach Verbringung der Fermentationsproben in die Ce-BiTec Labore. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich die Bedingungen in den Proben nicht wesentlich durch Transport und Lagerung veränderten. Die Nukleinsäure-Isolierungsmethoden, die bereits in SCHLÜTER *et al.* (2008) und ZAKRZEWSKI *et al.* (2012) veröffentlicht wurden, wurden in Bezug auf die Verarbeitung von größeren Probenvolumina hin angepasst. Auf diese Weise konnte die isolierte DNA- bzw. RNA-Menge erhöht werden und die Qualität der Präparationen verbesserte sich. Die verwendeten Protokolle befinden sich im Anhang (AP1, Punkt 2.1 und 2.2 in **Abbildung 1**). Die Quantität der DNA bzw. RNA wurden mittels des *Tecan Infinity* Instruments (Tecan) mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit (Invitrogen) bzw. dem *Xpose* Gerät (Trinean) bestimmt. Die Bestimmung des Grades und die Art der Verunreinigung erfolgte mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) und dem *Xpose* Gerät. Für alle vier untersuchten Biogas-Anlagen wurden jeweils zwei Replikate, sowohl für die DNA-, als auch für die RNA-Isolierung, angefertigt. Die Proben wurden schließlich für die Sequenzierung zum DOE JGI in die USA geschickt.

Von den insgesamt acht DNA-Proben wurden dort zusätzlich acht Teilproben abgenommen, die für die Sequenzierung der 16S rRNA Gen Amplikons verwendet wurden. Hier wurde die hypervariable V4 Region mittels PCR amplifiziert. Verwendet wurden die Primer (F515/R806) für Bakterien und Archeen (CAPORASO *et al.* 2011). Die einzelnen Schritte beinhaltete die erste PCR bei der mittels der Primer das erwünschte Stück DNA (ca. 300 bp) amplifiziert wird. In der zweiten PCR werden die *Multiplex Identifier* (MIDs) und Illumina-spezifische Sequenzier-Adaptoren angefügt. Die zehn Nukleotide langen MIDs erlauben die spätere Proben-spezifische Trennung der erhaltenen Sequenzen. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels AMPureXP® *magnetic beads* (Beckman Coulter) und qualitative und quantitative Analysen mittels des *Agilent 2100 Bioanalyzer* Systems (Agilent) schlossen sich an. Nach dem Zusammenführen der Proben in equimolaren Mengen erfolgte die Sequenzierung auf dem Illumina MiSeq System, wobei das *Paired-End* Protokoll (Illumina) verwendet wurde. Für die Erstellung der Metagenom-Bibliotheken aus den DNA-Proben wurde die DNA zunächst geschert (*Focused-Sonicator*, Covaris), Längen-selektiert (*SPRI beads*, Beckman Coulter) und die Illumina kompatible Adapter an die Enden der DNA Fragmente ligiert (*KAPA-*

Illumina library creation kit, KAPA Biosystems). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der so erzeugten Sequenzier-Bibliotheken mittels des *KAPA Biosystem's next-generation sequencing library qPCR kit* (KAPA Biosystems) auf dem *Roche LightCycler 480 real-time PCR instrument* (Roche). Die Sequenzierung der Bibliotheken erfolgte auf dem *Illumina HiSeq 2000 Sequencer*, wobei das *Illumina TruSeq SBS v3-HS kit*, dem *2 x 150 indexed high-output* Protokoll folgend, verwendet wurde.

Für die Metatranskriptom-Sequenzierung wurde zunächst die ribosomale RNA (rRNA) aus den acht Gesamt-RNA-Proben mittels des *Ribo-Zero rRNA Removal Kits* (Bacteria) (Epicentre) abgereichert, da diese RNA-Spezies nur taxonomische, aber keine funktionelle Information enthält (AP2, Punkt 3 in **Abbildung 1**). Die Bibliotheks-Erstellung erfolgte nach dem *TrueSeq Stranded Total RNA sample preparation guide* (Illumina), wobei das *TrueSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit* (Illumina) verwendet wurde. Es folgte das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels der *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), da RNA nicht sequenziert werden kann und doppelsträngige DNA stabiler ist. Es folgte die Synthese des zweiten Stranges, die Sequenzier-Adapter Ligation und die Amplifikation mittels PCR. Die Quantifizierung der Metagenom-Sequenzierbibliothek erfolgte mittels des *Next-generation sequencing library qPCR Kits* (Kapa Biosystems) auf dem *LightCycler 480 real-time PCR instrument* (Roche). Für die Vorbereitung der Sequenzierung wurde das *TruSeq paired-end cluster Kit* (v3, Illumina, San Diego, USA) verwendet und die Bibliotheken schließlich auf dem *HiSeq 2000 Sequencer* unter der Verwendung des *TruSeq SBS sequencing kits* (v3), der *2x150 indexed high-output run* Instruktion (beides Illumina) folgend, sequenziert (AP4, Punkt 4.1 und 4.2 in **Abbildung 1**).

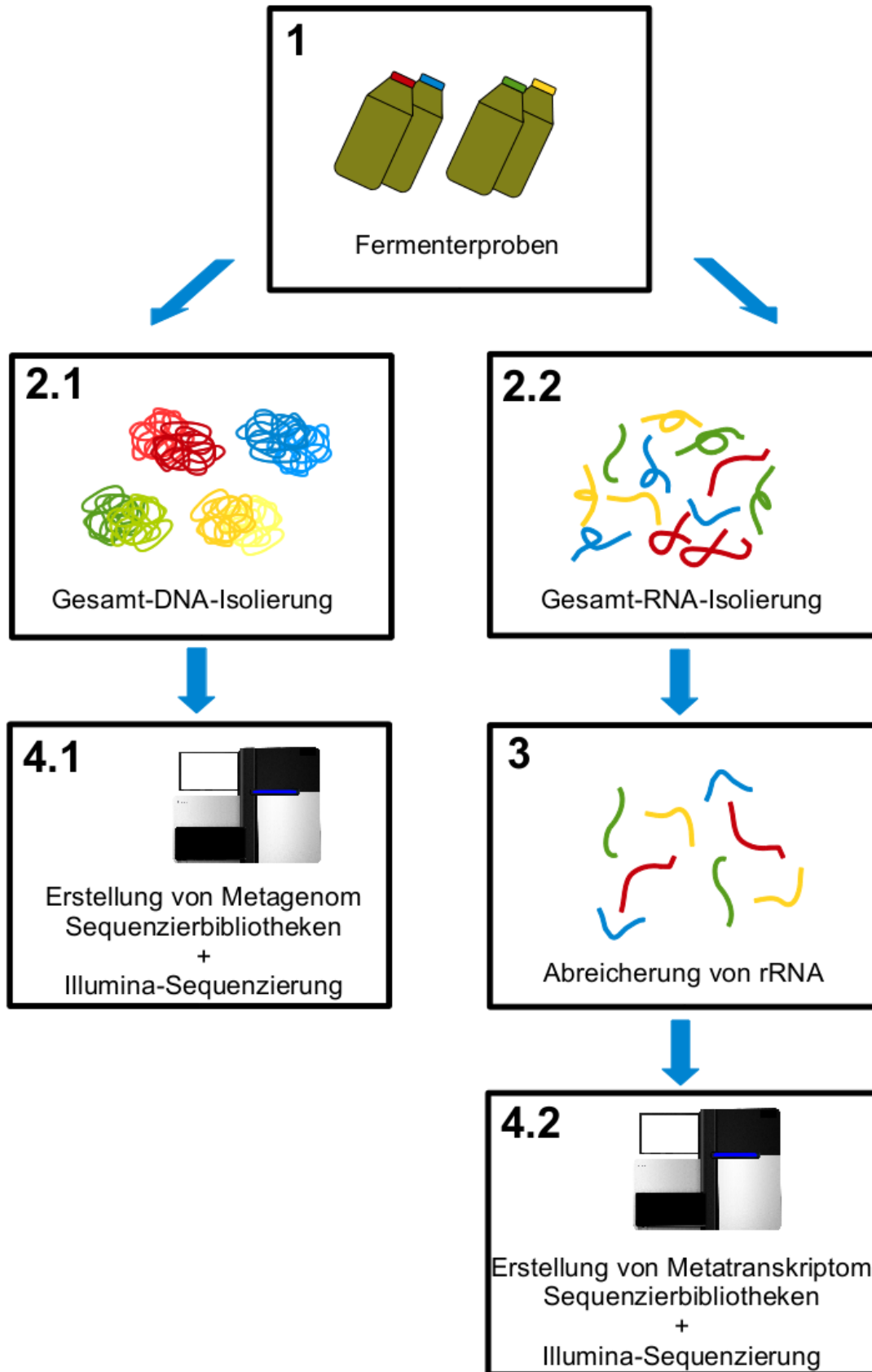


Abbildung 1: Flusschema zu den Arbeitspaketen (AP) 1, 2 und 4 aus dem Teilprojekt 4 des BIOGAS-MARKER Projektes. Die Punkte 2.1 und 2.2 entsprechen dabei AP1, Punkt 3 entspricht AP2 und die Punkte 4.1 und 4.2 entsprechen AP4.

Die Untersuchung der Technikumsanlagen des ATB wurde in Kooperation mit dem ATB durchgeführt. Die zweiphasigen Reaktoren sollten auf Unterschiede der mikrobiellen Gemeinschaft zwischen einem normalen und einem, durch Überfütterung künstlich herbeigeführten, "gestressten" Betrieb hin untersucht werden. Daher wurden nach Etablierung eines stabil laufenden Betriebes und ebenfalls ein Jahr später, nachdem die Fermentersysteme durch Übersäuerung, hervorgerufen durch eine zu hohe Substratzufuhr, Fermenter-Proben für die Isolierung von DNA und RNA entnommen. Die Proben stammten dabei aus den Gärresten der Fermenter und wurden direkt für die Isolierung von DNA und RNA für die Sequenzierung von korrespondierenden Metagenomen und Metatranskriptomen verwendet. Zu beiden Probenahmezeitpunkten wurde am ATB die DNA mittels des *FastDNATM Spin Kit for Soil* (MP Biomedicals) isoliert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) und die DNA in den RNA-Präparationen, die die Ergebnisse der Sequenzierung verfälschen würde, wurde mittels des *Turbo DNA-free Kits* (Ambion) verdaut (AP1, Punkte 2.1 und 2.2 in **Abbildung 1**). Die Proben wurden anschließend an das CeBiTec geschickt, wo sie auf ihre Qualität, Quantität und eventuelle Verunreinigungen hin mit dem *Xpose* Gerät (Trinean) vermessen wurden. Für die RNA erfolgte anschließend die Abreicherung der rRNA mittels des *Ribo-Zero rRNA Removal Kits* (Bacteria) (Epicentre), wobei nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde. Die Validierung der Abreicherung erfolgte über Messungen mit dem Agilent 2100 Bionalyser (Agilent) (AP2, Punkt 3 in **Abbildung 1**). Die Sequenzierbibliotheks-Erzeugung und Sequenzierung der 16S rRNA Gen Amplikons, Metagenome und Metatranskriptome erfolgte ebenfalls am CeBiTec auf dem Illumina MiSeq bzw. HiSeq System.

Zunächst wurde ein Aliquot der extrahierten DNA für die Sequenzierung von 16S rRNA Gen Amplikons verwendet. Für die Sequenzierbibliotheks-Erzeugung wurde nach dem Protokoll des *16S metagenomic sequencing library preparation protocol* (Illumina Inc., 2014) vorgegangen. Für die erste PCR zur Amplifikation der V3 und V4 Region des 16S rRNA Gens wurden die Primer S-D-Bact-0341-b-S-17 und S-D-Bact-0785-a-A-21 aus der Veröffentlichung von KLINDWORTH *et al.* (2013) verwendet, die Bakterien und Archeen abdecken. Nach der Aufreinigung bzw. Längen-Selektion (ca. 460 bp) mittels der *Agencourt AMPureXP beads* (Beckman Coulter) wurden in der zweiten PCR die *Multiplex Identifier (MIDs)* und die Sequenzieradapter unter der Benutzung des *Nextera XT Index Kits* (Illumina) in die Fragmente eingebracht. Die Überprüfung von Qualität und Quantität erfolgte über Messungen mit dem Agilent 2100 Bionalyser System (Agilent). Nach der Zusammenführung der Proben in equimolaren Mengen erfolgte die Sequenzierung auf dem Illumina MiSeq System, wobei das *Paired-End* Protokoll verwendet wurde.

Die DNA-Präparation wurde anschließend zur Erzeugung und Sequenzierung von Metagenombibliotheken verwendet. Zunächst wurde die metagenomische DNA mittels des GS Rapid Library Nebulizer (Roche) zu ca. 550 bp kurzen Stücken fragmentiert. Mittels eines *Illumina TruSeq DNA PCR-free sample preparation Kits* (Illumina, USA) wurden glatte Enden an den DNA-Fragmenten geschaffen, adenyliert und im letzten Schritt Se-

quenzier-Adaptoren sowie *Rapid-Library-Multiplex-Identifizier* mit den ca. 550 bp langen DNA Stücken verknüpft. Die Abreicherung von nicht ligierten MIDNs und Sequenzier-Adaptoren aus den Bibliotheken erfolgte anschließend mit dem *Agencourt AMPure XP Kit* (Beckman Coulter). Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle für die anstehende Sequenzierung auf dem Illumina MiSeq System unter der Verwendung der Illumina V3 Chemie mit 600 Zyklen (2 x 300 bp) im *paired-end* Modus wurde durchgeführt.

Nach der rRNA-Abreicherung und Qualitätskontrolle erfolgte die Metatranskriptom-Bibliothekserzeugung nach dem *TrueSeq Stranded Total RNA sample preparation guide* (Illumina). Das angewandte Verfahren wurde bereits oben für die Praxis-Fermenterproben beschrieben. Die Sequenzierung erfolgte unter der Verwendung der *Illumina V2* Chemie (2 x 250 bp) auf dem *Illumina MiSeq* im *paired-end* Modus.

2.1.2 Bioinformatische Aufbereitung der Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzdaten

An die unter 2.1.1 beschriebene Sequenzierung der Metagenome und Metatranskriptome muss sich die Aufarbeitung und Prozessierung der Sequenzdaten anschließen, um diese für die Analyse der Biogas-produzierenden Gemeinschaften zur Verfügung zu stellen. Die aufeinander folgenden Schritte der bioinformatischen Daten-Prozessierung sind in **Abbildung 2** zusammengefasst und zeigen, dass die Bearbeitung der Metagenom- und Metatranskriptomdaten zunächst separat verläuft und diese dann später zur gemeinsamen Analyse wieder zusammengeführt werden. Die bei der Verarbeitung verwendeten Bioinformatik-Werkzeuge sind in der **Tabelle 1** aufgeführt. Die Qualitätskontrolle der Metagenome und Metatranskriptome der Praxisanlagen-Proben wird durch die eigene *Pipeline* des DOE JGI durchgeführt, während die Qualitätskontrolle der Techniksanlagen-Datensätze routinemäßig mittels der *FastQC Tools* des Babrahams Institutes durchgeführt wird. Für die Metagenome schließt sich die Assemblierung der Sequenzen mittels des *Tools RayMeta* an, bei der die kurzen Sequenzier-*Reads* zu größeren *Contigs* zusammengesetzt werden, die durch ihre Länge und mehrfache Abdeckungen durch kürzere *Reads* die Annotation von Genen vereinfachen. Die Assemblierung wird mittels *Bowtie 2* kontrolliert und es schließen sich eine Genvorhersage und anschließende Annotation und Taxonomie-Zuweisung an, die jeweils mit *Prodigal*, *DIAMOND* und *MEGAN5* durchgeführt werden. Die assemblierten *Contigs* mit den annotierten Genen können nun in den *Elastic Metagenome Browser* (EMGB) geladen werden, in dem die Datensätze separat oder vergleichend untersucht werden können (siehe Kapitel 3.3.4). Um die Transkription der annotierten Gene in die Analysen einfließen zu lassen, werden die Qualitäts-kontrollierten Metatranskriptom-*Reads* mittels des *Tools Kallisto* (BRAY *et al.* 2016) auf die *Contigs* gemappt und ihnen so eine Annotation zugewiesen. Zusätzlich berechnet *Kallisto Transcripts Per Million* (TPM) Werte mittels und ermöglicht so eine Analyse der Transkriptionsstärke von Genen. Diese Daten können dann ebenfalls in EMGB geladen werden. Eine weitere besondere bioinformatische Datenverarbeitung verwendet das *Tool MetaBat*. Hier werden alle *in silico* assemblierten Sequenzen (*Contigs*) gebündelt ("*Binning*"), die zu einem Genom gehören und so Ge-

nome Bins gebildet, die jeweils eine mikrobielle Spezies repräsentieren. *Genome Bins* können dann über das Annotations-Tool *GenDB* wie Genome von individuellen Mikroorganismen weiter analysiert werden. Auch auf diese *Genome Bins* können die Metatranskriptom-*Reads* gemappt und so die Transkriptionsstärke aller in den Bins vorhandenen Gene *in vivo* analysiert werden (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.4).

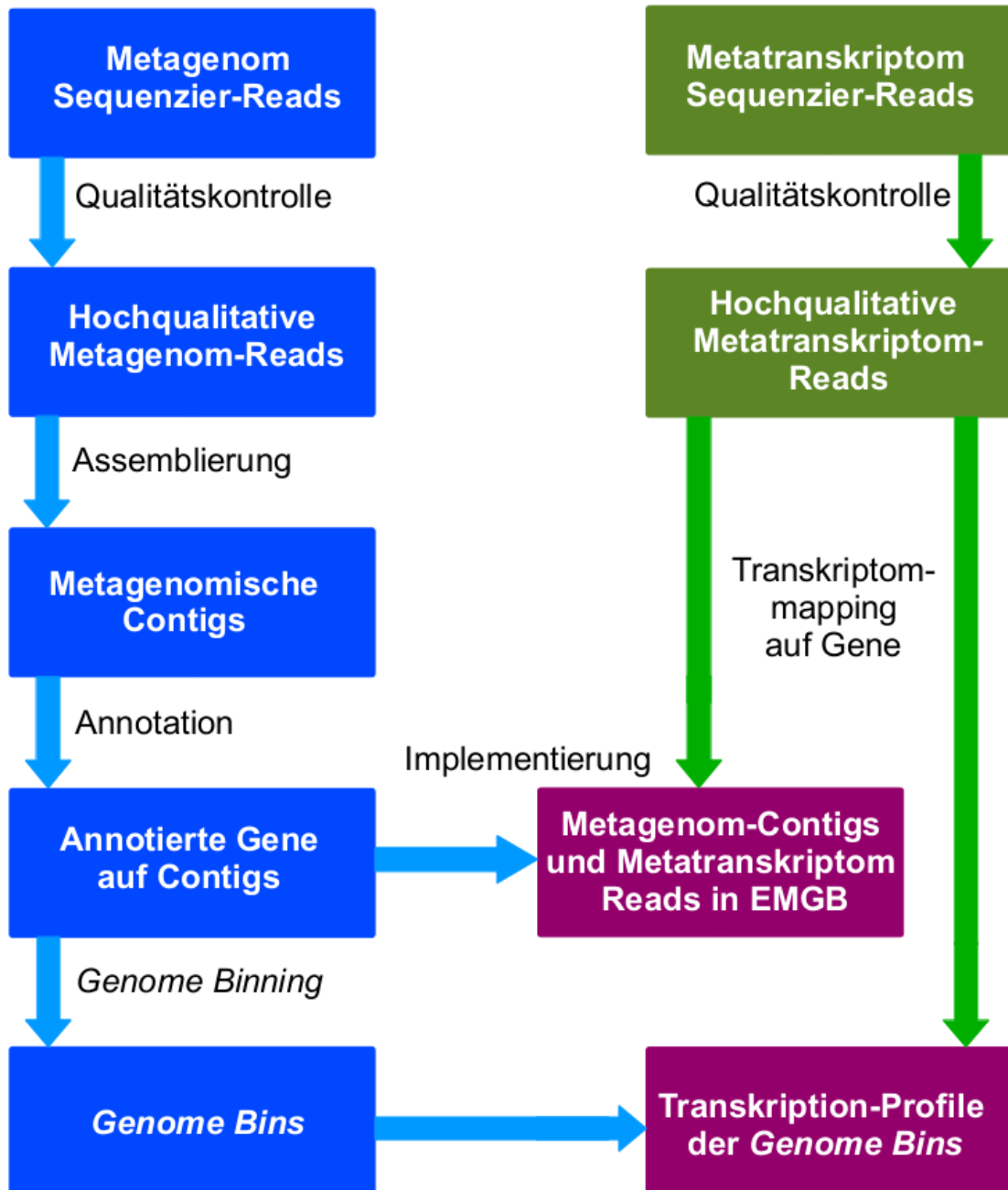


Abbildung 2: Flusschema der bioinformatischen Bearbeitung der Metagenom- und Metatranskriptom-*Reads*, die aus der Sequenzierung von DNA bzw. RNA aus Technikums- und Praxisanlagen hervorgegangen sind mit dem Ziel der funktionellen Analyse der zugrundeliegenden mikrobiellen Gemeinschaften.

Tabelle 1: Liste der verwendeten bioinformatischen Tools für die Bearbeitung von Metagenomen und Metatranskriptom-Datensätzen im 'BIOGAS-MARKER' Projekt.

Programm	Beschreibung	Referenz
FastQC	Tool zur Sequenzierdaten-Qualitätskontrolle	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
RayMeta 2.3.	Metagenom-Assemblierung	BOISVERT <i>et al.</i> 2012
Bowtie 2.2.4	Überprüfung der Assemblierung	LANGMEAD & SALZBERG 2012
SAMtools	Datei-Konvertierung und Read-Mapping Statistiken	LI <i>et al.</i> 2009
Prodigal 2.6.0	Gen-Vorhersage <i>Tool</i> für Metagenome	HYATT <i>et al.</i> 2012
DIAMOND	Protein-Vorhersage <i>Tool</i>	BUCHFINK <i>et al.</i> 2014
MEGAN5	Metagenom-Analyse <i>Tool</i> (hier Taxonomie)	HUSON <i>et al.</i> 2011
MetaBAT 0.21.3	<i>Genome Bining Tool</i> für Metagenome	KANG <i>et al.</i> 2015
CheckM 1.0.4	Qualitätskontrolle <i>Tool</i> für Genome (<i>Bins</i>)	PARKS <i>et al.</i> 2015
GenDB 2.4	Annotationsplattform für Prokaryoten	MEYER <i>et al.</i> 2003
EDGAR 2.0	Komparative Genomanalysen	BLOM <i>et al.</i> 2016
EMGB 2.0	Analyseplattform für Metagenome und Metatranskriptome	Unveröffentlicht
Kallisto	Mappen von Metagenom-Reads auf Meta-transkriptome und <i>Transcripts Per Million</i> Berechnung	BRAY <i>et al.</i> 2016

2.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und die grundsätzlichen Vorgänge während der Biogas-Erzeugung in Biogas-Fermentern sind in Grundzügen bekannt. Unsere und andere Forschungsgruppen konnten in der Vergangenheit zeigen, dass für eine funktionierende Biogasproduktion die vier Stufen, Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese, mit Mikroorganismen belegt sein müssen. Verschiedene Bakterien hydrolysieren das Substrat und erzeugen die Gärsäuren, während Archeen für die Methanogenese verantwortlich sind. Mitglieder der Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Euryarchaeota*, werden immer wieder in Praxis- und Technikumsanlagen in hohen Abundanzen vorgefunden (KRAUSE *et al.*

2008, SCHLÜTER *et al.* 2008, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012, KRÖBER *et al.* 2009, SUNDBERG *et al.* 2013, WIRTH *et al.* 2012, EIKMEYER *et al.* 2013). Obwohl man weiß, dass diese Phyla eine wichtige Rolle bei der Biogas-Produktion spielen, ist unklar, wie die einzelnen Spezies in ihrer Abundanz und metabolischen Aktivität auf Stress reagieren. Das Wissen um Schlüssel-Spezies, die bei gestressten, z.B. übersäuerten, Fermentern besonders gehäuft auftreten und die Transkription bestimmter Marker-Gene, die diesen Stress ebenfalls anzeigen, kann zukünftig für eine frühzeitige Stress-Diagnose der Fermenter eingesetzt und so entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden.

2.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Ein großer Teil der Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit den anderen BIOGAS-MARKER Partnern durchgeführt. Am Ringversuch zur DNA-Isolierung waren alle Partner beteiligt, sowie am Ringversuch zur Evaluierung der am besten geeigneten RNA-Konservierungsmethode. Eine entsprechende Publikation, die sich mit u.a. diesen Teilgebieten beschäftigt, wurde in Kooperation mit allen Verbundpartnern verfasst. Die Fermenter-Stressversuche wurden ebenfalls mit allen Projektpartnern besprochen, geplant und während ihrer Durchführung von den Partnern begleitet. Ebenso waren alle Projektpartner in die Entwicklung der bioinformatischen Auswertungsplattform EMGB indirekt involviert, indem ein ständiges Feedback über nötige und mögliche Erweiterungen seitens der Partner berücksichtigt wurde. Bezüglich der Optimierung der DNA- und RNA-Isolierung aus Technikumsanlagen wurde vornehmlich mit dem ATB (Dr. Michael Klocke, Dr. Antje Rademacher und Jaqueline Derenko) und dem LfL (Dr. Michael Leubn und Dr. Bernhard Munk) kooperiert, da die Fermentersysteme dieser Partner untersucht werden sollten und entsprechende Proben dem CeBiTec zur Verfügung gestellt wurden. In Bezug auf die Sequenzierung der DNA- und RNA-Proben aus dem Labor-System wurde eng mit dem ATB zusammengearbeitet. Für die Sequenzierung der DNA- und RNA-Proben aus Praxisanlagen wurde im Rahmen eines Sequenzierprogramms mit dem *Joint Genome Institute (JGI)* des *U.S. Departments of Energy (DOE)* kooperiert, das die Sequenzierleistungen für 16S rRNA Gen Amplikons, Metagenome und Metatranskriptome zur Verfügung gestellt hat. Anhand der so erzeugten Daten zu Beginn des Projektes konnten die Auswertungsplattform EMGB (*Elastic Metagenome Browser*) und andere beschriebene bioinformatische Auwertungsmethoden am CeBiTec entwickelt werden bevor die Sequenzierdaten der Technikumsanlagen zur Verfügung standen.

3 Eingehende Darstellung der Projektergebnisse

3.1 Optimierung der RNA-Isolierung aus Fermenterproben

3.1.1 *Anpassung der DNA- und RNA-Isolierung für Fermenterproben aus Produktions- und Technikumsanlagen*

Das Arbeitspaket 1 (AP1) des Teilprojektes 4 beinhaltete die Anpassung bereits bestehender DNA- und RNA-Isolierungsprotokolle (STOLZE *et al.* 2015, SCHLÜTER *et al.* 2008, ZAKRZEWSKI *et al.* 2012). Die Fermenterproben aus Technikums- und Praxisanlagen unterscheiden sich stark in Bezug auf ihre Konsistenz, Zusammensetzung und Wasser- bzw. Fasergehalt. Daher ist eine Anpassung der Nukleinsäure-Isolierungsmethoden für die jeweiligen Proben von großer Bedeutung, um Ausbeute und Reinheit zu erhöhen, aber auch den Aufschluss möglichst vieler verschiedener Organismen zu gewährleisten. Die Isolierung mikrobieller DNA aus den Biogas-Fermentern und ihre anschließende Sequenzierung sind wichtige Schritte, die zusätzlich zur RNA-Isolierung und -Sequenzierung durchgeführt werden müssen, um später Transkriptomsequenzen auf korrespondierende metagenomische Contigs beziehen zu können.

Mikrobielle Gemeinschaften in Biogas Anlagen bestehen aus mehreren Hundert einzelner Spezies, die sich in ihrer taxonomischen Zugehörigkeit und Abundanz stark unterscheiden können. Beides kann mittels 16S rRNA Gen Amplikon Sequenzierung aus DNA Proben untersucht werden. Hier wird anhand der Sequenzierung eines bestimmten Genabschnittes die taxonomische Zugehörigkeit bestimmt und durch das Erfassen der Anzahl entsprechender Sequenzen auch die relative Häufigkeit der jeweiligen Spezies in der Gemeinschaft ermittelt. Dieser erste wichtige Einblick in die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ist vor allem im Vergleich zwischen normal laufenden und gestressten Biogasanlagen eine große Hilfe, um Unterschiede aufzudecken und diese im Folgenden weiter untersuchen zu können.

Zusätzlich erfolgt die Metagenomsequenzierung aus der extrahierten DNA, welche die Gesamtheit der Gene der in den Biogas-Fermentern lebenden Mikroorganismen beinhaltet. Da die RNA den transkribierten Teil der Gene eines Organismus darstellt, muss eine genetische Schablone existieren, auf die die RNA Sequenzen später bezogen werden können. So kann, normalisiert auf die Anzahl der jeweiligen Gene in den Metagenomen, auch die Transkriptionsstärke der einzelnen Gene in den verschiedenen Organismen bestimmt und Unterschiede aufgedeckt werden. Um dies zu ermöglichen, muss die Isolierung der DNA und RNA simultan aus den gleichen Fermenterproben erfolgen, um korrespondierende Datensätze zu erzeugen und so die zu diesem Zeitpunkt *in vivo* transkribierten Gene untersuchen zu können. Dies wurde im Rahmen des Biogas-Marker Projekts für alle korrespondierenden DNA und RNA Proben gewährleistet.

Es ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass die Optimierung der Isolationsprotokolle von Seiten des CeBiTecs auf eine Verwendung der Proben für eine Sequenzierung angepasst sind. Herkömmliche und oft verwendete Kit-basierte Methoden beruhen auf einem physikalischen Aufschluss der mikrobiellen Zellen, welcher aber auch die Zerstückelung der DNA bzw. RNA in kleinere Fragmente zur Folge hat. Obwohl unbe-

denklich für PCR-basierte Methoden, wie der im Biogas-Marker angestrebten qPCR Methode, sind diese kleinen Nukleinsäurefragmente für anschließende Sequenzierungen nicht geeignet. Da der Fokus des Teilprojektes 4 auf der Sequenzierung von DNA und RNA und der anschließenden Auswertung der Metagenome und -transkriptome liegt, wurden verhältnismäßig sanfte Isolierungsmethoden verwendet, die übermäßige Scherkräfte vermeiden. Diese Methoden wurden an das vorliegende Probenmaterial angepasst.

3.1.2 DNA- und RNA-Isolierung aus Praxisanlagen

Zunächst wurden am CeBiTec bereits bestehende und veröffentlichte Nukleinsäure-Isolierungsmethoden für Praxisanlagen weiter angepasst. Die Methode zur DNA-Isolierung, die am CeBiTec aus bereits bestehenden Protokollen weiterentwickelt wurde, hat sich in der Vergangenheit für die Isolierung aus Praxisanlagen bewährt. Die Anwendung der Methode wurde für eine Biogas-Produktionsanlage beschrieben (SCHLÜTER *et al.* 2008). Die gleiche Isolierungs- und Sequenziermethode wurde erneut für eine komparative Analyse der entsprechenden Anlage mit einer weiteren Biogasanlage (BGA) verwendet (STOLZE *et al.* 2015).

Im Rahmen des Biogas-Marker Projekts sollte daran anschließend eine weitergehende komparative Studie mit vier verschiedenen BGAs, inklusive der beiden bereits untersuchten, durchgeführt werden. Der Unterschied zu der früheren Studie bestand in erster Linie darin, dass die neuere Illumina-Sequenziermethode (Illumina HiSeq 2000 System) angewendet werden sollte, die eine größere Sequenzier-Tiefe ermöglicht. Da sich die Zusammensetzung der Substrate einer der bereits untersuchten Biogasanlagen zwischenzeitlich verändert hatte und zwei neue BGAs in die Untersuchung mit einfließen sollten, wurde die Isolierungsmethode entsprechend angepasst. Die Metagenomstudie, deren Sequenzierungsansätze nicht aus Mitteln des Biogas-Marker Projekts finanziert, sondern durch das DOE JGI in den USA unterstützt wurden, wurde kürzlich veröffentlicht (STOLZE *et al.* 2016). Hier wird die für drei mesophile und eine thermophile BGA final angewendete Isolierungsmethode detailliert beschrieben. Sie ist außerdem im Anhang aufgeführt und damit dokumentiert. Die **Tabelle 2** fasst die erzielten Ergebnisse der DNA-Isolierung für die Sequenzierung zusammen und nennt die vom DOE JGI vorgegebene Mindestkonzentration. Die präparierte DNA konnte in dieser Studie erfolgreich für 16S rRNA Gen Amplikon und Metagenom-Sequenzierungen verwendet werden. Die angewandte DNA-Isolierungsmethode ist auch in einer weiteren Publikation des Konsortiums aufgeführt (LEBUHN *et al.* 2016).

Im Jahr 2012 erschien bereits eine Metatranskriptomstudie, die die in SCHLÜTER *et al.* (2008) untersuchte BGA auch auf RNA-Ebene analysierte (ZAKRZEWSKI *et al.* 2012). Die in dieser Publikation beschriebene RNA-Isolierungsmethode wurde im Rahmen des Biogas-Marker Projektes (Teilprojekt 4, AP1) für die vier analysierten BGAs (siehe oben) angepasst. Für alle vier BGAs konnten RNAs in ausreichender Menge und Qualität isoliert werden, die den Anforderungen des DOE JGI für die folgende rRNA-

Abreicherung und Sequenzierung genügten (DNA und RNA Konzentrationen jeweils 10-1.000 bzw. 100-200 ng/µl) (siehe **Tabelle 2**). Auch die 260nm/230nm Werte waren für alle Proben unterhalb der von Thermo Scientific angegebenen Grenzen (260nm/280nm bzw. 260nm/230nm Werte sollten bei 1,8 - 2,1 bzw. 2-2,2 liegen). Das bedeutete eine Kontamination mit Chemikalien, die bei 230nm absorbieren und vermutlich durch die Isolierungsprozedur in die Proben gelangt waren. Das DOE JGI hatte vor allem das 260nm/280nm Absorptionsverhältnis als wichtiges Kriterium angegeben und die 260nm/230nm Quotienten zeigten keine negativen Auswirkungen auf die Sequenzierung. Wie die Metagenomsequenzierung wurde auch die korrespondierende Metatranskriptomsequenzierung durch das DOE JGI in den USA unterstützt. In dem 2016 veröffentlichten Manuskript, an dem alle Biogas-Marker Projektpartner beteiligt waren, wurde die RNA-Isolierungsmethode des CeBiTecs beschrieben (LEBUHN *et al.* 2016). Die entsprechende Methode ist im Anhang aufgeführt und damit dokumentiert.

Tabelle 2: Ergebnisse der DNA- und RNA-Isolierung aus vier Biogas-Produktionsanlagen, ermittelt mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit (Invitrogen) und dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific).

Extrahierte Nukleinsäure	Probe	Konzentration [ng/µl]	Absorptionsverhältnisse	
			260nm/280nm	260nm/230nm
DNA	BGA 1.1	245,81	1,87	1,41
	BGA 1.2	250,02	1,84	1,41
	BGA 2.1	160,48	1,86	1,79
	BGA 2.1	156,87	1,86	1,9
	BGA 3.1	155,39	1,85	1,84
	BGA 3.2	184,69	1,73	1,69
	BGA 4.1	241,33	1,94	1,92
	BGA 4.2	203,20	1,78	1,23
RNA	BGA 1.1	125,4	20,6	1,43
	BGA 1.2	127,2	2,07	1,6
	BGA 2.1	163,4	1,94	1,22
	BGA 2.1	254,3	2,42	0,98
	BGA 3.1	79,3	1,71	1,98
	BGA 3.2	59,4	1,57	0,78
	BGA 4.1	206,8	1,95	1,60
	BGA 4.2	228,5	1,97	1,32

3.1.3 DNA und RNA Isolierung aus Technikumsanlagen

Die seitens des CeBiTec für Praxisanlagen weiterentwickelten DNA- und RNA-Isolierungs-methoden wurden ebenfalls für die Technikumsanlagen der Partner LfL und ATB getestet. In einem Ringexperiment, an dem alle fünf Biogas-Marker Partner teilnahmen, wurden die DNA- Isolationsmethoden der jeweiligen Partner auf die Ausbeute und deren Eignung für eine anschließende qPCR-Analyse hin untersucht. Zudem wurden vier verschiedene RNA-Konservierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit und RNA Ausbeute hin untersucht, sowie die RNA-Extraktionsmethode des CeBiTecs dokumentiert. **Abbildung 3** zeigt das Versuchsschema des Ringversuchs, wobei das CeBiTec hier als Partner E und die verwendeten DNA- bzw. RNA-Isolierungsmethoden mit 5 bzw. 7 bezeichnet sind. In der Studie, die 2016 veröffentlicht wurde (LEBUHN *et al.* 2016), wurden die einphasigen Fermenter von Partner A (LfL) und die zweiphasigen von Partner B (ATB) untersucht. Bezüglich der DNA-Präparation hat sich gezeigt, dass die Methode des CeBiTecs die geringste Ausbeute an Bakterien und Archeen aufwies, wie durch Messung der 16S rRNA Gen Kopien mittels qPCR gezeigt wurde. Als beste Methoden für die DNA-Isolierung für die ein- bzw. zweiphasigen Fermenter haben sich Kit-basierte Methoden herausgestellt (LEBUHN *et al.* 2016). Bezüglich der RNA-Isolierung hat sich außerdem gezeigt, dass die Konservierung mittels RNA $later$ (Ambion) eine sehr gute RNA-Ausbeute ermöglichte. Dieses Reagenz wird angewendet um frische Fermenterproben für eine spätere RNA-Isolierung zu konservieren, ohne dabei die Qualität der RNA zu verringern.

Unabhängig vom Ringversuch wurde von seiten des CeBiTec versucht, mittels einer Kit-unabhängigen Isolierungsmethode RNA aus den ein- und zweiphasigen Fermentern (LfL bzw. ATB) für zukünftige Sequenzierungen zu präparieren. In beiden Fällen wurden vor Ort Isolierungen durchgeführt, die aber in beiden Fällen nicht zu einer ausreichenden Quantität und Qualität der RNA führten. Die erzielten Konzentrationen der aus den LfL-Fermentern isolierten RNAs beliefen sich dabei auf 0,6 bis 46,8 ng/ μ l und zeigten eine starke Verschmutzung mit Proteinen und Chemikalien (260/280: max. 1,69 und 360/230: max. 0.53). Für die RNAs aus den ATB-Fermentern lagen die Konzentrationen in ähnlich niedrigen Bereichen (max. 4,8 ng/ μ l) und die Verunreinigungen zumindest mit Chemikalien, die bei 230 nm absorbieren, auch recht hoch (260/280: 0,33-2,99 und 360/230: 0,09-2,47).

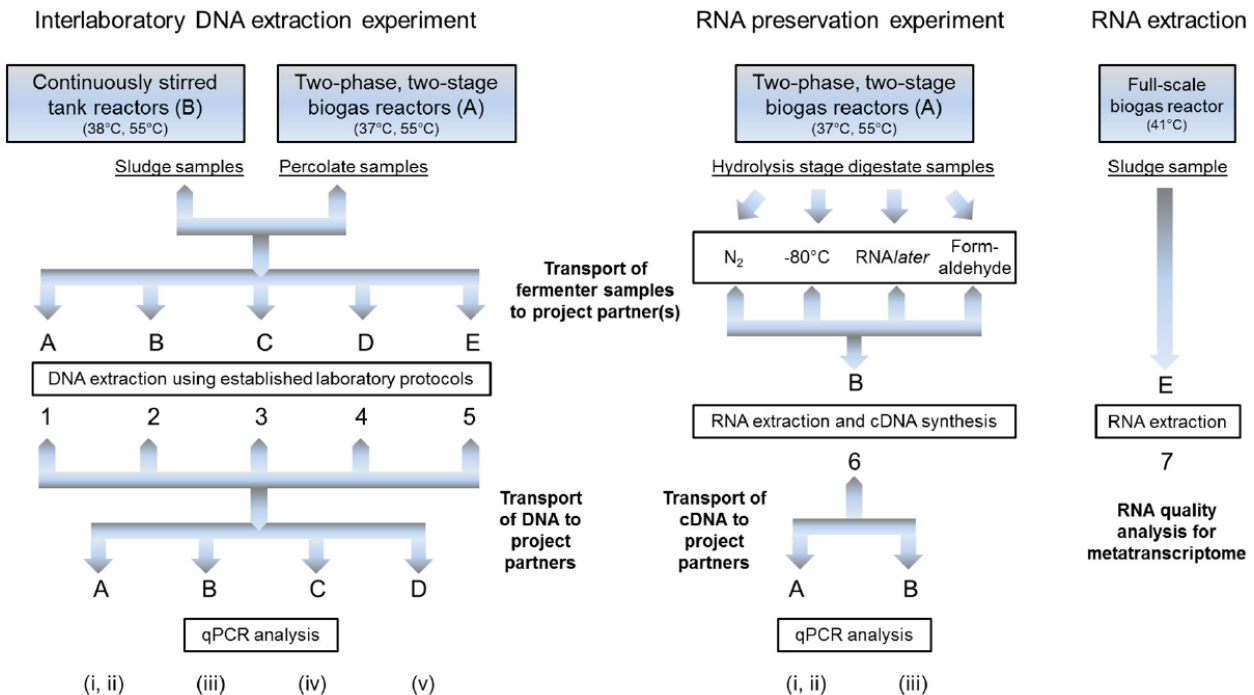


Abbildung 3: Flussschema des Projekt-übergreifenden DNA- und RNA Isolierungs-Experiments. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Isolierungsmethoden und die Buchstaben die Projektpartner. Projektpartner E bezeichnet das CeBiTec, die DNA-bzw. RNA-Isolationsmethoden des CeBiTecs sind mit 5 bzw. 7 benannt. Entnommen aus LEBUHN *et al.* 2016.

Es wurde, auch aufgrund der im Ringversuch beobachteten Ergebnisse, beschlossen für die Technikanlagen die Methoden der jeweiligen Fermenterbetreiber zur DNA- und RNA- Gewinnung für die Metagenom- bzw. Metatranskriptomsequenzierungen zu verwenden. Die RNA-Proben, isoliert aus den einphasigen LfL-Fermentersystemen, waren hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität nur für qPCR-Analysen geeignet. Dagegen eigneten sich die DNA- und RNA-Proben aus den ATB-Fermentern für Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierungen. Die entsprechenden Proben stammten aus den Gärresten der zweiphasigen Fermenter und wurden im Zuge eines Stressexperiments (siehe Kapitel 3.4) am CeBiTec sequenziert.

3.2 Abreicherung ribosomaler RNAs aus Gesamt-RNA Präparationen

3.2.1 Analyse korrespondierender Metagenome und Metatranskriptome ohne vorherige rRNA Abreicherung

Eine der vier Praxisanlagen, die im Zuge des Teilprojekts 4 untersucht wurden, wurde zusätzlich in einer separaten Studie analysiert (MAUS *et al.* 2016a). Das Ziel der Studie war es, ein *Core*-Mikrobiom für diese Biogas-produzierende Anlage zu definieren. Dafür kamen unterschiedliche Methoden zur Anwendung, u.a. Mikroskopie, Kultivierung und Genomsequenzierung. In diesem Abschnitt soll auf die Analyse der korrespondierenden Metagenome und Metatranskriptome eingegangen werden, die für die Proben aus der thermophilen Biogas-Praxisanlage erzeugt wurden.

Das Besondere an dieser Studie war, dass die Metatranskriptom-Sequenzierbibliotheken aus Gesamt-RNA Proben erzeugt wurden, die keine vorherige rRNA Abreicherung durchlaufen hatten. Das bedeutet, dass der Anteil der mRNAs unter 2% lag, während der Rest aus den ribosomalen RNA (rRNA) Spezies 5S, 16S (47%) und 23S rRNA bestand. Über die 16S rRNA Sequenzen lassen sich taxonomische Zuordnungen durchführen, während die *messenger* RNA (mRNA) die funktionellen Informationen der mikrobiellen Gemeinschaft enthält, aus der die RNA isoliert wurde. In der Studie wurden daher 16S rRNA Sequenzen der Metatranskriptome verwendet, um zu bestimmen, welche Genera *in vivo* transkriptionell aktiv waren. Parallel dazu wurde das korrespondierende Metagenom ebenfalls für diesen Ansatz verwendet, indem auch hier die 16S rRNA Gen Sequenzen analysiert wurden. Beide Datensätze wurden dafür in die Metagenom Analyse Plattform MGX geladen, die am CeBiTec entwickelt wurde. Hier wurden für beide Datensätze die 16S rRNA Sequenzen extrahiert, taxonomisch klassifiziert und die Anzahl der Sequenzen auf den kleinsten Datensatz normalisiert. In der **Abbildung 4** sind die häufigsten Genera ($\geq 0.1\%$ der Sequenzen) gezeigt, wobei Metagenom und Metatranskriptom 16S rRNA Klassifikationen vergleichend dargestellt sind. Besonders bei den Archeen zeigte sich ein starker Unterschied. Obwohl alle Archeen Genera eine Abundanz von mindestens 0,12% aufwiesen, waren alle außer einem Genus signifikant weniger aktiv bzw. wurden im Metatranskriptom nicht detektiert. Die einzige Ausnahme bildete der Genus *Methanoculleus*, dessen Mitglieder im Vergleich zu ihrer Abundanz mehr als doppelt so aktiv waren, bezogen auf die prozentualen Anteile ihrer 16S rRNA Sequenzen. Bei den Bakterien zeigte sich, dass vor allem Sequenzen der *Thermotogae* und *Clostridium Cluster III* Mitglieder im Metatranskriptom höher vertreten waren, als im Metagenom. Das bedeutet, dass Spezies dieser Genera, ebenso wie *Methanoculleus* Spezies, transkriptionell besonders aktiv sind. Die Mitglieder anderer Genera erwiesen sich dagegen als weniger transkriptionell aktiv (siehe **Abbildung 4**). Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, das Transkriptom einer Gemeinschaft in die Analysen mit einzubeziehen, wenn es um die Abundanz und metabolische Aktivität bestimmter Taxa geht. Dies gilt auch für die Häufigkeit bestimmter Gene bzw. Transkripte, die beispielsweise für die Entwicklung von Markern eine Rolle spielen können. Letzteres war im Falle dieser Studie nicht möglich, aber auch nicht ihr Fokus. Sie zeigt aber auch, wie hoch der Anteil an ribosomalen RNAs in Gesamt-RNA Proben aus mikrobiellen Gemeinschaften ist und wie wichtig daher ihre Abreicherung für die Erfassung funktioneller Transkriptions-Profile ist, die auf mRNA Information basieren.

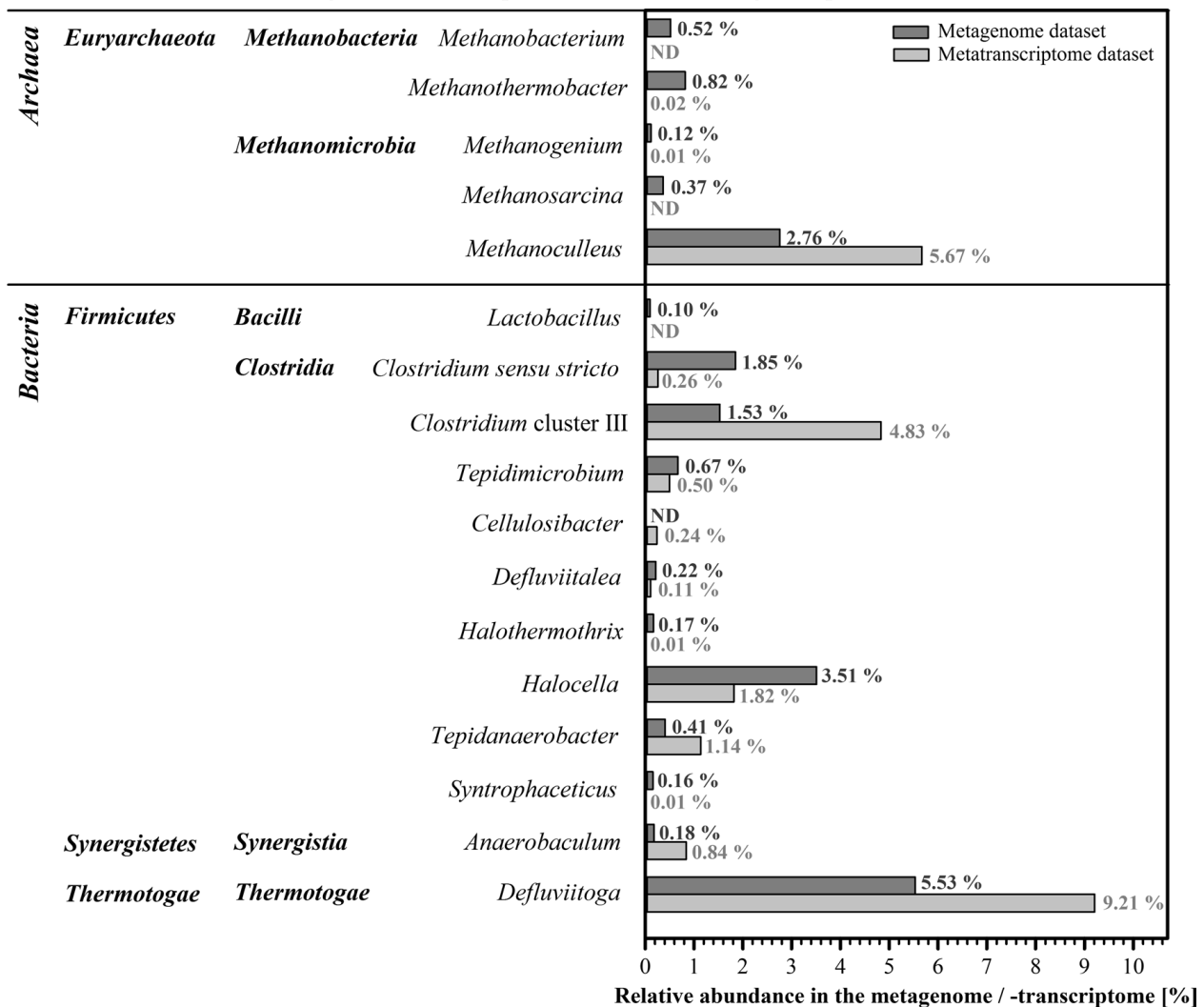
Taxonomic classification of metagenome / -transcriptome derived 16S rRNA gene sequences


Abbildung 4: Relative Abundanzen der häufigsten Genera in der analysierten thermophilen Biogas-anlage. Die Abundanzen wurden mittels 16S rRNA Gen Sequenzen aus dem Metagenom (dunkelgrau) und dem korrespondierenden Metatranskriptom Datensatz (hellgrau) bestimmt ($\geq 0.1\%$ der Sequenzen). Die Anzahl der Metatranskriptom Sequenzen wurde auf die Anzahl der Metagenomsequenzen hin normalisiert. ND: Nicht detektiert. Abbildung aus MAUS *et al.* 2016a

3.2.2 Erfolgreiche rRNA Abreicherung aus Gesamt-RNA für Technikumsanlagen und anschließende Metatranskriptomsequenzierung

Aufgrund der oben bereits erwähnten hohen Anteile ribosomaler RNAs in Gesamt-RNA Proben (Kapitel 3.2.1) sollte im Rahmen des Teilprojekts 4 die Abreicherung der rRNA aus der Gesamt-RNA, extrahiert aus Biogas Fermenter Proben, optimiert werden. Voraus ging die Vermessung der Quantität und Qualität der Gesamt-RNA-Proben, welche mittels des Xpose Gerätes (Trinean) erfolgte. Außerdem wurde der Erfolg der Abreicherung mittels RNA-Proben Vermessung vorher und nacher auf einem *Prokaryote RNA 6000 Pico Chip* (Agilent) mit dem Agilent 2100 Bionalyser (Agilent) bestimmt. In der Vergangenheit wurde der enzymatische Abbau der rRNA mittels des *mRNA-only prokaryotic mRNA Isolation Kits* (Epicentre) durchgeführt, was zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Da die Enzyme nicht zwischen degradiertes mRNA und rRNA un-

terscheiden können, werden bei dieser Methode auch leicht beschädigte mRNA Stränge abgebaut, was zu einer niedrigeren mRNA Ausbeute und zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Im Rahmen des Projekts wurde daher das *Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit (Bacteria)* der Firma Epicentre verwendet, das auch am DOE JGI für die rRNA-Abreicherung von Gesamt-RNA Proben aus den vier Praxisanlagen verwendet wurde. Mit Hilfe dieses Kits wird die rRNAs über eine Hybridisierung dieser RNA Spezies an komplementäre Einzelstränge, die an magnetischen Kügelchen befestigt sind, entfernt. Sobald die unerwünschte rRNA an die Komplementärstränge gebunden (hybridisiert) hat, kann die RNA-Lösung mit der übrigen mRNA entfernt werden, während die rRNA an den magnetischen Kügelchen zurückgehalten wird. Dieses Prinzip ermöglicht eine Anreicherung der gewünschten mRNA, die die funktionelle Information der mikrobiellen Gemeinschaft enthält, um einen Faktor von ca. 10. Für die Tests wurden Gesamt-RNA Proben verwendet, die mittels der CeBiTec-Methode aus den Praxisanlagen und der ATB-Methode aus den Technikumsfermentern isolierten wurden. Erste Ergebnisse waren vielversprechend, zeigten aber Mängel, die sich durch die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA erklären ließ. Erneute Tests zeigten eine starke Verbesserung der Abreicherung. Die Methode konnte schließlich für RNA-Proben aus den Praxis- und den Technikumsfermentern perfektioniert werden. Hier wurde in erster Linie die Probenvorbereitung und der Einsatz der RNA optimiert, wobei die Durchführung der eigentlichen Abreicherung strikt nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt wurde. Pro Reaktion sollte die RNA-Menge von max. 5µg nicht überschritten werden und die Proben frei von organischen Stoffen und Salzen sein (260nm/280nm bzw. 260nm/230nm Werte bei 1,8 - 2,1 bzw. 2-2,2) sein. Für die Dokumentation der Methode wurde Gesamt-RNA verwendet, die 2014 durch das ATB aus den Gärresten einer der stabil laufenden mesophilen Technikumsanlagen isoliert wurde. **Abbildung 5** zeigt das Elektropherogramm der Gesamt-RNA vor (1A) und nach (1B) der rRNA-Abreicherung. Die abzureichernden 23S und 16S rRNAs haben jeweils einen *Peak* bei 2.900 und 1.540 Nukleotiden, während die mRNAs kleiner sind. Der *Peak* bei 25 Nukleotiden repräsentiert die Farbstoff-Kontrolle, die wegen ihrer gleiche Konzentration als ungefährender Standard für die anderen *Peaks* herangezogen werden kann. Die Intensität der Fluoreszenzeinheiten (FU) ist dabei positiv mit der Konzentration der RNA korreliert. Nach der Abreicherung sind die 23S und 16S rRNA-repräsentierenden *Peaks* stark erniedrigt, was eine erfolgreiche Abreicherung belegt. Dieses Ergebnis, zusammen mit einer Diskussion der Anforderungen an Gesamt-RNA-Proben für vorgesehene Sequenzierungen, ist in LEBUHN *et al.* 2016 veröffentlicht. Die rRNA-Abreicherungsmethode wurde für alle anschließenden Metatranskriptom-Sequenzierungen von RNA-Proben aus den ATB-Labor-Fermentern erfolgreich angewendet (siehe Kapitel 3.4.2).

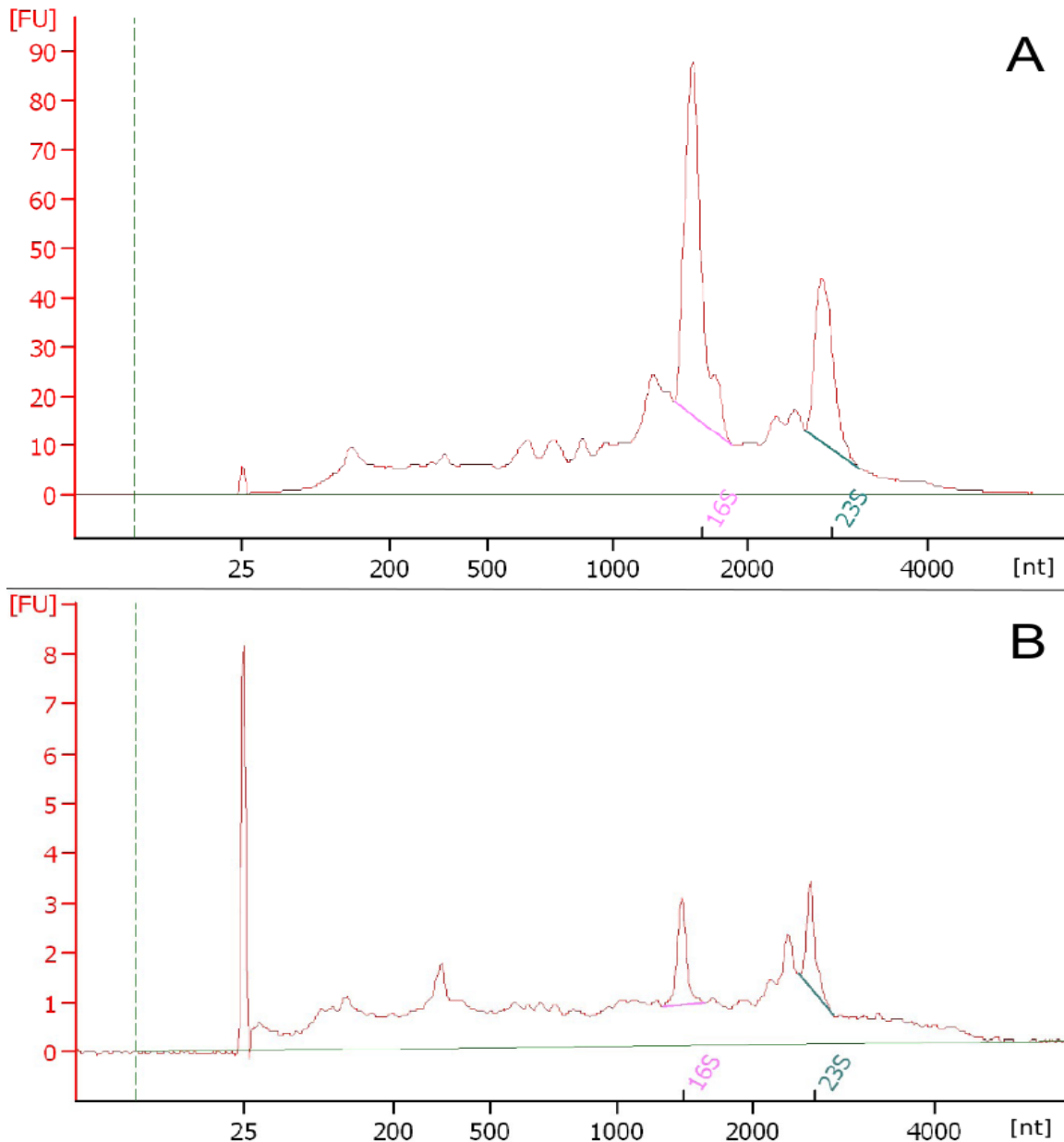


Abbildung 5: Elektropherogramme der Gesamt-RNA-Präparationen extrahiert aus Labor-Biogas-Fermenterschlamm nach einem DNase Verdau. Gesamt RNA vor (A) und nach (B) rRNA-Abreicherung mittels des *Ribo-Zero rRNA Removal Kits (Bacteria)* (Epicentre). Fluoreszenzeinheiten (FU) sind positiv mit der RNA Konzentration korreliert. nt: Nukleotide. Bild aus LEBUHN *et al.* (2016).

3.3 Bioinformatische Aufarbeitung und Charakterisierung der mRNA Sequenzen

3.3.1 Bioinformatik einer integrativen Metatranskriptom/Metagenom Analyse

Erst im letzten Projektjahr konnten die Metatranskriptome und korrespondierenden Metagenome der zweiphasigen ATB-Reaktoren sequenziert werden (siehe Abschnitt 3.4.2). Um schon früher bioinformatische Methoden und Werkzeuge für die Analyse von Metatranskriptom-Sequenzdaten zu erproben und verfügbare Werkzeuge an bestehen-

de Aufgaben anzupassen, wurde zu Testzwecken ein Datensatz bearbeitet der bereits zu Projektbeginn vorlag und im Rahmen eines CeBiTec-Projekts erzeugt wurde (für die Erstellung des Datensatzes wurden keine Biogas-Marker Projektmittel verausgabt). Anhand dieses Datensatzes wurde exemplarisch die Analyse von Metatranskriptom- und Metagenom-Sequenzdaten für eine Biogas-Gemeinschaft einer Produktionsbiogasanlage durchgeführt.

Bei der untersuchten Biogasanlage handelte es sich um eine landwirtschaftliche Anlage aus Nordrhein-Westfalen, die unter mesophilen Bedingungen mit Mais-Silage (72%) und Schweingülle (28%) als Substrate betrieben wurde. Die Anlage besteht aus drei Reaktoren, einem Hauptreaktor, einem Nachgärer und einem Speichertank, in dem das ausgegorene Substrat bis zu seiner Ausbringung auf Felder gelagert wird. Weitere Prozessparameter der Anlage sind der **Tabelle 3** zu entnehmen.

Aus einer Fermentationsprobe (1 l) des Reaktors wurde metagenomische DNA nach einem etablierten Protokoll extrahiert (SCHLÜTER *et al.* 2008). Für die Metatranskriptom-Sequenzierung wurde von der Firma Vertis (Biotechnologie AG) eine *Random-primed* cDNA Bibliothek hergestellt. Hierfür wurde Gesamt-RNA der Fermentationsprobe mit 5'-P-abhängiger Terminator Exonuklease behandelt, um mRNA anzureichern. Unter Verwendung einer Reversen Transkriptase wurde anschließend der erste Strang synthetisiert und nach dem Gubler-Hoffmann Protokoll der zweite Strang ergänzt (GUBLER & HOFFMAN 1983).

Sowohl die metagenomischen als auch die Metatranskriptom Bibliotheken wurden auf dem Illumina *Genome Analyzer* Ix System sequenziert. Die entsprechenden Sequenzierstatistiken sind in den **Tabellen 4** und **5** dokumentiert. Nach einer Qualitätskontrolle konnte der Metagenom-Datensatz mit Hilfe des Ray-Meta Assemblers (BOISVERT *et al.* 2012) assembliert werden. Die Assemblierungsstatistik ist in der **Tabelle 6** gezeigt.

Auf den assemblierten *Contig*-Sequenzen erfolgte eine Genvorhersage mit Hilfe des Werkzeugs MetaProdigal (Version 2.6.1) und eine Zuweisung der kodierten Genprodukte zu Stoffwechselwegen der KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Details der zugrundeliegenden Bioinformatik können der entsprechenden Publikation entnommen werden (BREMGES *et al.* 2015). Insgesamt konnten auf den assemblierten *Contigs* 250.596 Gene identifiziert werden, von denen 172.372 (69%) als vollständig vorhergesagt wurden. Von den identifizierten Genen konnten 61.000 KEGG Stoffwechselwegen zugewiesen werden.

Für eine integrative Metagenom/Metatranskriptom-Analyse wurden die Metatranskriptom-Sequenzen (*Reads*) auf die assemblierten Gene aus den Metagenom-Sequenzdaten gemappt. Lassen sich für ein Gen Transkripte identifizieren, zeigt dies Aktivität des Gens auf Transkriptionsebene an. Im prokaryontischen Bereich wird davon ausgegangen, dass wenn das Transkript eines Gens vorhanden ist, es auch zur Expression des kodierten Genprodukts kommt.

Tabelle 3: Prozess-Parameter und Charakteristika der analysierten landwirtschaftlichen Biogasanlage in Nordrhein-Westfalen

Process parameter	Sample
Net volume	2,041 m ³
Dimensions	6.4 m high, diameter of 21 m
Electrical capacity	537 kW _e
pH	7.83
Temperature	40 °C
Conductivity	22.10 mS/cm
Volatile organic acids (VOA)	5,327 mg/l
Total inorganic carbon (TIC)	14,397 mg/l
VOA/TIC	0.37
Ammoniacal nitrogen	2.93 g/l
Acetic acid	863 mg/l
Propionic acid	76 mg/l
Fed substrates	72 % maize silage, 28 % pig manure
Organic load	4.0 kg oDM m ⁻³ d ⁻¹
Retention time	55 days
Biogas yield	810.5 l/kg oDM
Methane yield	417.8 l/kg oDM

Tabelle 4: Überblick über die erstellten metagenomischen Sequenzierbibliotheken.

Accession	Library name	Library type	Insert size*	Cycles	Reads	Bases
ERS697694	GAllx, Lane 6	RNA, TruSeq	202 ± 49	2 × 161	78,752,308	12,679,121,588
ERS697688	GAllx, Lane 7	DNA, TruSeq	157 ± 19	2 × 161	54,630,090	8,795,444,490
ERS697689	GAllx, Lane 8	DNA, TruSeq	298 ± 32	2 × 161	74,547,252	12,002,107,572
ERS697690	MiSeq, Run A1 [†]	DNA, Nextera	173 ± 53	2 × 155	4,915,698	761,933,190
ERS697691	MiSeq, Run A2 [†]	DNA, Nextera [‡]	522 ± 88	2 × 155	1,927,244	298,722,820
ERS697692	MiSeq, Run B1 [†]	DNA, Nextera	249 ± 30	2 × 155	3,840,850	573,901,713
ERS697693	MiSeq, Run B2 [†]	DNA, Nextera [‡]	525 ± 90	2 × 155	4,114,304	614,787,564

*Insert sizes determined with Picard tools. [†]Partial runs. [‡]This Nextera library was sequenced twice

Tabelle 5: Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung und Qualitätskontrolle (QC).

Library type	Reads, raw	Reads, post-QC	Bases, raw	Bases, post-QC
Metagenome (total)	143,975,438	137,365,053	23,046,897,349	17,267,320,221
Metatranscriptome	78,752,308	73,165,986	12,679,121,588	8,455,809,264

Tabelle 6: Statistik der Metagenom-Assemblierung.

Assembly metric	Our assembly
Total size	228,382,457 bp
Number of contigs	54,489
N50 value	9,796 bp
Largest contig	333,979 bp
Mapped DNA reads	105,461,596 (77 %)
Mapped RNA reads	57,436,058 (79 %)
Predicted genes	250,596
Of these, full-length	172,372 (69 %)
Match in KEGG Genes	191,766
Of these, assigned KO	109,501
Of these, in KEGG pathways	61,100

Der Vollständigkeit halber soll hier aber auch betont werden, dass nicht alle Transkripte einer prokaryontischen Zelle für Proteine kodieren. Insgesamt konnten 57.436.058 (79%) Metatranskriptom-Sequenzen auf assemblierte Gene des Metagenom-Datensatzes der Biogas-Anlage gemappt werden. Die **Abbildung 6** zeigt das Prinzip der Analyse am Beispiel der Methanogenese. Die meisten Gene der Methanogenese konnten assembliert werden (gelbe bzw. orange Markierungen in der **Abbildung 6**). Für viele Methanogenese Gene konnten auch die entsprechenden Transkripte nachgewiesen werden, was als Beweis für die Aktivität dieser Gene gewertet werden kann (orange Markierungen in der **Abbildung 6**). Damit können die transkribierten Gene der Methanogenese als Markergene für die Aktivität dieses *Pathways* betrachtet werden. Überprüfung der entsprechenden Gene mittels qPCR Analysen kann damit Einblicke in die Aktivität der Methanogenese im System gewähren.

Des Weiteren wurden die *Reads* pro Kilobase pro eine Million gemappte *Reads* (RPKM) für jedes Gen als Maß für die Abundanz des Gens (Metagenom) bzw. für die Transkriptionsstärke des Gens (Metatranskriptom) berechnet. Die **Abbildung 7** zeigt die Ergebnisse dieser Analyse für die drei möglichen Methanogenese Wege für Kohlendioxid (CO₂) und Wasserstoff, Methanol bzw. Acetat als Substrate. Es zeigte sich, dass der hydrogenotrophe Weg der Methanogenese in dem analysierten Reaktor besonders aktiv war (siehe **Abbildung 7**).

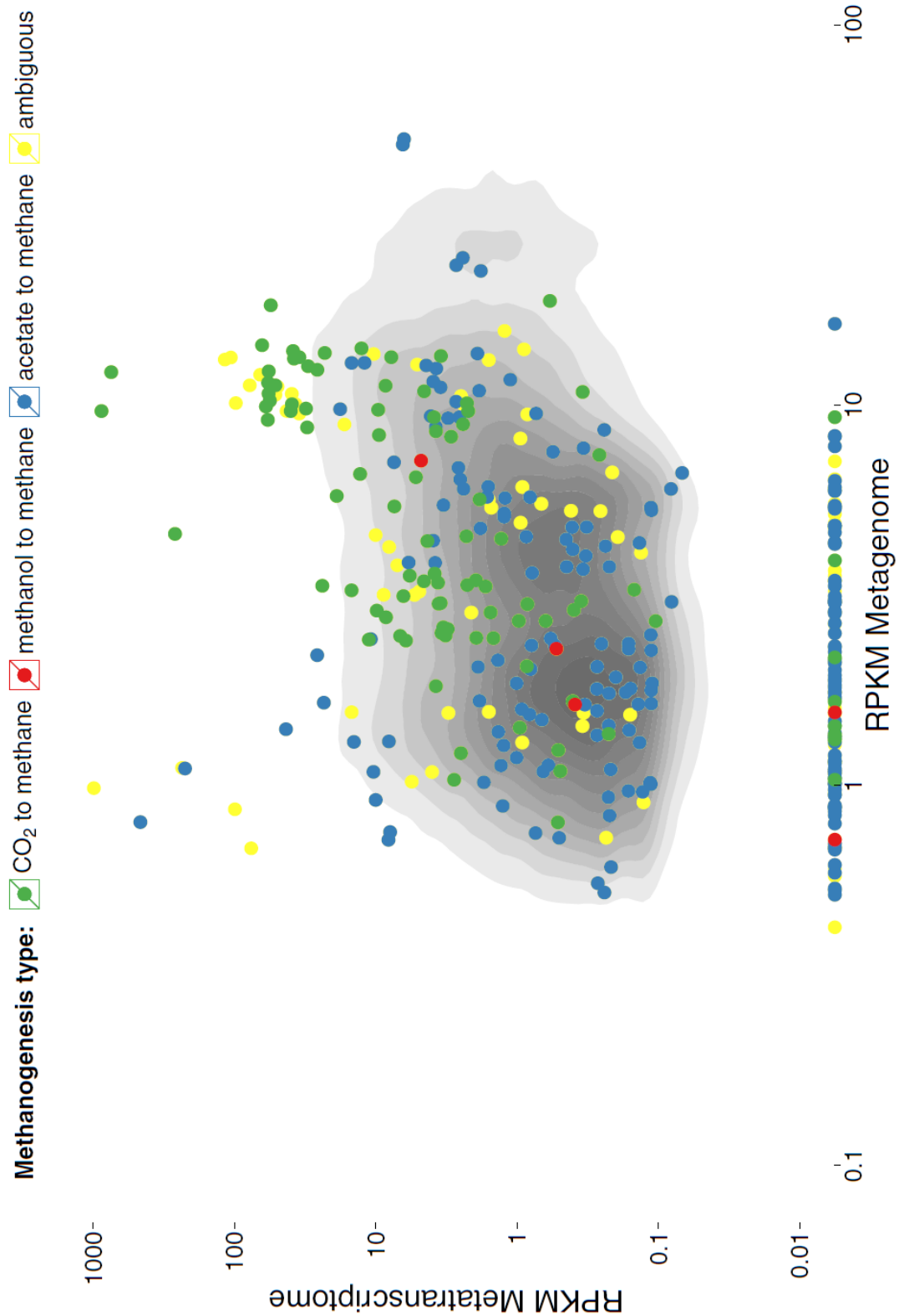


Abbildung 7: Integrative Analyse von Metatranskriptom- und Metagenom-Sequenzdaten am Beispiel der Methanogenese. Methanogenese-Gene sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Methanogenese-Pathways mit verschiedenen Farben belegt (Legende siehe oben in der Abbildung). Die analysierten Pathways beziehen sich auf die KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>). Die Abk. RPKM steht für *Reads per Kilobase per Million Reads*

Die Daten dieses Projekts und ihre Auswertung werden in einzigartiger Weise der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt, indem ein sogenannter *Docker-Container* mit allen Sequenzdaten, den benutzten bioinformatischen Werkzeugen und den erzeugten Ergebnissen zum *Download* bereitgestellt wird. Damit wollen die Autoren ihre Daten ausdrücklich für weitergehende Analysen zur Verfügung stellen, um neue biologische und biotechnologische Einsichten in den Biogas-Prozess zu ermöglichen. Dies soll der Entwicklung von rationalen Strategien zur Verbesserung des Prozesses dienen.

Der vollständige *Workflow* der Analysen ist als ein GNU-*Makefile* organisiert und kann über GitHub bezogen werden: BREMGES A, BELMANN P, SCZYRBA A. GitHub *Repository*. <https://github.com/metagenomics/2015-biogas-cebitec>.

Alle Daten und Ergebnisse des Projekts können damit über den Befehl '*Make*' reproduziert werden. Alle bioinformatischen Werkzeuge und Abhängigkeiten, die für die Reproduktion der Ergebnisse nötig sind, liegen in einem *Docker-Container* vor: DockerHub (DockerHub Registry. <https://registry.hub.docker.com/u/metagenomics/2015-biogas-cebitec>).

Der Befehl '*docker run*' führt den oben bezeichneten *Makefile* innerhalb des *Containers* aus. Lediglich die KEGG-Analyse wird nicht reproduziert, da hierfür eine kommerzielle Lizenz der KEGG-Datenbank benötigt wird. Für alle anderen Schritte werden freizugängliche (*open-source*) Werkzeuge verwendet.

Weitere Detail hierzu sind in folgendem Artikel nachlesbar:

BREMGES A., MAUS I., BELMANN P., EIKMEYER F., WINKLER A., ALBERSMEIER A., PÜHLER A., SCHLÜTER A., SCZYRBA A. (2015): *Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. GigaScience* 4: 33. DOI 10.1186/s13742-015-0073-6.

Die beschriebene bioinformatische Analyse für Metatranskriptom-/Metagenom-Sequenzdaten geht damit in folgenden Punkten über bisherige Untersuchungen hinaus:

1. Die Tiefe der Metagenom-Sequenzierung erlaubte erstmals eine Assemblierung der Sequenzdaten, so dass Kontext-Information generiert werden konnte.
2. Durch eine integrative Metagenom/Metatranskriptom-Analyse konnten Informationen zur transkriptionellen Aktivität der assemblierten Gene gewonnen werden.
3. Es konnten aktive Marker-Gene für relevante Stoffwechselwege, z.B. die Methanogenese, erkannt werden.
4. Die vorgestellten und entwickelten Bioinformatik-Werkzeuge und Vorgehensweisen können für ähnlich angelegte Projekte verwendet werden.
5. Die ermittelten Sequenzdaten (Metagenome und Metatranskriptom) wurden in einem *Repository* (siehe hierzu auch Kap. 3.3.3) für weitere Forschungsprojekte bereitgestellt und können damit als Referenzdaten dienen.

3.3.2 *Bioinformatik für die Analyse von Metagenom-Sequenzdaten aus vier Biogas-Praxisanlagen*

Im Rahmen des BIOGAS-MARKER Projektes konnten 16S rRNA Gen Amplikon- und Metagenom-Sequenzierungen für DNA-Präparationen aus vier unterschiedlichen Praxisanlagen erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei wurden die in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschriebenen Isolierungsmethoden, Sequenzierstrategien und bioinformatischen *Tools* angewendet. Für die durchgeführten Sequenzierungen wurden keine Projektmittel des BIOGAS-MARKER Projekts eingesetzt. Die diesen Sequenzierungen zugrunde liegende Finanzierung resultiert aus einer Kooperation zwischen dem Centrum für Biotechnologie und dem DOE Joint Genome Institute (JGI) in den USA im Rahmen eines *Community Sequencing* Projekts (CSP). Aus den entstandenen Daten ist bislang eine Publikation erstellt worden, die sich mit der taxonomischen Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften (16S rRNA Gen Amplikons) und der Rekonstruktion unbekannter Spezies-Genome aus Metagenom-Sequenzdaten beschäftigt. Diese Publikation (STOLZE *et al.* 2016) wurde kürzlich beim Journal *Biotechnology for Biofuels* veröffentlicht.

Die taxonomische Profilierung der vier Biogas-Praxisanlagen ging der Metagenom-Analyse voraus. Hier wurde die 16S rRNA Gen Amplikon Sequenzierung verwendet, bei der bestimmte variable Regionen des 16S rRNA Gens sequenziert werden, die sich je nach ihrer taxonomischen Herkunft unterscheidet. So kann anhand der taxonomischen Zuordnung dieser Gen-Teile und ihrer Abundanz der Anteil vorkommender Taxa bis auf maximal Genus-Ebene bestimmt werden. Die Methode wurde verwendet, um die mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten drei mesophilen und einer thermophilen Praxisanlagen zu bestimmen und, wenn möglich, diese zu den parallel bestimmten Prozessparameter zu korrelieren. Die taxonomischen Profile auf Phylum Ebene sind in **Abbildung 8** gezeigt, wobei für jede Anlage beide biologische Replikate gezeigt sind. Die Abbildung macht deutlich, dass es insgesamt vier Phyla gibt, die abundant nur in ein oder zwei der Anlagen (BGPs) vorkommen und somit nicht zum Kern-Mikrobiom gehören (v.a. *Firmicutes*, *Bacteroidetes* und *Euryarchaeota*): *Thermotogae*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* und *Cloacimonetes* (WWE1).

Die Mitglieder dieser Phyla waren daher von besonderem Interesse und ihre dominantesten Mitglieder wurden weitergehend untersucht. Die entsprechenden distinkten *Operational Taxonomic Units* (OTUs), insgesamt fünf, wurden dann in den Kontext aller bekannter Typstämme gesetzt, was in **Abbildung 9** gezeigt ist. Diese Analyse hat gezeigt, dass, bis auf die OTU, die dem Phylum *Thermotogae* zugeordnet wurde, alle weiteren vier distinkten OTUs keine nahen bekannten Verwandten besitzen. Das zeigt, dass diese OTUs, die einzelne Spezies repräsentieren, neu und unbekannt sind und evtl. sogar einem neuen Genus zugeordnet werden müssen. Daher wurden diese Spezies weitergehend untersucht.

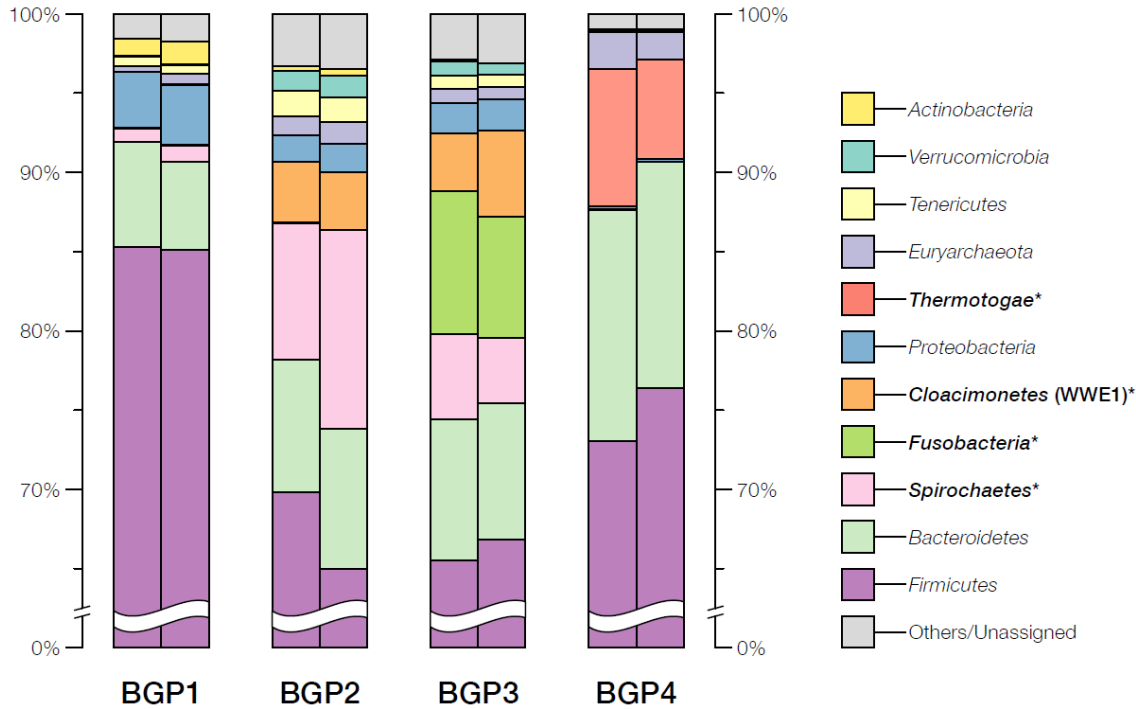


Abbildung 8: Taxonomische Profile der vier analysierten Biogas-Praxisanlagen auf Phylum Ebene, basierend auf einer 16S rRNA Amplikon Sequenzierung. Die durchschnittlichen relativen Abundanzen für jede Anlage und jedes Replikat sind gezeigt. Es wurden vier distinkte Taxa identifiziert, die mit Sternchen markiert sind. BGP: *Biogas plant* (Biogasanlage).

Die sehr tiefe Metagenom-Sequenzierung sollte die weitere Analyse der identifizierten abundanten, unbekannt und distinkten Spezies ermöglichen. Die hier verwendete Methode ist die des *Genome Binnings* (siehe Kapitel 2.1.2). Hier werden Genome aus Metagenomdaten Datenbank-unabhängig gebündelt. Entstandene *Genome Bins* können anschließend wie Genome analysiert werden. Dies ermöglichte in der Studie von STOLZE *et al.* (2016), die neuen und unbekannt Spezies zu analysieren, ohne auf andere Methoden, wie Kultivierung angewiesen zu sein. Auf diese Weise konnte das metabolische Potential und die putative Rolle der fünf Spezies-repräsentierenden Genom *Bins* ermittelt werden, deren Eigenschaften in **Tabelle 7** zusammengefasst sind. Außerdem zeigte der Vergleich mit den nächsten sequenzierten Verwandten, dass die Methode zuverlässig, da der *Thermotogae Bin* sehr nah mit *Defluviitoga tunisiensis* L3 verwandt ist, dessen Genom und potentieller Metabolismus bekannt sind (MAUS *et al.* 2016b). Für die anderen vier *Bins* bestätigte eine hohe Anzahl an einzigartigen Genen ihre Neuheit (siehe **Abbildung 10**). *Genome Binning* ist v.a. für die sehr diversen mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen vielversprechend. Für die Entwicklung von Markern ist sie besonders interessant, da sie in Kombination mit dem taxonomischen Profil die Identifizierung von Marker-Spezies und möglicherweise durch sie kodierte Marker-Gene erlaubt. Speziell, falls bestimmte Spezies in gestressten Reaktoren vorkommen, in ungestressten aber nicht, können diese Spezies als mögliche Marker für Prozessstörungen dienen. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist daher die Erstellung einer bioinformatischen *Pipeline* für die Sequenzierung, das *Genome Binning* und die Rekonstruktion des Metabolismus für fünf unbekannt abundante Spezies.

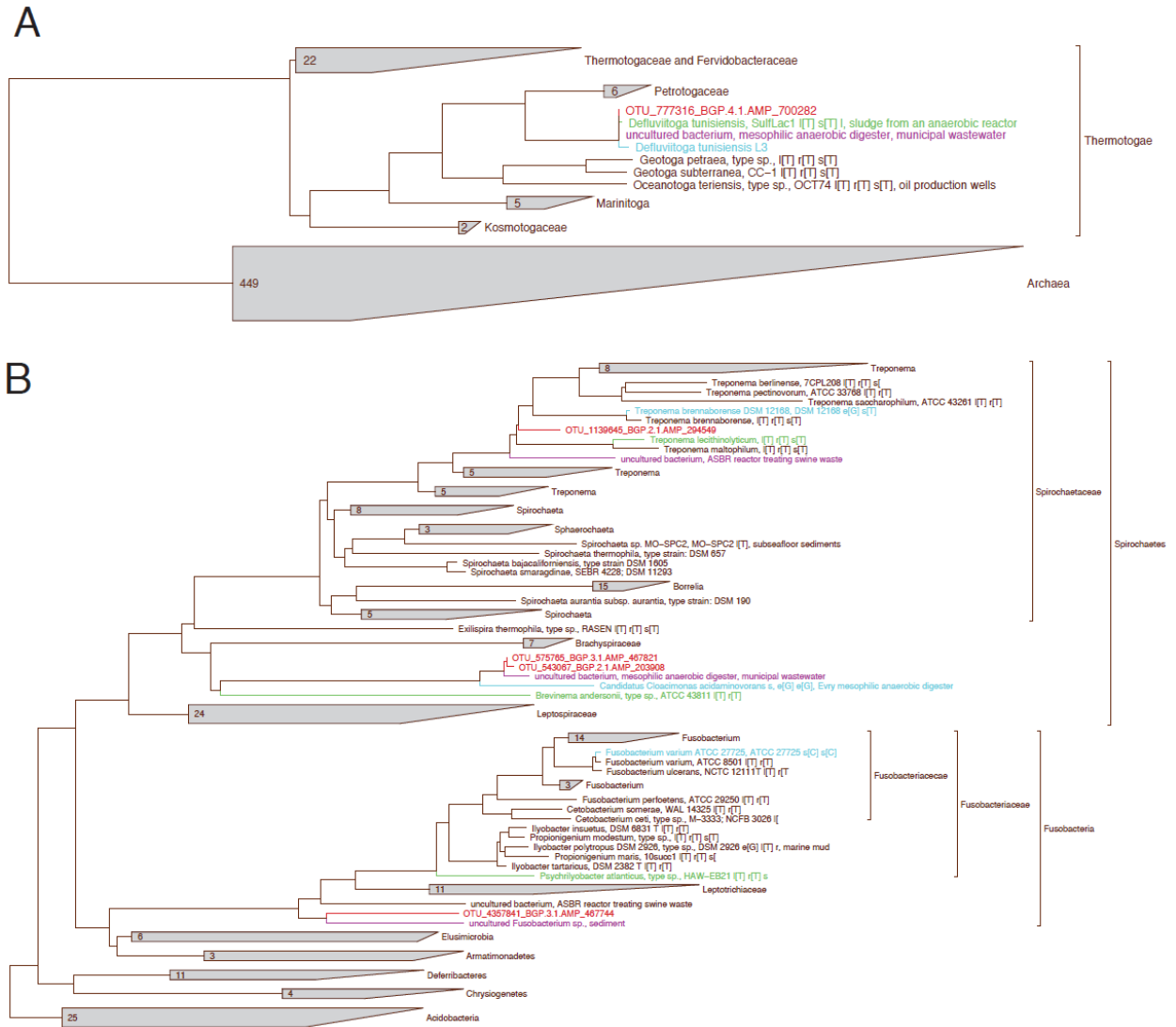


Abbildung 9: Phylogenetische Bäume aller relevanten verfügbaren Typstämme, wobei *Operational Taxonomic Units* (OTUs) der Taxa *Thermotogae* (A), *Fusobacteria*, *Spirochaetes* und *Cloacimonetes* (B) der analysierten Biogas-Praxisanlagen und ihren nächsten Nicht-Typstamm-Verwandten eingebettet wurden. Typstämme sind in schwarz, OTUs in rot, ihre nächsten Verwandten in violett, ihre nächsten sequenzierten Verwandten in blau und ihre nächsten Typstamm-Verwandten in grün markiert. Die 16S rRNA Gen-Sequenz-basierte Baum-Konstruktion wurde mit der ARB Software (LUDWIG *et al.* 2004) durchgeführt.

Tabelle 7: *Genome Binning* Ergebnisse und Statistiken.

Eigenschaften	<i>Thermotogae</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Spirochaetes</i>	WWE1 1	WWE1 2
Basen gesamt	1.904.666	2.063.893	2.196.644	1.745.914	2.265.914
GC- Gehalt [%]	30,7	26,2	59,0	54,6	51,4
Anzahl <i>Contigs</i>	277	143	86	101	162
Vollständigkeit [%]	82,81	94,38	96,48	96,70	95,60
Kontamination [%]	7,37	3,37	4,16	2,33	28,42
Heterogenität [%]	87,50	100,00	100,00	75,00	97,44

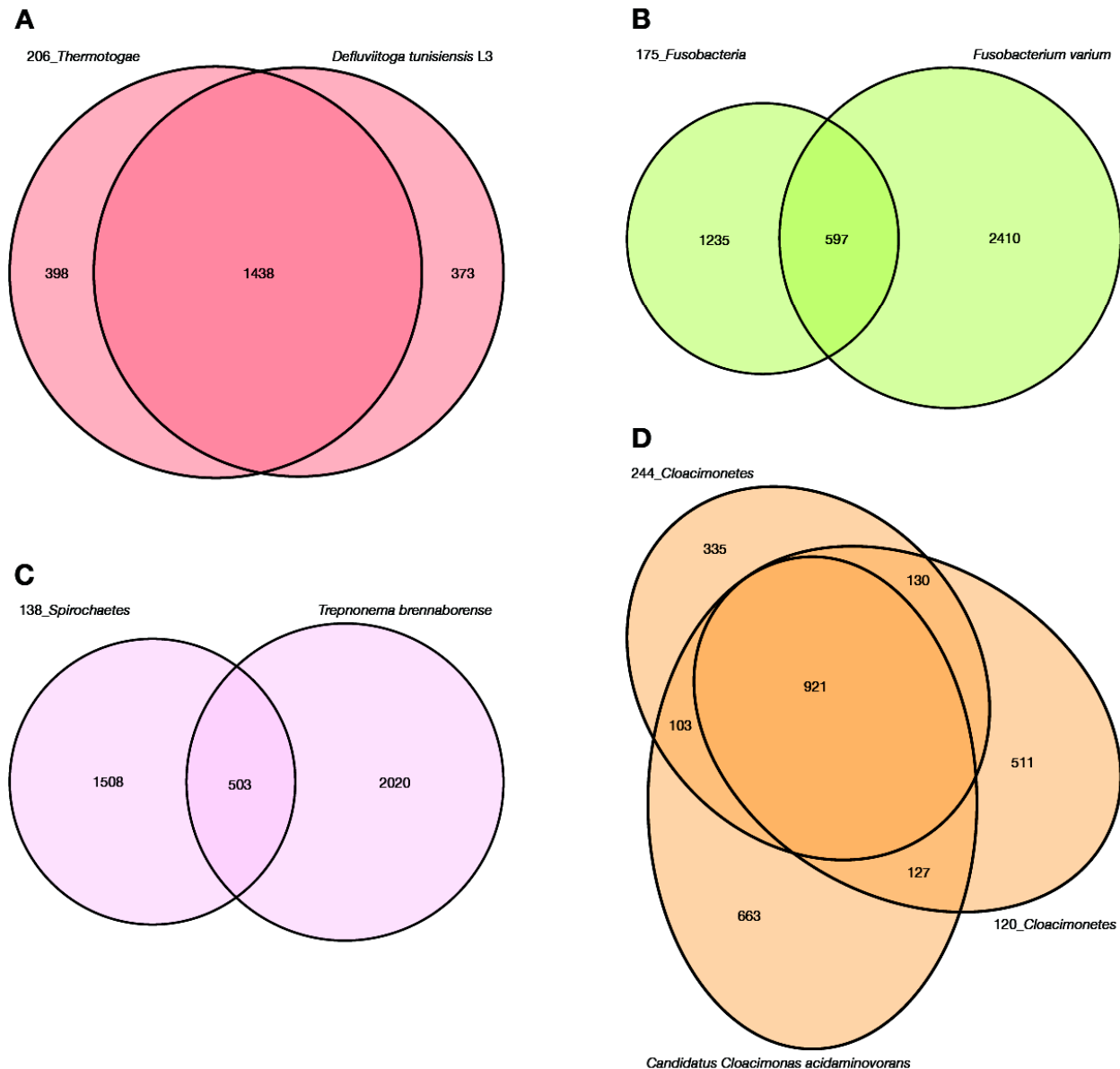


Abbildung 10: Venn Diagramme der einzigartigen und orthologen Gene zwischen den fünf Genome Bins und ihrer jeweiligen Referenzstämmen. Gezeigt sind die *Genome Bins*, der Phyla *Thermotogae* (206_Thermotogae, A), *Fusobacteria* (175_Fusobacteria, B), *Spirochaetes* (138_Spirochaetes, C) and *Cloacimonetes* (120_Cloacimonetes, 244_Cloacimonetes; D). Die Analysen erfolgten mittels des komparativen Genomanalyse Tools EDGAR (BLOM *et al.* 2009).

3.3.3 Genom-zentrierte Metatranskriptom-Analyse

Anhand des folgenden Beispiels soll dargestellt werden, wie unter Ausnutzung von Genom-Sequenzinformation Metatranskriptom-Daten ausgewertet werden können und dabei Kontext-Information gewonnen werden kann.

Wie im Kapitel 3.4.1 dargestellt, wurde das Metatranskriptom einer thermophilen Biogas-Anlage aus Nordrhein-Westfalen in Replikaten sequenziert. Aus der gleichen Anlage gelang die Isolierung des Stamms *Defluviitoga tunisiensis* L3, ein Mitglied des Phylums *Thermotogae* (MAUS *et al.* 2016a, 2016b, 2015). Mitglieder dieses Phylums besitzen eine Umhang-artige Hülle, die als 'Toga' bezeichnet wird. Sie wurden häufig in

thermophilen Biomasse-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaften gefunden und scheinen damit für den Verdauungsprozess unter diesen Bedingungen von Bedeutung zu sein. Mitglieder des Phylums *Thermotogae* schlugen früh in der bakteriellen Evolution eine eigene Entwicklungsrichtung ein. Das Genom des *D. tunisiensis* Isolats L3 konnte vollständig sequenziert werden (MAUS *et al.* 2015, 2016b). Es hat eine Größe von 2.053.097 bp mit einem GC-Gehalt von 31,4%. Aus den Genom-Sequenzdaten gelang die Rekonstruktion der metabolischen Stoffwechselwege für den Organismus. Hierfür wurden kodierte Genprodukte Stoffwechselwegen der KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>) zugeordnet. Dabei ergab sich, dass *D. tunisiensis* L3 sehr vielseitig in Bezug auf die Verstoffwechslung von komplexen Polysacchariden und Zuckern ist (MAUS *et al.* 2016b). Als Endprodukte der Fermentation wurden Ethanol, Acetat, Wasserstoff und Kohlendioxid vorhergesagt. Experimentelle Befunde belegten in der Zwischenzeit diese Verhersagen (MAUS *et al.* 2016b). Da für die thermophile Biogas-Anlage, aus der der Stamm *D. tunisiensis* L3 stammt, auch Metagenom-Sequenzdaten vorliegen, konnte mit Hilfe von *Fragment Recruitment* nachgewiesen werden, dass der Stamm abundant in der entsprechenden mikrobiellen Gemeinschaft der Anlage vorhanden ist (MAUS *et al.* 2016b). Hierfür wurden die vorliegenden Metagenom-Sequenzdaten auf das *D. tunisiensis* Genom unter stringenten Bedingungen gemappt. Dabei ergab sich, dass ca. 5% aller metagenomischen Sequenzen mit einer Genauigkeit von 97 bis 100% zu dem Referenzgenom passen. Da für die untersuchte Biogas-Anlage auch Metatranskriptom-Sequenzdaten vorliegen, konnten auch diese auf das *D. tunisiensis* Genom gemappt werden, um auf diese Weise Einblicke in die transkriptionelle Aktivität der Gene des Organismus unter *in vivo* Bedingungen in der natürlichen Reaktor-Umgebung zu gewinnen (siehe **Abbildung 11**). Dabei funktioniert der Organismus wie ein Biosensor, der die transkriptionelle Antwort auf die Reaktor-Bedingungen anzeigt. Die Methode erlaubt somit, Transkriptionsprofile im Kontext der Genominformation für den Organismus zu beurteilen und zu untersuchen.

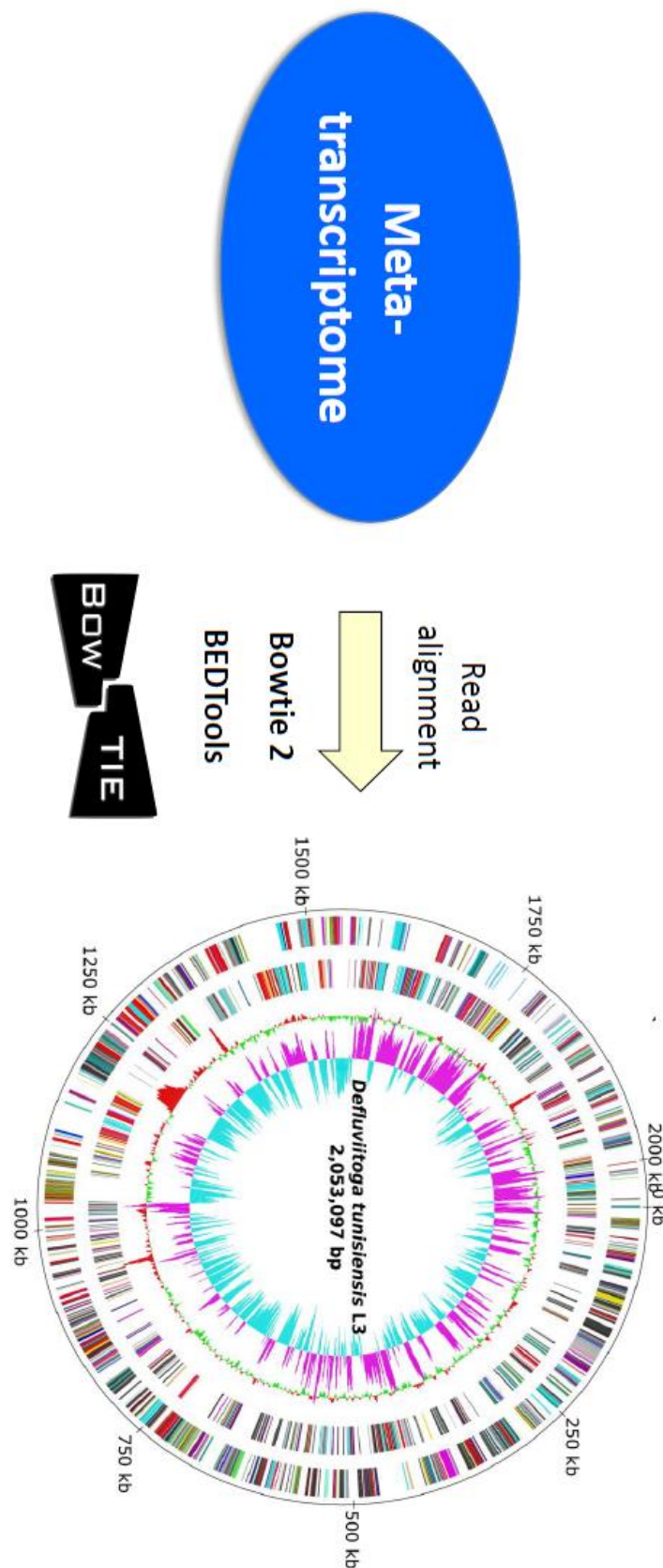


Abbildung 11: Mapping von Metatranskriptom-Reads auf das *Defluviitoga tunisiensis* L3 Genom. Metatranskriptom-Reads der thermophilen Biogas-Anlage wurden auf das Referenzgenom mit Hilfe der Bioinformatik-Werkzeuge Bowtie 2 und BEDTools (LANGMEAD & SALZBERG 2012) gemapt. Anschließend konnten die Reads per Kilobase per Million Reads (RPKM-Werte) für jedes *D. tunisiensis* L3 Gen berechnet werden. Die RPKM-Werte zeigen damit die transkriptionelle Aktivität der *D. tunisiensis* L3 Gene unter *in vivo* Bedingungen an

Aus **Tabelle 8** und **Abbildung 12** geht u.a. hervor, dass die *D. tunisiensis* L3 Gene für ein Maltose ABC-Transportsystem, eine [Fe-Fe]-Hydrogenase und eine Beta-Xylosidase besonders stark exprimiert werden (zu erkennen an den hohen RPKM-Werten). Diese Gene und andere stark exprimierte Gene des *D. tunisiensis* L3 Genoms können damit als Marker-Gene für die Überprüfung der transkriptionellen Aktivität des Organismus herangezogen werden. Ähnliche Analysen lassen sich natürlich zwanglos auf andere Schlüssel-Organismen von Biogas-Gemeinschaften übertragen. Die beschriebene Strategie lässt sich immer dann anwenden, wenn sowohl Genomsequenzierte Isolate und Metatranskriptomdaten für ein Biogas-System vorliegen. Die skizzierte Vorgehensweise wird in der Literatur als "Genom-zentrierte Metatranskriptom-Analyse" beschrieben. Transkriptionsprofile können für Ziel-Organismen im Kontext ihrer Genomsequenzen interpretiert werden. Damit ist es möglich, die Transkriptionsstärken von Markergenen im Kontext der Transkription aller Gene des Zielorganismus zu beurteilen. Differentielle Genexpressionsstudien werden möglich, wenn der Organismus unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert wird, bevor die Metatranskriptom-Sequenzierbibliotheken aus dem Habitat erzeugt werden.

Tabelle 8: Stark transkribierte Gene des *Defluviitoga tunisiensis* L3 Genoms.

Gen Name	Genprodukt	Genprodukt Funktion	RPKM Werte
<i>malE2</i>	Maltose ABC transport system, substrate binding protein	Uptake of polysaccharides including maltose	2934
<i>malE1</i>	Maltose ABC transport system, substrate binding protein	Uptake of polysaccharides including maltose	2168
<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Catalyses the conversion of glyceraldehyde 3-phosphate to D-glycerate 1,3-bisphosphate (glycolysis)	1333
<i>eno</i>	Enolase	Conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate (glycolysis)	1206
<i>malG2</i>	Maltose ABC transport system, permease protein	Uptake of polysaccharides including maltose	1143
<i>malG1</i>	Maltose ABC transport system, periplasmic protein	Uptake of polysaccharides including maltose	1124
<i>fba</i>	Fructose bisphosphate aldolase	Glycolysis and gluconeogenesis pathways	1104
<i>malF</i>	Maltose ABC transport system, membrane protein	Uptake of polysaccharides including maltose	1081
<i>bgIB</i>	Thermostable beta-glucosidase	Decomposition of cellulose and related polysaccharides	940
<i>agu4A</i>	Alpha-glycosidase	Decomposition of starch and disaccharides to glucose	939
<i>hydA</i>	[Fe-Fe] hydrogenase; large subunit	Hydrogen production	849
<i>bxIB2</i>	Beta-xylosidase	Decomposition of xylose	829
<i>bxIB1</i>	Beta-xylosidase	Decomposition of xylose	804
<i>hydG</i>	[Fe-Fe] hydrogenase; 24 kDa subunit	Hydrogen production	669
<i>manA</i>	Mannose-6-phosphate isomerase	Glycolysis and capsular polysaccharide biosynthesis	629

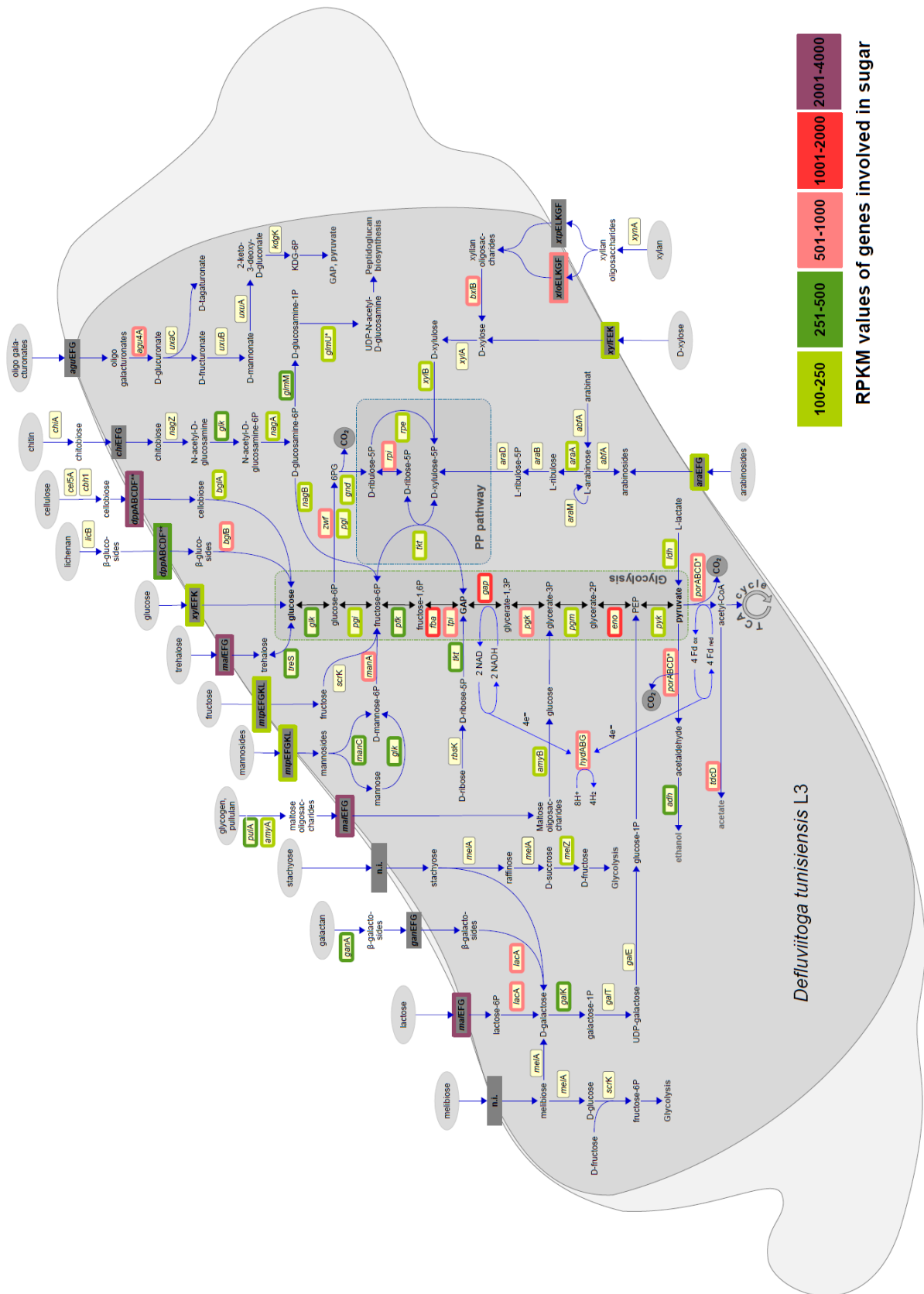


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Zucker-Metabolismus von *Defluviitoga tunisiensis* L3 basierend auf der genetischen Information und der Anzahl der *Transcripts Per Million* (TPMs) der Gene (symbolisiert durch Rechtecke). Die Stärke der Transkription ist durch fünf TPM Kategorien repräsentiert. Blau hinterlegte Rechtecke repräsentieren Transporter-Gene, gelbe Gene für intrazelluläre Enzyme.

3.3.4 *Bioinformatische Metagenom- und Metatranskriptom-Auswertung mittels des Elastic Metagenome Browsers EMGB*

Ein wichtiges Ziel des Teilprojektes 4 war die Entwicklung einer benutzerfreundlichen bioinformatischen Auswertungs-Anwendung für Metagenom- und Metatranskriptom-Datensätze. Die Intention war dabei, eine Plattform zu entwickeln, mit der assemblierte und annotierte Metagenome und Transkriptome einzeln oder komparativ und in Bezug auf verschiedenen Fragestellungen analysiert werden können. Im Kontext des BIOGAS-MARKER Projektes wurde von Bioinformatikern des CeBiTecs die Anwendung *Elastic Metagenome Browser* (EMGB) entwickelt, die die gestellten Anforderungen erfüllt. Für die Entwicklung der Plattform wurden zu Testzwecken Metagenom- und Metatranskriptom-Datensätze für Biogas-Praxisanlagen exemplarisch verwendet. Die Plattform entstand im ständigen Austausch mit Anwendern, die diese testeten und, je nach biologischer Fragestellung, Impulse für die Implementierung weiterer Bausteine und Analyse-möglichkeiten gaben. Mittlerweile wird mit der EMGB 2.0 Version gearbeitet. Die Daten und der Zugang zur Plattform selbst sind Passwort-geschützt und Benutzer müssen durch die Administratoren freigeschaltet werden, so dass keine unbefugten Personen auf die Daten zugreifen können.

Im Folgenden sind die wichtigsten Funktionalitäten aufgeführt, die EMGB für die Analyse von Metagenom- und Metatranskriptom-Datensätzen von mikrobiellen Gemeinschaften bietet:

1. Die taxonomische Profilierung der Gemeinschaften und deren Visualisierung mittels unterschiedlicher Darstellungsformen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen.
2. Die funktionelle Charakterisierung der Gemeinschaften über die Annotation der Metagenom-*Contigs* und Metatranskriptom-*Reads*.
3. Die Suche nach und Analyse von einzelnen Spezies und/oder einzelnen Genen bzw. Transkripten.
4. Das Filtern und Ordnen der Datensätze nach Taxon, Abundanz, Genname, PFAM-Nummern, etc.
5. Die Klassifikation von Genen und Transkripten in GO-Kategorien und KEGG-Stoffwechselwegen und Bestimmung der entsprechenden Abundanzen.
6. Komparative Analysen von zwei oder mehr Datensätzen und die komparative und quantitative Abbildung auf GO- Kategorien und KEGG-Stoffwechselwegen.
7. Eine interne BLAST Suche in EMGB zum Auffinden einer Ziel-Nukleotidsequenz in den Datensätzen.

In Kapitel 2.1.2. wurde bereits beschrieben, welche bioinformatischen Schritte nach der Sequenzierung von Metagenomen und Metatranskriptomen nötig sind, bevor die Daten analysiert werden können. **Abbildung 17** zeigt die detaillierte Vorgehensweise, die benutzten Datenbanken und *Tools*, die für die taxonomische und funktionelle Annotation

der Metagenom- und Metatranskriptom-*Reads* in EMGB verwendet werden. Während die Metagenom-*Reads* assembliert und annotiert werden (**Abbildung 13**, links), wird diese Annotation auf die Metatranskriptom-*Reads* übertragen, indem diese auf assemblierte Gene gemappt werden (**Abbildung 13**, rechts).

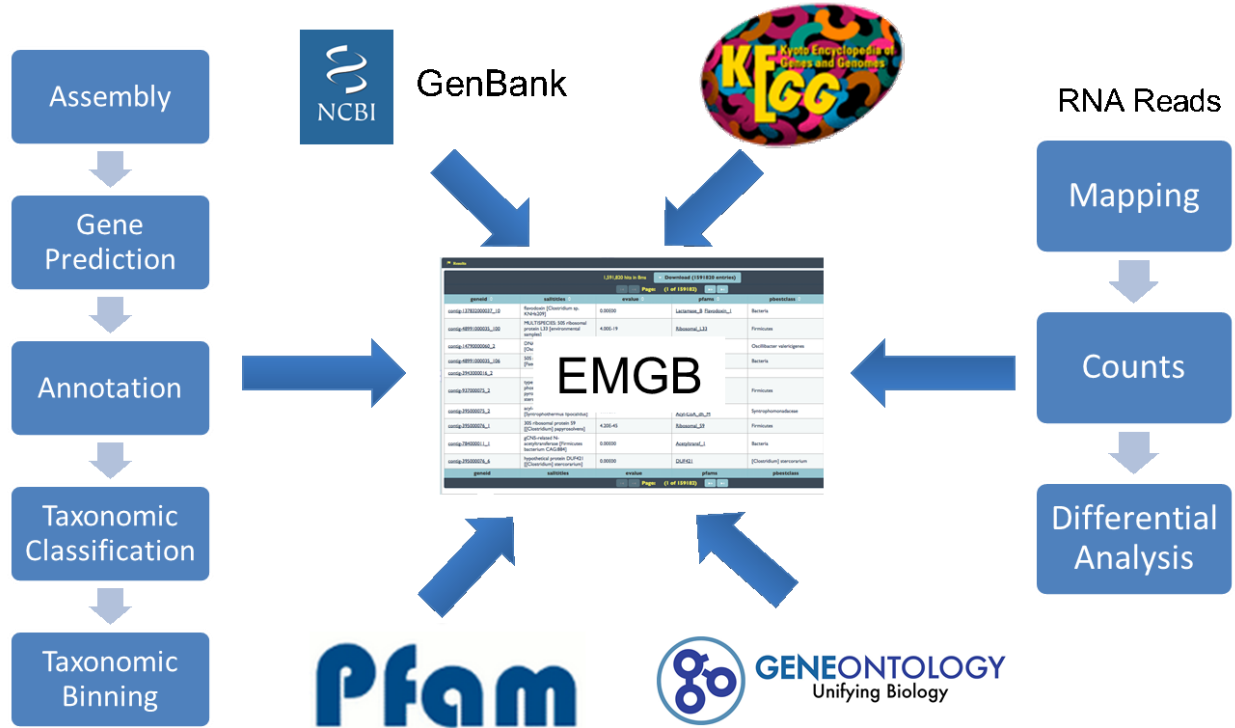


Abbildung 13: Zusammenfassung der bioinformatischen Schritte und Auflistung der benutzten Datenbanken, die für die Analyse von Metagenom (links) und Metatranskriptom (rechts) Datensätzen Anwendung finden, bevor diese zur weiteren Untersuchung in den *Elastic Metagenome Browser* (EMGB) geladen werden.

Abbildung 18 zeigt einen *Screenshot* der EMGB 2 Version, wobei hier bereits ein Datensatz geöffnet ist, wie sich am Reiter mit der Überschrift "Biogasmarker" erkennen lässt. Es lassen sich weitere Datensätze parallel dazu aufrufen, die dann ebenfalls, einzeln durch die Reiter angewählt, untersucht werden können. Auf der linken Seite der Oberfläche gibt es die Möglichkeit, sich ein taxonomisches Profil anzeigen zu lassen, das auf der Annotation des jeweiligen Datensatzes beruht. Hier kann man auch, durch das Aufklappen der Äste im taxonomischen Baum links unten, einzelne taxonomische Gruppen herausheben und den Datensatz nach bestimmten gesuchten Taxa filtern. Das Beispiel in **Abbildung 14** zeigt, wie der Datensatz nach Genen durchsucht werden kann, die der Gruppe *Archaea* bis auf Spezies-Ebene dem Archaeon *Methanospirillum hungatei* zugeordnet wurden. Das Tortendiagramm oben zeigt dabei die relative Abundanz dieser Gene im Gesamtdatensatz an, wobei hier die Taxonomie von innen (*Archaea*) nach außen (*Methanospirillum hungatei*) angeordnet ist. Auf der rechten Seite der Oberfläche ist eine Liste der gefilterten Gene angezeigt, die weiter mit den Infor-

mationen zu diesen Genen erweitert werden können. Rechts oben in der **Abbildung 14** sind jeweils Kategorien für alle verfügbaren Informationen (links, "*available columns*") und die derzeitig angezeigten (rechts, "*visible columns*") aufgelistet. Indem man mit der Maus eine dieser verfügbaren Informationen in das rechte Feld verschiebt, erscheint eine weitere Spalte in der Liste, die diese Information für jedes der angezeigten Gene enthält. Auf diese Weise lassen sich z.B. auch die Nukleotidsequenzen der Gene anzeigen, die kopiert und für andere Analysen, etwa für den Vergleich mit Datenbanken verwendet werden können.

Zusätzlich kann über das Suchfeld links oben in jeder der Tabellenspalten nach einem bestimmten Begriff gesucht werden. Während im grünen Feld (**Abbildung 14**, oben links) die entsprechende Information über das Gen bzw. die Tabellenspalte, z.B. der Genname ausgewählt wird, kann in das gelbe Feld der Such-Begriff eingegeben werden. Ist der gesuchte Begriff im Datensatz als Attribut vorhanden, werden alle Gene, die mit diesem Begriff annotiert sind, in der Tabelle angezeigt. Neben dem Reiter "Table" oben rechts gibt es weitere Reiter, unter denen zusätzliche Analysemöglichkeiten für die gefilterten Gene ausgewählt werden können. Unter dem Reiter "GO Stats" werden die durch die Gene kodierten Proteine nach funktionellen *Gene Ontology* (GO)-Kategorien (*Gene Ontology Consortium*, <http://geneontology.org/>), also entsprechend ihrer Rolle im Metabolismus, eingeordnet und ihre relativen Abundanzen im Datensatz angezeigt.

Unter dem Reiter "*Pathways*" werden die annotierten Gene den entsprechenden orthologen Genen bzw. kodierten Proteinen in verschiedenen Stoffwechselwegen zugeordnet und ihre Anwesenheit und Abundanz auf KEGG-Pathways (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>) abgebildet. Diese können ausgewählt und einzeln angesehen werden. Unter dem Reiter "*Gene Count Ratio*" kann jeweils eine taxonomische Ebene ausgewählt und dann angezeigt werden, welche der vorliegenden Taxa auf dieser Ebene welchen Anteil an der Gesamtheit des Datensatzes ausmachen, immer bezogen auf die Anzahl der entsprechend klassifizierten Gene.

Komparative Analysen sind in EMGB ebenfalls möglich, die für die Identifizierung von Marker-Genen von großer Bedeutung sind. Beispielsweise können hier Datensätze aus gestressten und ungestressten Biogasanlagen verglichen werden. **Abbildung 15** zeigt exemplarisch den *Screenshot* der komparativen Analyse der "Biogasmarker" und "Plant1234" Datensätze. Hier werden die Häufigkeiten von Genen, die zugewiesenen GO-Kategorien oder Stoffwechselwege (hier Glykolyse) angezeigt. Die Legenden zeigen, welche Farbe welchem Datensatz entspricht.

The screenshot displays the EMGB 2 interface. At the top, there is a search bar with the text "No filters" and a dropdown menu set to "is exactly". Below this, a navigation bar includes "Table", "GO Stats", "Pathways", and "Gene Count Ratio". A central panel shows a taxonomic tree on the left and a table of gene annotations on the right. The table has columns for "All Subject Titles", "E-value", "Best Class", and "Best Level". A "Visible columns" panel on the right allows users to drag and drop columns from an "Available columns" list into the table. The table contains 10 rows of gene annotations, including entries like "k99_3455350_1" (No hit found) and "k99_798507_5" (pectate lyase [Bacteroides graminisolvens]).

	All Subject Titles	E-value	Best Class	Best Level
k99_3455350_1	No hit found			
k99_798507_5	pectate lyase [Bacteroides graminisolvens]	0	Bacteroides	genus
k99_1934956_1	phenylacetate--CoA ligase [Acetivibrio cellulolyticus]	0	Clostridiales	order
k99_2462426_5	enolase [Prevotella sp. CAG:1058]	7.10e-28	Bacteria	superkingdom
k99_873446_1	hypothetical protein MBCUT_06740 [Methanobrevibacter cuticularis]	7.40e-26	unknown	unknown
k99_401745_5	No hit found			
k99_2401096_1	multidrug ABC transporter ATP-binding protein [Peptococcaceae bacterium 1109]	0	Bacteria	superkingdom
k99_2961410_2	pyridine nucleotide transhydrogenase [Porphyromonas macacae]	7.90e-25	Bacteria	superkingdom
k99_1706345_1	dNA-directed RNA polymerase subunit beta [Firmicutes bacterium CAG:313]	0	Bacteria	superkingdom
k99_3236650_1	thymidylate synthase [Ruminococcus sp. CAG:177]	0	Firmicutes	phylum

Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung der interaktiven Analyse von Metagenom-Daten für die biologische Interpretation im *Elastic Metagenome Browser* (EMGB), Version 2.0. Links können die Daten taxonomisch gefiltert werden. Rechts ist eine Tabelle mit Genen und deren diverse frei auswählbarer Eigenschaften gezeigt. Eine Suche nach Genen, Genprodukten und dergleichen ist im Eingabefeld oben möglich.

In Zukunft sollen für komparative Analysen keine absoluten Gen-Counts mehr verwendet werden, damit die Datensätze besser direkt vergleichbar sind. Es gibt die Möglichkeit die Daten auf den kleinsten Datensatz hin zu normalisieren oder den annotierten Genen RPKM-Werte (siehe auch Kapitel 3.3.3) zuzuordnen, die normalisiert sind und auf diese Weise einen Vergleich möglich machen. Dieser Schritt wird vor dem Hochladen der Daten in EMGB durchgeführt, so dass sich für die Auswertung selbst nichts

ändert. Die EMGB Entwicklung ist noch nicht abgeschlossen. Es gehört allerdings zum EMGB-Konzept, dass das System als 'offenes *Framework*' betrachtet wird. So kann durch die Implementation neuer Funktionalitäten flexibel auf neue Entwicklungen reagiert werden. Die Interpretation von Metatranskriptomdatensätzen ist in EMGB ebenfalls möglich, wobei für die Sequenzen analog zu den RPKM-Werten *Transcripts Per Million*-Werte (TPMs) errechnet werden, die es ermöglichen, Datensätze miteinander zu vergleichen. Diese Daten werden dann in EMGB hochgeladen und können analysiert werden. Für die Auswertung der Metatranskriptomdatensätze der Technikumsanlagen (siehe Kapitel 3.4.2) ist dies geplant.

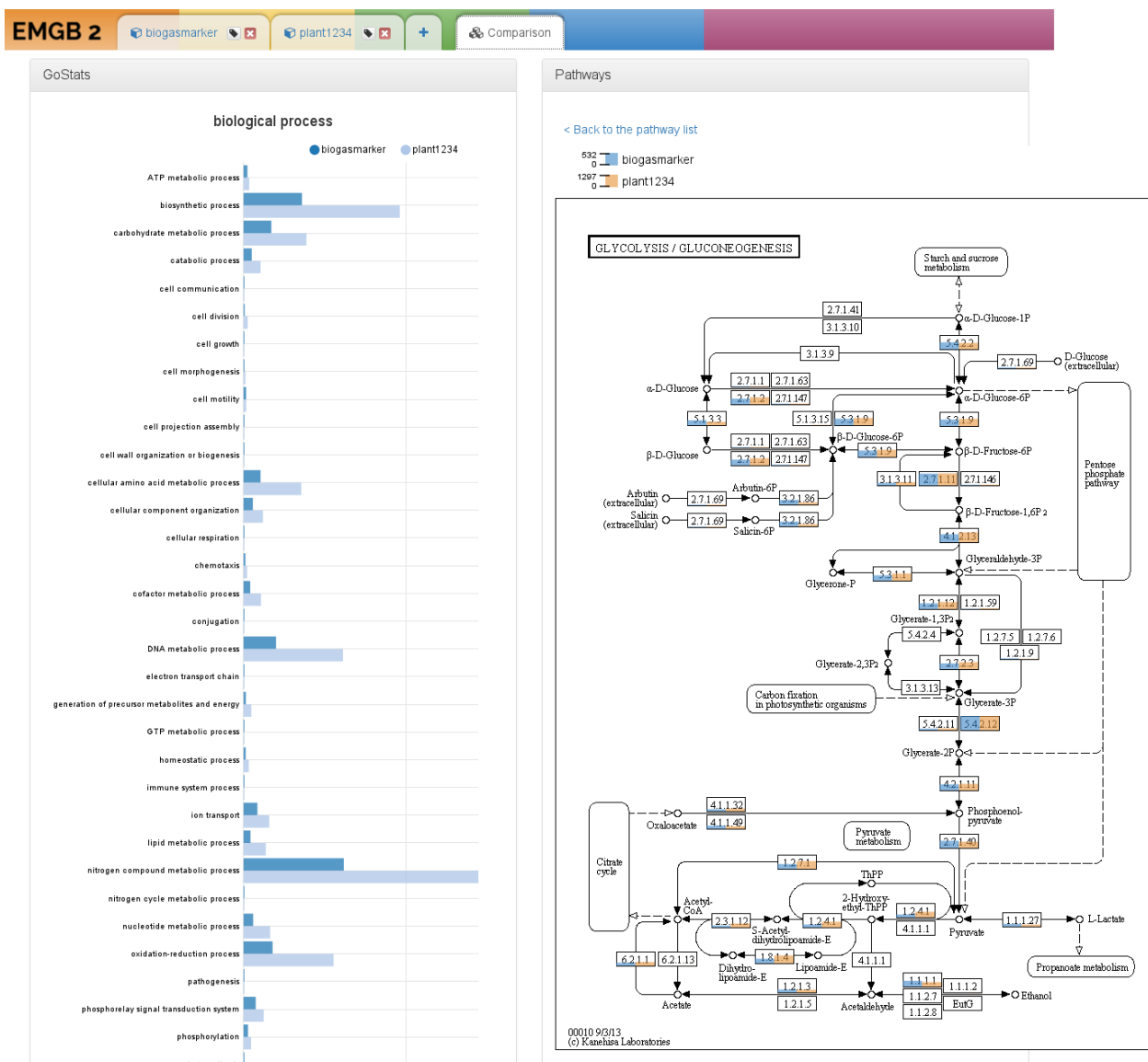


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung der komparativen Analyse zweier Metagenom-Datensätze ("Biogasmarker" und "Plant1234") in EMGB. Gezeigt sind links die durch Gene kodierten Proteine, die nach funktionellen *Gene Ontology* (GO)-Kategorien klassifiziert wurden. Rechts wurden die annotierten Gene den entsprechenden Genen bzw. kodierten Proteinen in verschiedenen Stoffwechselwegen zugeordnet und ihre Anwesenheit und Abundanz auf KEGG-*Pathways* abgebildet. In beiden Abbildungen wird die Anzahl der jeweiligen Gene angezeigt.

3.4 Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus Technikums- und Praxisanlagen

3.4.1 Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus vier Praxisanlagen

Im Rahmen des BIOGAS-MARKER Projektes sollte auch die Sequenzierung von Metatranskriptomen aus Praxisanlagen für die weitere Verwendung zur Entwicklung von Markern durchgeführt werden. Wie bereits erwähnt, ist die Sequenzierung von korrespondierenden Metagenomen für die Analyse von Metatranskriptomen unerlässlich und wurde daher ebenfalls durchgeführt. Für die Sequenzierungen wurden insgesamt vier Praxisanlagen ausgewählt, von denen drei unter mesophilen und eine unter thermophilen Bedingungen arbeiteten, was den höheren Anteil an mesophilen Biogasanlagen in Deutschland widerspiegelt. In Kapitel 2.1.1. ist beschrieben, wie für die Sequenzierung von Metagenomen und Metatranskriptomen, ausgehend von den Fermenter-Proben, vorgegangen wurde. Dabei wurden aus jeder der Anlagen zwei Proben entnommen, die später als biologisches Replikat verwendet werden sollten und so eine tiefe Sequenzierung und eine statistische Sicherheit ermöglichten. In den **Tabellen 9** und **10** sind die jeweiligen Sequenzierstatistiken der Metagenome und Metatranskriptome, basierend auf den ungefilterten Roh-Daten, gezeigt. Insgesamt konnten über zwei Milliarden *Reads*, die für fast 350 Milliarden Basenpaare stehen, an Metagenomdaten sequenziert werden. Dies entspricht der bis dato tiefsten Sequenzierung von Biogas-Fermentationsanlagen. Letzteres gilt ebenfalls für die Metatranskriptomsequenzierung, die mit fast 1,8 Milliarden *Reads* und knapp 270 Milliarden Basenpaaren eine bisher nicht erreichte Sequenziertiefe darstellt.

Die besonders tiefe Sequenzierung in Kombination mit leistungsfähigen bioinformatischen *Tools* ermöglichte vielfältige Auswertungsmöglichkeiten der Daten. Diese können für die Ableitung von molekularen Markern, aber auch für Einblicke in die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und Funktionen einzelner Spezies, verwendet werden. In der Veröffentlichung von STOLZE *et al.* (2016) und in Kapitel 3.3.2. sind mögliche Verwendungen für die erzeugten Metagenom-Datensätze gezeigt. Derzeit werden die Metatranskriptom-Datensätze ausgewertet und für eine Publikation vorbereitet, in der die Metatranskriptom-*Reads* auf die aus den Metagenomen erzeugten *Genome Bins* gemappt und transkriptionelle Profile erstellt werden. Diese Vorgehensweise, als "Genom-zentrierte Metatranskriptom-Analyse" bezeichnet, wurde im Kapitel 3.3.3. beschrieben.

Tabelle 9: Metagenom Sequenzierstatistik für alle acht sequenzierten DNA-Proben.

Biogasanlage	Replik	Anzahl Reads	Anzahl Basen (bp)
1	1	267.749.142	40.162.371.300
	2	289.930.844	43.489.626.600
2	1	298.185.500	44.727.825.000
	2	281.693.590	42.254.038.500
3	1	242.121.112	36.318.166.800
	2	338.184.952	50.727.742.800
4	1	307.971.670	46.195.750.500
	2	290.604.188	43.590.628.200
Gesamt	-	2.316.440.998	347.466.149.700

Tabelle 10: Metatranskriptom Sequenzierstatistik für alle acht sequenzierten rRNA abgereicherten RNA-Proben.

Biogasanlage	Replik	Anzahl Reads	Anzahl Basen (bp)
1	1	166.280.336	24.942.033.900
	2	223.517.128	33.527.569.200
2	1	263.289.018	39.493.352.700
	2	227.006.018	34.050.902.700
3	1	261.433.302	39.214.995.300
	2	258.702.414	38.805.362.100
4	1	161.677.326	24.251.598.900
	2	233.914.040	35.087.106.000
Gesamt	-	1.795.829.472	269.372.920.800

3.4.2 Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung für mikrobielle Gemeinschaften aus Technikumsanlagen

Für die Entwicklung von molekularen Markern zur Früherkennung von Prozessstörungen wurde im Zuge des BIOGAS-MARKER Projektes von den beteiligten Partnern ein entsprechendes Konzept erarbeitet und aufgestellt. Dazu musste ein System entwickelt werden, in dem die mikrobiellen Gemeinschaften von Technikumsanlagen in einem stabilen Zustand und unter Störungsbedingungen vergleichend untersucht werden konnten. Die DNA- und RNA-Isolierung aus den LfL-Fermentern war mit keiner der von den Projektpartnern entwickelten Isolierungsmethoden in den für die Sequenzierungen erforderlichen Mengen möglich. Daher wurden im Projekt nur die DNA- und RNA-Proben aus dem ATB-System sequenziert. Aufgrund des Ausfalls der LfL-Proben wurden die ATB-Proben tiefer sequenziert als ursprünglich geplant, so dass eine feinere Auflösung der Gemeinschaftsstruktur möglich wurde. Im Folgenden wird die Vorgehensweise dieses Teilprojektes, das auch in **Abbildung 16** gezeigt ist, beschrieben:

Die ATB-Projektpartner brachten jeweils zwei mesophile (**Abbildung 16**, blaue Umran-

dung) und zwei thermophile (**Abbildung 16**, gelbe Umrandung) zweiphasige Fermenter (als biologische Replikate) in einen stabilen Biogas-Produktions-Prozess. Die genaue Beschreibung der zweiphasigen Systeme, alle weiteren verfahrenstechnischen Details, Informationen zum gefütterten Substrat und den gemessenen Prozessparametern sind dem ATB-Teilbericht zu entnehmen. Die mikrobiellen Gemeinschaften in den jeweiligen Fermentern gelten hier als "ungestresst" und an einen stabilen Prozess angepasst (**Abbildung 16**, grüne Umrandung). Zu diesem Zeitpunkt wurden Proben entnommen und DNA und RNA für anschließende Sequenzierungen extrahiert.

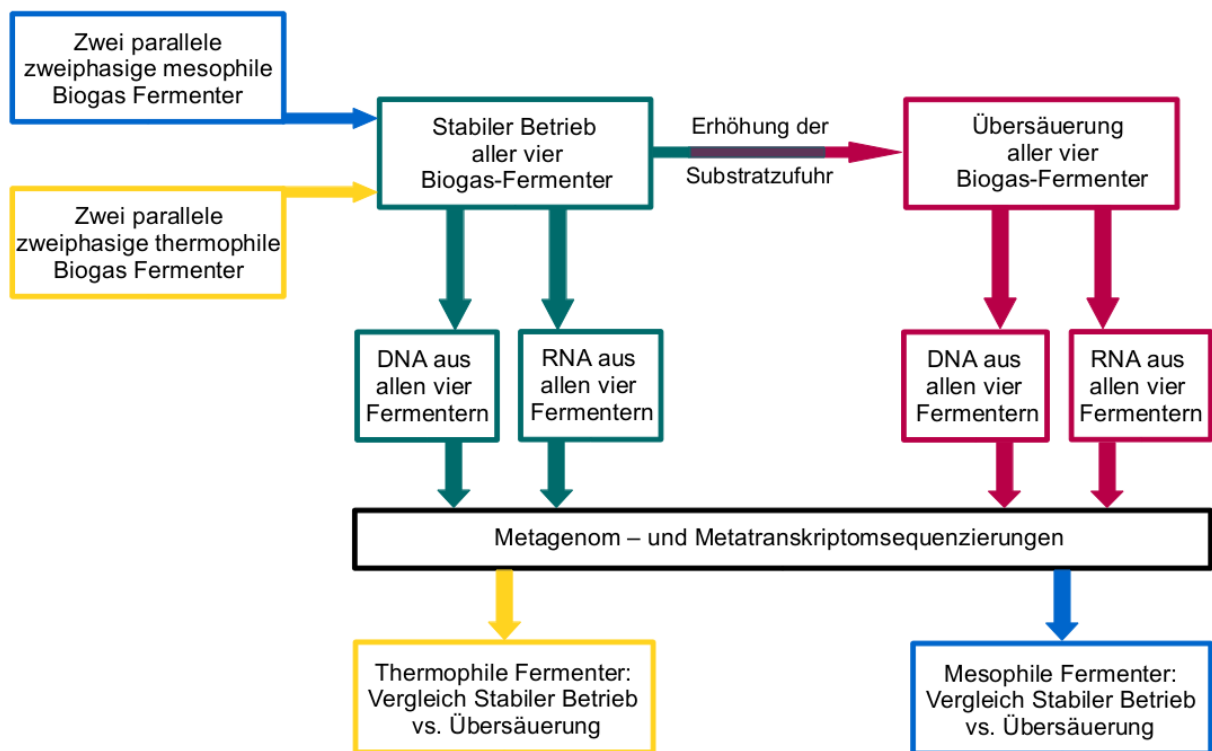


Abbildung 16: Flussschema des Versuchsaufbaus zur Untersuchung von Biogas-Produzierenden mikrobiellen Gemeinschaften in zweiphasigen Biogas-Fermentern. Verglichen wurden der stabile und der übersäuerte Zustand der mesophilen und thermophilen Fermenter mittels Metagenom- und Metatranskriptom-Analysen.

Um eine Prozessstörung ("Stress") herbeizuführen, wurden die Fermenter "überfüttert", d.h. die täglich zugeführte Substratmenge wurde erhöht, was zu einem Stau im Biomasse-Abbau führte, so dass sich chemische Prozessparameter, wie pH-Wert und Säurenkonzentrationen veränderten und es zu einer Übersäuerung des Systems kam. Der Prozess und damit auch die entsprechenden mikrobiellen Gemeinschaften galten als "gestresst" (**Abbildung 16**, rote Umrandung). Im "gestressten Zustand" wurden weitere Proben für DNA- und RNA-Isolierungen entnommen. Nach der Sequenzierung sollte der Vergleich von "stabilen" und "gestressten" mikrobiellen Gemeinschaften Auskunft über deren taxonomische Veränderungen und die Expression von Genen geben. Diese Unterschiede sollten die Basis für die Entwicklung von molekularen Markern darstellen.

Tabelle 11 fasst die unterschiedlichen Prozesszustände der Fermenter und die aus ihnen extrahierten Proben zusammen.

Tabelle 11: Proben, aus denen DNA und RNA extrahiert wurde, die Prozesstemperatur der entsprechenden Fermenter und der Prozesszustand.

Probe	Replikat	Fermenter Temperatur	Prozesszustand	
1.1	biologisches Replikate	Mesophil	Stabil	
1.2				
2.1	biologisches Replikate		Thermophil	Gestresst
2.2				
3.1	biologisches Replikate	Stabil		
3.2				
4.1	biologisches Replikate	Gestresst		
4.2				

Neben den Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierungen wurde auch eine Sequenzierung von variablen Regionen des 16S rRNA Gens durchgeführt. Die 16S rRNA Gen Amplikon Sequenzierung gibt Auskunft über die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften unter den verschiedenen Zuständen. Die taxonomische Zuweisung ist in einigen Fällen bis auf Spezies Ebene möglich, eine Zuweisung bis auf Genus Ebene gilt aber als sicherer. **Abbildung 17** zeigt die taxonomischen Profile der Gemeinschaften (auf Ebene der Familie) für die verschiedenen Betriebstemperaturen und Prozesszustände. Diese geben erste wichtige Einblicke in die Dynamik der Gemeinschaften und ermöglichen die Identifizierung von für einen gestressten Prozess typischen Marker-Taxa. Auf den ersten Blick auffallend ist der Unterschied zwischen den Zusammensetzungen der mikrobiellen Gemeinschaften in den mesophilen und thermophilen Fermentern. Auch wenn ein Vergleich dieser beiden Prozess-Arten nicht Teil des Projektes ist, sieht man deutliche Unterschiede. Die Diversität ist in den thermophilen Fermentern deutlich geringer als in den mesophilen, was sich dadurch erklärt, dass weniger Organismen an hohe Temperaturen angepasst sind.

Die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten sind dabei recht gering. Dafür zeigen sich Unterschiede im Vergleich zwischen "ungestresst" und "gestresst". Einige Familien haben sich nach der Übersäuerung in ihren Anteilen verringert, wobei andere einen größeren Anteil einnehmen. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse auch auf anderen taxonomischen Ebenen wird daher sicher weitere wichtige Erkenntnisse liefern und kann zumindest eine Richtung der Veränderungen anzeigen, der bei der Analyse der Metagenome und Metatranskriptome weiter nachgegangen werden kann.

bellen 12 und 13 zusammengefasst. Insgesamt erbrachte die Sequenzierung über 61 Millionen Metagenom-*Reads* mit fast 18,5 Milliarden Basenpaaren und rund 800 Millionen Metatranskriptom-*Reads* mit insgesamt etwas über 76 Milliarden Basenpaaren. Die große Menge an Daten wird eine Assemblierung der Metagenome und später ein *Mapping* der Metatranskriptom-*Reads* auf assemblierte metagenomische *Contigs* ermöglichen. Die entstandenen Daten wurden prozessiert und die Metagenome in die *Elastic Metagenome Browser* (EMGB) Plattform für die Datenauswertung hochgeladen. Gleiches gilt für die Metatranskriptom-Sequenzdaten. Das Projekt wird passwortgeschützt den Projektpartnern zur Analyse und der Entwicklung möglicher molekularer Marker mittels EMGB zur Verfügung gestellt.

In den **Abbildungen 18 bis 21** sind die vergleichenden Analysen der Metagenome in EMGB gezeigt. In den **Abbildungen 18 und 19** sind dabei die mesophilen und in **Abbildung 20 und 21** die thermophilen Anlagen (vereint und gemittelt) bezüglich ihrer funktionellen Profilierung vor und nach der Überfütterung verglichen worden. Die funktionellen Profile der mikrobiellen Gemeinschaften in den jeweiligen Anlagen basieren auf den Metagenom-Datensätzen. Die **Abbildungen 18 und 20** zeigen dabei die Klassifikation der Gene basierend auf *Gene Ontology* Kategorien, in diesem Fall den molekularen Funktionen, denen die Gene mittels der Annotation zugeordnet wurden. In den **Abbildungen 19 und 21** ist der *Glykolyse-Pathway* beispielhaft dargestellt. An dieser Stelle können alle in KEGG verfügbaren *Pathways* angewählt und angezeigt werden. In beiden Darstellungsformen ist die absolute Anzahl der den jeweiligen Kategorien zugeordneten Gene angezeigt und kann verglichen werden. Diese Darstellung gibt erste Hinweise, die im Weiteren manuell untersucht und überprüft werden können. Vergleiche zwischen Metagenomen ergeben evtl. keine großen Unterschiede, da selbst wenn sich die Gemeinschaft verändert, die Gesamt-Zusammensetzung an Genen und entsprechenden Funktionen relativ gleich bleiben sollte, da besser an den Stress angepasste Organismen möglicherweise die Nische eines anderen Bakteriums einnehmen und damit über eine ähnliche Funktionalität verfügen. Die genauen Unterschiede in der Aktivität der Mikroorganismen wird man in den Metatranskriptomen sehen können, die die transkriptionellen Aktivitäten in den Gemeinschaften widerspiegeln. Hier werden sich sehr wahrscheinlich starke Unterschiede zwischen stabilem und gestresstem Zustand ergeben. Entsprechende Befunde können dann genauer untersucht werden, was letztlich zur Identifizierung von Marker-Genen für den gestressten Zustand führen soll.

Tabelle 12: Metagenom Sequenzierstatistik für alle acht sequenzierten DNA-Proben.

DNA Probe	Anzahl Reads	Anzahl Basen [bp]
1.1	6.171.246	1.853.944.386
1.2	8.527.230	2.561.877.476
2.1	9.503.758	2.855.183.802
2.2	5.438.706	1.633.886.414
3.1	8.709.180	2.616.535.442
3.2	10.088.020	3.030.778.770
4.1	6.261.220	1.880.941.338
4.2	6.566.118	1.972.689.986
Gesamt	61.265.478	18.405.837.641

Tabelle 13: Metatranskriptom Sequenzierstatistik für alle acht sequenzierten RNA-Proben.

RNA Probe	Anzahl Reads	Anzahl Basen [bp]
1.1	64.087.552	6.472.842.752
1.2	71.054.674	7.176.523.074
2.1	64.475.838	6.512.059.638
2.2	62.482.100	6.310.692.100
3.1	140.043.028	14.164.545.828
3.2	115.787.190	11.694.506.190
4.1	116.337.546	11.803.021.600
4.2	162.618.552	12.210.476.612
Gesamt	796.886.480	76.344.667.794

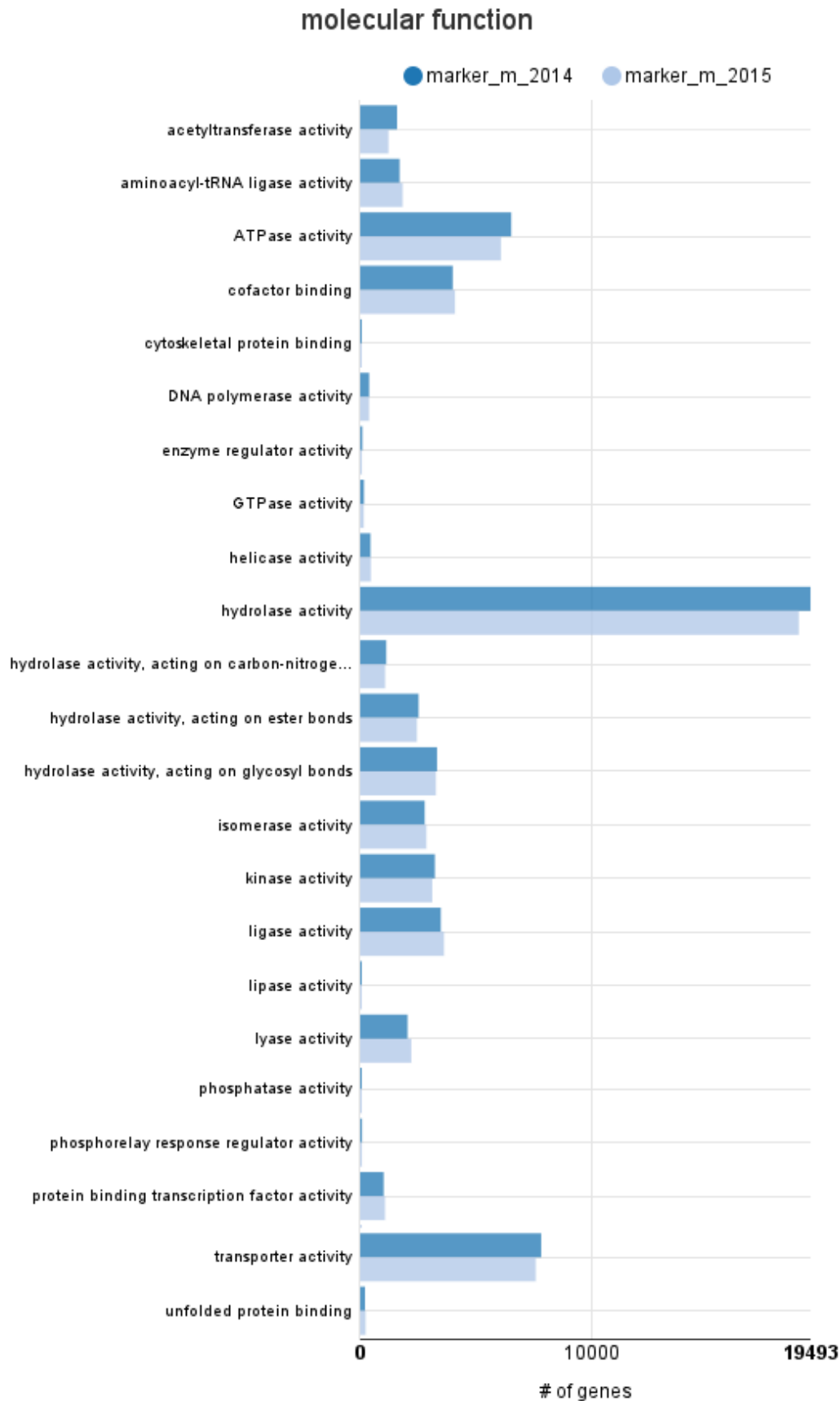




Abbildung 18: Vergleich funktioneller Profile der Gemeinschaft einer meso-philen Biogasanlage in stabilem (marker_m_2014) und übersäuertem (marker_m_2015) Zustand, basierend auf *Gene Ontology* Kategorien. Gezeigt ist die Anzahl der diesen Kategorien zugeordneten Genen in den Metagenomen.

196  marker_m_2014
179  marker_m_2015

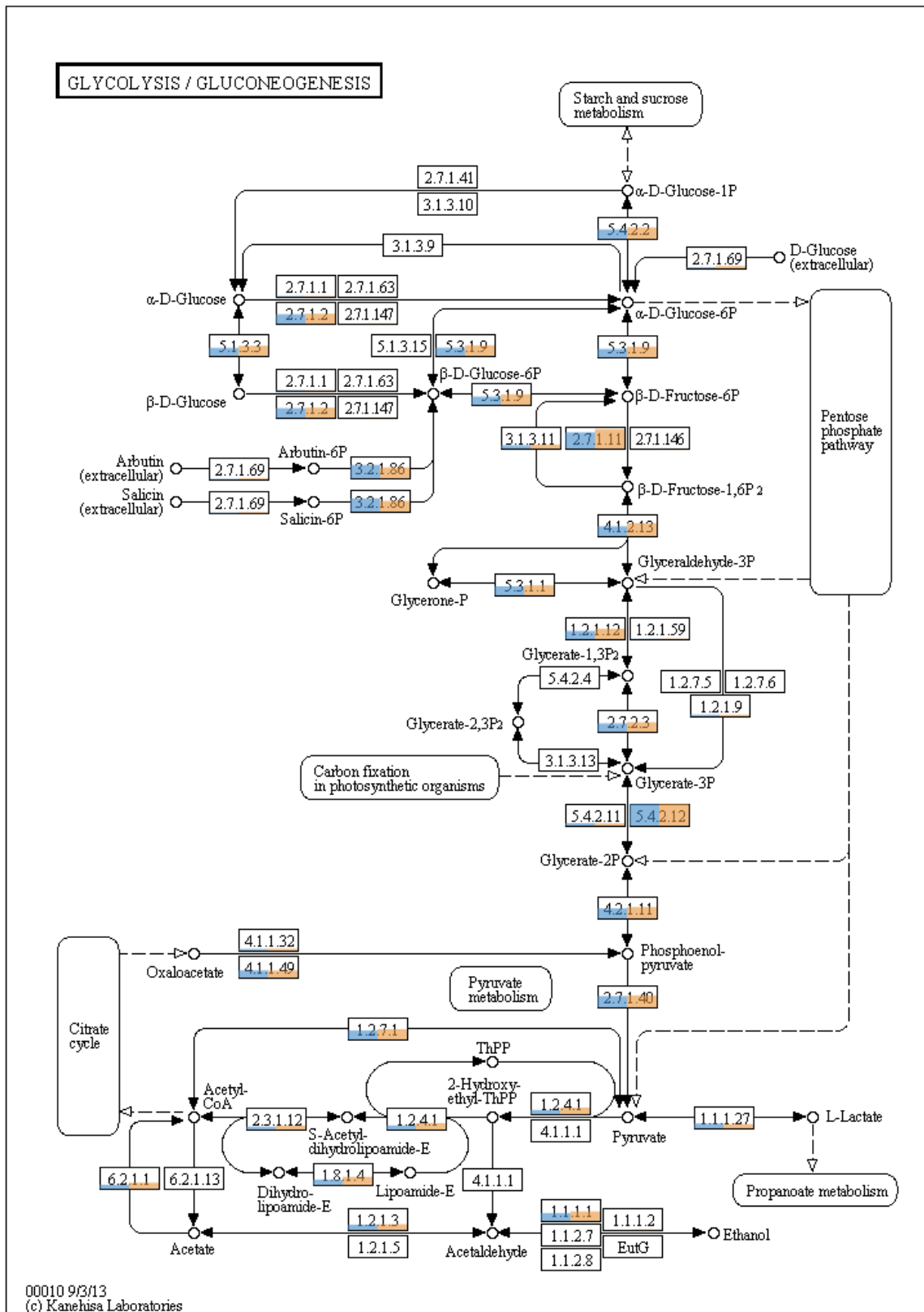


Abbildung 19: Vergleich des Glykolyse-Pathways für die Gemeinschaft einer thermophilen Biogasanlage in stabilem (marker_m_2014) und übersäuertem (marker_m_2015) Zustand. Gezeigt ist die Anzahl zugeordneter Genen in den Metagenomen.

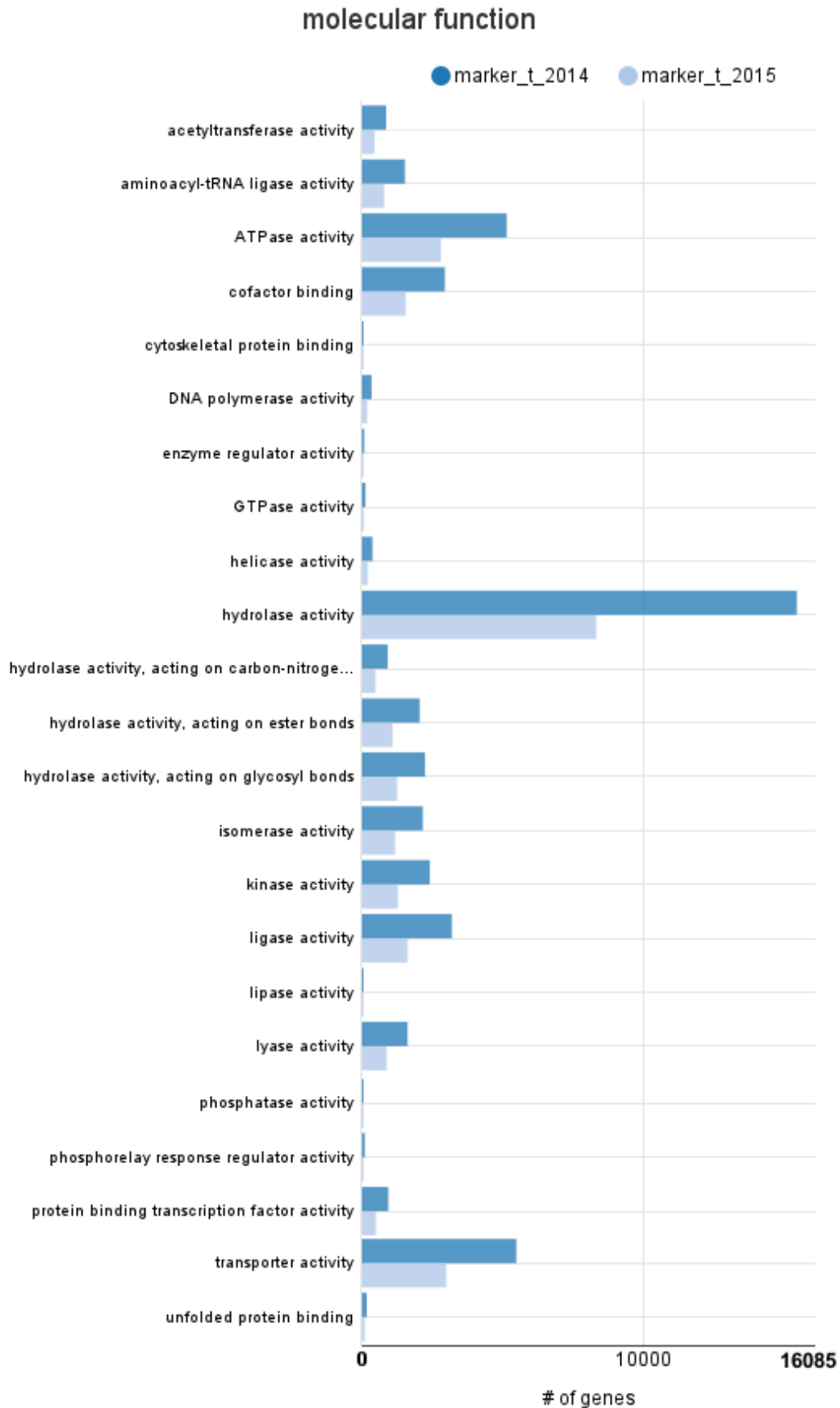


Abbildung 20: Vergleich funktioneller Profile der Gemeinschaft einer thermophilen Biogasanlage in stabilem (marker_t_2014) und übersäuertem (marker_t_2015) Zustand, basierend auf *Gene Ontology* Kategorien. Gezeigt ist die Anzahl der diesen Kategorien zugeordneten Genen in den Metagenomen.

173 0 marker_t_2014
156 0 marker_t_2015

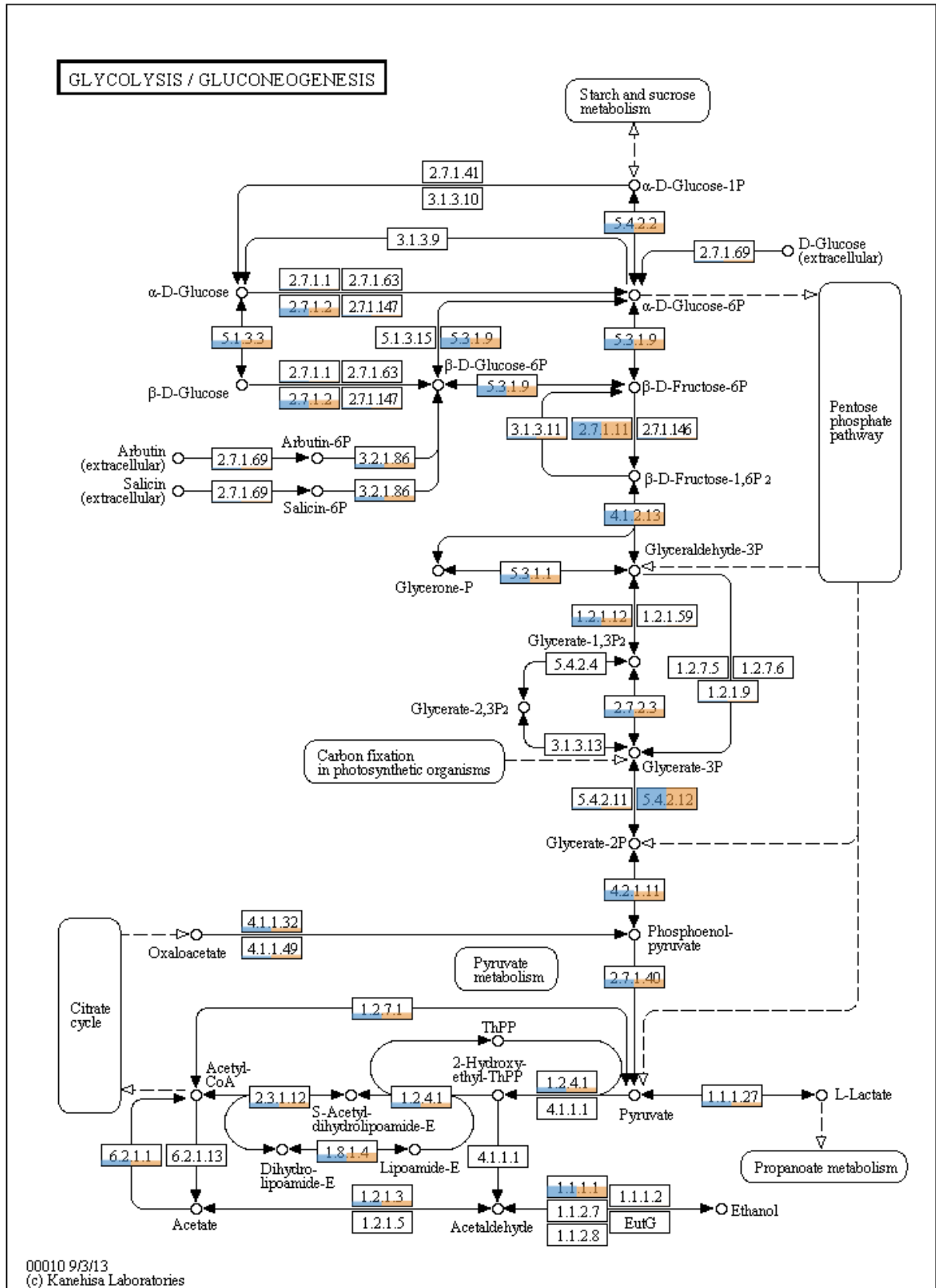


Abbildung 21: Vergleich des Glykolyse-Pathways für die Gemeinschaft einer thermophilen Biogasanlage in stabilem (marker_t_2014) und übersäuertem (marker_t_2015) Zustand. Gezeigt ist die Anzahl zugeordneter Genen in den Metagenomen.

4 Fazit zu Teilprojekt 4

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

- (1) Die Optimierung der DNA- und RNA-Isolierung für Praxisanlagen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Beide Methoden basieren auf bereits publizierten Isolierungs-Verfahren, die an größere Probenmengen und in Bezug auf die Erreichung einer höheren DNA- bzw. RNA-Qualität (Reinheit) angepasst wurden und so DNA/RNA-Proben liefern, die für die moderne Illumina-Sequenzierung geeignet sind. Beide Methoden sind in erschienenen Publikationen beschrieben (LEBUHN *et al.* 2016, STOLZE *et al.* 2016).
- (2) Die optimale Methode zur DNA-Isolierung aus Proben der Technikumsanlagen für eine Verwendung der entsprechenden DNA-Präparationen in qPCR Analysen konnte im Verbundvorhaben ermittelt werden und ist in LEBUHN *et al.* (2016) veröffentlicht. Die gewonnene DNA weist außerdem die für eine Sequenzierung nötige Qualität und Quantität auf, sodass sie für die Sequenzierung von ATB-Fermenter-DNA im Zuge des Verbundvorhabens verwendet werden konnte.
- (3) Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das *RNAlater* Reagenz von ThermoFisher Scientific für die RNA-Konservierung aus Technikums-Fermenterproben (ATB und LfL) sehr gut geeignet ist und sich eine anschließende RNA-Isolierung ohne bedeutende Verluste durchführen lässt. Dieses Ergebnis ist ebenfalls in LEBUHN *et al.* (2016) veröffentlicht. Dies ist auch ein wichtiger Befund für die spätere Untersuchung von Fermenter-Proben zur Früherkennung von Prozessstörungen anhand von Marker-Genen mittels qPCR, bei der die RNA in den Proben bis zur Verwendung intakt bleiben muss.
- (4) Die Ermittlung der idealen Methode zur RNA-Isolierung fand in Kooperation mit dem ATB und der LfL statt. Für die RNA-Isolierung aus den ATB-Fermenter-Proben konnte eine Kit-basierte Methode als zuverlässig bestimmt und daher im Zuge des Verbundvorhabens für die ATB-Fermenter-Proben zur anschließenden Metatranskriptom-Sequenzierung verwendet werden.
- (5) Im Rahmen des Teilprojekts 4 wurde bereits das Metagenom und Metatranskriptom einer thermophilen Biogasanlage untersucht und die Ergebnisse in MAUS *et al.* (2016a) veröffentlicht. Im Vergleich zum weiteren Konzept des Teilprojektes wurde hier keine rRNA-Abreicherung durchgeführt. Indem auf die 16S rRNA Transkripte in Relation zur Kopienzahl der entsprechenden Gene in den Datensätzen fokussiert wurde, konnte zwischen der Abundanz und der transkriptionellen Aktivität einzelner Taxa unterschieden werden. Die festgestellten Unterschiede konnten die Wichtigkeit von Metatranskriptom-Daten zusätzlich zu Metagenom-Daten bestätigen.
- (6) Ein wichtiger Teil des Teilprojekts 4 war die Abreicherung der ribosomalen RNAs aus Gesamt RNA-Proben vor der Erzeugung der Sequenzierbibliotheken. Dafür wurde das *Ribo-Zero rRNA Removal Kit* (Bacteria) von Epicentre am CeBiTec erfolgreich für die RNA-Proben aus den ATB-Fermentern angewendet. Die erzielten Ergebnisse sind in der Publikation von LEBUHN *et al.* (2016) dokumentiert.
- (7) In Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern wurde die Bioinformatik-Plattform *Elastic Metagenome Browser* (EMGB) weiter entwickelt. EMGB dient der komparativen Auswertung und Visualisierung von assemblierten und annotierten Metagenom- und Metatranskriptom-Datensätzen. Das System wurde auch für die Auswertung der im Zuge des Stress-Experimentes erzeugten Datensätze

genutzt. Bislang ist das System nur den Projektpartnern zugänglich und wird weiterhin optimiert.

- (8) Aus den assemblierten Praxisanlagen-Metagenom-Datensätzen erfolgte die Erzeugung und Analyse von *Genome Bins*, die einzelne Spezies in mikrobiellen Gemeinschaften repräsentieren. Analyse der *Genome Bins* erlaubte Einblicke in die Bedeutung der entsprechenden Spezies für den Biogas-Prozess und lieferte Kandidaten-Marker-Gene für ein Monitoring dieser Spezies. Diese Marker-Gene können in Zukunft für die Detektion von Schlüssel-Organismen und Genen als Indikatoren für gestresste Biogasanlagen angewendet werden. Die Methode des *Binnings* wurde in STOLZE *et al.* (2016) für insgesamt fünf Spezies, von denen vier unbekannt waren, angewendet.
- (9) Die transkriptionelle Analyse der erzeugten *Genome Bins* ermöglichte einen weiteren Einblick in die jeweiligen, zugrundeliegenden Spezies und ist vor allem für die Identifikation von differentiell exprimierten Genen von großer Bedeutung. Auf diese Weise kann der *in vivo* vorliegende Transkriptionszustand von Spezies zu einem bestimmten Zeitpunkt untersucht werden, indem Metatranskriptom *Reads* auf die *Genome Bins* zurückgelegt und ihre Abundanzen bestimmt werden. Derzeit wird an einer Publikation gearbeitet, in der die *in vivo* Transkription der bereits erzeugten fünf *Genome Bins* analysiert wird.

4.1 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Gesamtverwendungsnachweis von Seiten des CeBiTecs (Teilprojekt 4) wird separat vorgelegt.

4.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleitete Arbeit

Die für das Projekt bewilligten Mittel wurden ausschließlich zur Erreichung der oben aufgeführten Projektziele eingesetzt. Die Auflistung der im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse zeigt, dass der Mitteleinsatz angemessen war. Die durchgeführten Arbeiten lieferten grundlegende Erkenntnisse zur technischen Herangehensweise sowie zur Erfassung der mikrobiellen Gemeinschaften und der transkriptionellen Aktivität der einzelnen Mikroorganismen in Praxis- und Technikumsanlagen. Die erzeugten Daten und Ergebnisse bieten die Möglichkeit, mikrobielle Stressfaktoren, einzelne Spezies oder die Transkription bestimmter Gene, zu detektieren. In Zukunft können die erzielten Ergebnisse für die frühe Detektion von Stressbedingungen in Biogas-produzierenden Gemeinschaften herangezogen werden. Diesbezüglich ermittelte Daten sind wie oben dargelegt öffentlich zugänglich.

4.3 Nutzen und Verfügbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnisse über die Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in Praxis- und Technikumsanlagen liefern neue Einblicke, sowohl in die taxonomische Zusammensetzung, als auch das genetische und transkriptionelle Profil der Gemeinschaften und einzelner Spezies. Das *Genome Binning* für neue,

unbekannte und dennoch abundanter Spezies (*Bins*) in den Praxisanlagen ermöglicht ihre Charakterisierung auf genetischer und transkriptioneller Ebene und gibt wichtige Hinweise auf ihre Rolle in der Gemeinschaft. Mit Hilfe dieser Methode, die unabhängig von der Kultivierung funktioniert, können viele weitere unbekannt Spezies charakterisiert werden. Sie kann der Identifizierung von Schlüssel-Organismen des Biogas-Prozesses dienen, die in Zukunft als *Inoculum* für Biogasanlagen Anwendung finden können. Ebenso ermöglicht diese Methode und die erzielten Ergebnisse das Auffinden von Spezies, deren Genen und Transkripten, die das Vorliegen von Prozessstörungen anzeigen. Entsprechende Gene und Transkripte können dann als Marker für Prozessstörungen mittels qPCR frühzeitig detektiert werden. Das Stress-Experiment der ATB-Fermenter liefert wertvolle Informationen über Unterschiede in den Gemeinschaften unter stabilen und gestressten Konditionen. Die Auswertung mit Hilfe der EMGB-Plattform ermöglicht das Auffinden von Marker-Spezies, -Genen und -Transkripten, die in Zukunft für die Früherkennung von gestressten Biogas-Gemeinschaften eingesetzt werden können.

Die Rohdaten des Projekts sind im *European Nucleotide Archive (ENA)* unter der *Accession* Nummer PRJEB8813 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB8813>) verfügbar. Unterstützende Datensätze sind in der GigaScience's GigaDB hinterlegt: BREMGES A, MAUS I, BELMANN P, EIKMEYER F, WINKLER A, ALBERSMEIER A, *et al.* (2015): *Supporting data and materials for "Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant"*. GigaScience Database. <http://dx.doi.org/10.5524/100151>.

Die Metagenome der Praxisanlagen sind als Qualitäts-kontrollierte Rohdaten für die jeweiligen zwei biologischen Replikate im *Short Read Archive (SRA)* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* hinterlegt. In der Publikation STOLZE *et al.* (2016) sind die jeweiligen *Links* angegeben damit der Öffentlichkeit zugänglich gemacht worden. Sobald die transkriptionelle Charakterisierung der *Genome Bins* vollständig abgeschlossen ist, werden die Metatranskriptome, sowie die *Genome Bins*, ebenfalls der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Bis die Auswertung der Stress-Versuche und damit der korrespondierenden Metagenome und Metatranskriptome abgeschlossen ist, sind die entsprechenden Daten allen vier Projektpartnern über die Auswertungsplattform EMGB zugänglich. Über eine Veröffentlichung der Daten wird anschließend im Verbund entschieden.

4.4 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Zur Zeit ist keine weitere Studie bekannt, die sich mit der Entwicklung von Markern zur frühzeitigen Stress-Erkennung beschäftigt. Dies trifft sowohl auf Marker-Spezies, als auch auf Marker-Gene zu. Ebenso ist eine Studie über das *Genome Binning* in Kombination mit der Charakterisierung der entsprechenden Transkriptome und daraus möglicherweise resultierender Marker-Gene bzw. -Transkripte bislang nicht bekannt.

4.5 Geplante Veröffentlichungen der erzielten Ergebnisse

Im Rahmen des 'BIOGAS-MARKER' Projektes ist bereits eine gemeinsame Publikation mit den Projektpartnern vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB, TP1), der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL, TP2), der Technischen Universität München (TUM, TP3) und der Beuth Hochschule für Technik Berlin (TP5) über die Isolierung von DNA aus den Technikumsanlagen (ATB und LfL), einer geeigneten RNA-Konservierungsmethode und der rRNA Abreicherung aus Gesamt-RNA Proben aus Biogasanlagen veröffentlicht worden (LEBUHN *et al.* 2016). Eine weitere Veröffentlichungen mit den Ergebnissen der Stress-Versuche der ATB-Fermenter (siehe Kapitel 3.4.2) ist geplant. Eine Publikation über die transkriptionelle Charakterisierung der aus den Praxisanlagen-Metagenomen gewonnenen *Genome Bins* ist derzeit in Arbeit (siehe Kapitel 3.3.3). Bisher vorliegende Veröffentlichungen sind unten gelistet:

Veröffentlichungen

BREMGES A, MAUS I, BELMANN P, EIKMEYER F, WINKLER A, ALBERSMEIER A, PÜHLER A, SCHLÜTER A., SCZYRBA A. (2015): Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. *Gigascience*. 30;4:33.

LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016): DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering*. 3, 7.

MAUS I, KOECK DE, CIBIS KG, HAHNKE S, KIM YS, LANGER T, KREUBEL J, ERHARD M, BREMGES A, OFF S, STOLZE Y, JAENICKE S, GOESMANN A, SCZYRBA A, SCHERER P, KÖNIG H, SCHWARZ WH, ZVERLOV VV, LIEBL W, PÜHLER A, SCHLÜTER A, KLOCKE M (2016): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels*. 11;9:171

STOLZE Y, BREMGES A, MAUS I, RUMMING M, PÜHLER A, SCZYRBA A, SCHLÜTER A (2016): Identification and genome reconstruction of distinct taxa in microbiomes from four different production-scale biogas plants. *Biotechnology for Biofuels*. 26;9:156.

4.6 Präsentation der Ergebnisse in der Öffentlichkeit

- Teilnahme und Präsentation im Rahmen des „*Biogas Competence Network* (BCN) Statusseminars 2013“ (Frankfurt am Main, Deutschland, 2013)

Titel der Präsentation: "Metatranskriptom-Analysen für Biogas-produzierende mikrobielle Gemeinschaften"

- Teilnahme und Präsentation im Rahmen des „2nd CeBiTec Retreat“ (Loccum, Deutschland, 2014)

Titel der Präsentation: "*Next generation sequencing to uncover the microbiology and the functional potential of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants*"

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

Titel der Präsentation: *“16S rDNA, metagenome and corresponding metatranscriptome sequencing of four different production-scale biogas plants for taxonomic and functional analyses“*

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des "10th CeBiTec Symposium 'Bioinformatics for Biotechnology and Biomedicine'" (Bielefeld, Deutschland, 2015).

Titel der Präsentation: *"Comparative taxonomic and functional analyses of microbial communities prevailing in four different production-scale biogas plants using 16S rDNA, metagenome and metatranscriptome sequencing "*

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des "3rd International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance (EDAR 3) (Wernigerode, Germany, 2015).

Titel der Präsentation: *"A bioinformatics pipeline for the detection of beta-lactamase genes in metagenome sequence data and its application to production-scale biogas plants“*

- Teilnahme und Vortrag auf der "6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics (ProkaGENOMICS)" (Göttingen, Germany, 2015).

Titel des Vortrags: *„Deep metagenome and metatranscriptome analyses for biogas-producing microbial communities from agricultural biogas plants“*

- Teilnahme und Präsentation im Rahmen des „Biogas Competence Network (BCN) Statusseminars 2015“ (Berlin, Deutschland, 2015)

Titel der Präsentation: *"Metatranskriptom-Analysen für Biogas-produzierende mikrobielle Gemeinschaften"*

- Teilnahme und Präsentation im Rahmen des „3rd CeBiTec Retreat“ (Loccum, Deutschland, 2016)

Titel der Präsentation: *"Identification and genome reconstruction of distinct taxa in microbiomes from four different production-scale biogas plants."*

I Referenzen

- BLOM J, ALBAUM SP, DOPPMEIER D, PUHLER A, VORHOLTER F, ZAKRZEWSKI M, GOESMANN A (2009):** EDGAR: A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* 10:154.
- BLOM J, KREIS J, SPÄNIG S, JUHRE T, BERTELLI C, ERNST C et al. (2016):** EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Research* 44:W22-W28.
- BOISVERT S, RAYMOND F, GODZARIDIS É, LAVIOLETTE F, CORBEIL J (2012):** Ray Meta: scalable *de novo* metagenome assembly and profiling. *Genome Biology* 13:R122.
- BRAY NL, PIMENTEL H, MELSTED P, PACTER L (2016):** Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34:525-527.
- BREMGES A, MAUS I, BELMANN P, EIKMEYER F, WINKLER A, ALBERSMEIER A, PÜHLER A, SCHLÜTER A, SCZYRBA A (2015):** Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. *Gigasience* 4:33.
- BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH (2014):** Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 12:59-60.
- CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, LOZUPONE CA, TURNBAUGH PJ, FIERER N, KNIGHT R (2011):** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, Suppl. 1:4516-22.
- EIKMEYER FG, RADEMACHER A, HANREICH A, HENNIG M, JAENICKE S, MAUS I, WIBBERG D, ZAKRZEWSKI M, PÜHLER A, KLOCKE M, SCHLÜTER A (2013):** Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. *Biotechnol. Biofuels* 6:49.
- GUBLER U, HOFFMAN BJ (1983):** A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
- HENNE A, DANIEL R, SCHMITZ RA, GOTTSCHALK G (1999):** Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3901-3907.
- HUSON DH, MITRA S, RUSCHEWEYH H, WEBER N, SCHUSTER SC (2011):** Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research* 21:1552-1560.
- HYATT D, LOCASCIO PF, HAUSER LJ, UBERBACHER EC (2012):** Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences. *Bioinformatics* 28:2223-2230.
- KANG DD., FROULA J, EGAN R, WANG Z (2015):** MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *Peer J.* 3:e1165.
- KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, PEPLIES J, QUAST C, HORN M, GLÖCKNER FO (2013):** Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:e1.
- KRAUSE L, DIAZ NN, EDWARDS RA, GARTEMANN KH, KRÖMEKE H, NEUWEGER H, PÜHLER A, RUNTE KJ, SCHLÜTER A, STOYE J, SZCZEPANOWSKI R, TAUCH A, GOESMANN A (2008):** Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136:91-101.
- KRÖBER M, BEKEL T, DIAZ NN, GOESMANN A, JAENICKE S, KRAUSE L, MILLER D, RUNTE KJ, VIEHÖVER P, PÜHLER A, SCHLÜTER A (2009):** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 142:38-49.

- LANGMEAD B, SALZBERG SL (2012):** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9:357-359.
- LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W, KLOCKE M (2016):** DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering* 3:7.
- LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, FENNELL T, RUAN J, HOMER N, MARTH G, ABECASIS G, DURBIN R, (2009):** 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
- LUDWIG W, STRUNK O, WESTRAM R, RICHTER L, MEIER H, YADHUKUMAR, BUCHNER A, LAI T, STEPPI S, JOBB G, FÖRSTER W, BRETTSCHE I, GERBER S, GINHART AW, GROSS O, GRUMANN S, HERMANN S, JOST R, KÖNIG A, LISS T, LÜSSMANN R, MAY M, NONHOFF B, REICHEL B, STREHLOW R, STAMATAKIS A, STUCKMANN N, VILBIG A, LENKE M, LUDWIG T, BODE A, SCHLEIFER KH (2004):** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32:1363-1371.
- MAUS I, CIBIS KG, BREMGES A, STOLZE Y, WIBBERG D, TOMAZETTO G, BLOM J, SCZYRBA A, KÖNIG H, PÜHLER A, SCHLÜTER A (2016a):** Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *J. Biotechnol.* 232:50-60.
- MAUS I, KOECK DE, CIBIS KG, HAHNKE S, KIM YS, LANGER T, KREUBEL J, ERHARD M, BREMGES A, OFF S, STOLZE Y, JAENICKE S, GOESMANN A, SCZYRBA A, SCHERER P, KÖNIG H, SCHWARZ WH, ZVERLOV VV, LIEBL W, PÜHLER A, SCHLÜTER A, KLOCKE M (2016b):** Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnol. Biofuels* 9:171.
- MEYER F, GOESMANN A, MCHARDY AC, BARTELS D, BEKEL T, CLAUSEN J, KALINOWSKI J, LINKE B, RUPP O, GIEGERICH R, PÜHLER A (2003):** GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Research* 31:2187-2195.
- PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW (2015):** CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* 25:1043-1055.
- SCHLÜTER A, BEKEL T, DIAZ NN, DONDRUP M, EICHENLAUB R, GARTEMANN KH, KRAHN I, KRAUSE L, KRÖMEKE H, KRUSE O, MUSSGNUG JH, NEUWEGER H, NIEHAUS K, PÜHLER A, RUNTE KJ, SZCZEPANOWSKI R, TAUCH A, TILKER A, VIEHÖVER P, GOESMANN A (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136:77-90.
- STOLZE Y, BREMGES A, MAUS I, RUMMING M, PÜHLER A, SCZYRBA A, SCHLÜTER A (2016):** Identification and genome reconstruction of distinct taxa in microbiomes from four different production-scale biogas plants. *Biotechnol. Biofuels* 9:156.
- STOLZE Y, ZAKRZEWSKI M, MAUS I, EIKMEYER F, JAENICKE S, ROTTMANN N, SIEBNER C, PÜHLER A, SCHLÜTER A (2015):** Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol. Biofuels* 8:14.
- SUNDBERG C, AL-SOUD WA, LARSSON M, ALM E, YEKTA SS, SVENSSON BH, SØRENSEN SJ, KARLSSON A (2013):** 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:612-626.
- WIRTH R, KOVÁCS E, MARÓTI G, BAGI Z, RÁKHELY G, KOVÁCS KL (2012):** Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5:41.

ZAKRZEWSKI M, GOESMANN A, JAENICKE S, JÜNEMANN S, EIKMEYER F, SZCZEPANOWSKI R, ALSOUD WA, SØRENSEN S, PÜHLER A, SCHLÜTER A (2012): Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput meta-transcriptome sequencing. *J. Biotechnol.* 158:248-258.

II Anhang

DNA-Extraktionsprotokoll für Biogas-Fermentationsproben

Materialien:

- 1x *Phosphate buffered saline* Puffer (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) (Liter, 4°C)
- 1x *CTAB containing DNA extraction buffer* (DEP, nach HENNE *et al.* 1999)
- Chloroform und Isoamylalkohol (24:1 gemischt)
- Isopropanol (2-Propanol)
- 1x Tris-EDTA Puffer (TE, 1m mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- Pronase ε (5 mg in 2 ml DEP pro Probe)
- RNase (20mg/ml)
- 10%iges *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS)
- 70%iges Ethanol
- Falten-Filter (Schleicher & Schuell, Typ Faltenfilter 520 a ½, 15 – 18µm Porengröße)
- NucleoBond AX-G (Macherey-Nagel, REF 740544) Säulen und Lösungen

Vorgehen:

1. Abwiegen von 2 x 26 g Probe pro biologisches Replikat
2. Zugabe von 50 ml PBS, mischen
3. Mischung in entsprechend große Zentrifugengefäße überführen
4. Zentrifugieren bei 9.000xg, 5 Minuten, RT
5. Überstand verwerfen
6. Pellet aufnehmen in 50 ml PBS
7. 4 Minuten auf einem Schüttler schütteln, RT, höchste Stufe
8. Zentrifugieren 200xg, 5 Minuten, RT
9. Überstand sammeln (Erlenmeyerkolben)
10. 2x wiederholen von Schritt 6-9 (Bakterien befinden sich im Überstand)
11. Gesammelter Überstand (ca. 150ml) zentrifugieren bei 9.000xg, 5 Minuten
12. Zellpellet in ca. 40 ml PBS resuspendieren und in 50 ml Schraubgefäßen überführen
13. Zentrifugieren bei 5.000xg für 15 Minuten
14. Überstand verwerfen
15. Pellet kann bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren werden
16. Pellet auftauen und in 40 ml DEP aufnehmen
17. Zugabe von Pronase ε und 100 µl RNase

18. Schütteln bei 180 rpm, 37°C, 1 Stunde
19. Zugabe von 3 ml 10 % SDS
20. Inkubieren bei 65°C (Wasserbad), 2 Std., alle 15 Minuten invertieren (nicht schütteln!)
20. Zentrifugieren 10 Minuten, bei 3.900 x g
21. Chloroform/Isoamylalkohol mischen
22. Überstand über Falten-Filter geben
23. CIA mit Filtrat 1:1 mischen (eventuell aufteilen auf 2 x 50 ml Schraubdeckelgefäße)
24. Zentrifugieren 5 Minuten, 8.000 g, 4°C
25. Obere Phase abnehmen
26. 22. und 23. mit frischen CIA und Oberer Phase wiederholen
27. DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol mischen, invertieren
28. 1 Stunde bei RT inkubieren
29. Zentrifugieren 20 Minuten bei 9.000g, 4°C
28. Pellet in 2 ml N2 Puffer lösen (NucleoBond Lösung)
30. Inkubieren über Nacht bei 60°C
31. NucleoBond Säulen mit N2-Puffer aquilibrieren
32. 2 ml DNA-Lösung auf die Säulen geben
33. Säulen 3x mit N3 waschen
34. DNA mit 1 ml N5 eluieren und auffangen
35. DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol mischen, invertieren
36. 1 Stunde bei RT inkubieren
37. Zentrifugieren bei 14.000 x g, 25 Minuten, 4°C
38. Pellet mit 70% Ethanol waschen, trocknen
39. Pellet in 100 µl TE aufnehmen und Ü/N bei 4°C inkubieren

RNA-Extraktionsprotokoll des CeBiTec für Biogas-Fermentationsproben

Materialien:

- 1x Tris-EDTA Puffer (TE, 1m mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) (4°C)
- Saures Phenol (4°C)
- 2-Mercaptoethanol
- 95%iges Ethanol
- Filter für 50 ml Schraubdeckelgefäße (BD Falcon Fer.: 352340, 40 µm Nylon)
- 15ml und 50ml Schraubdeckelgefäße
- Sterile Glaskugeln (0,1 mm Durchmesser)

- RNeasy Midi Kit (Qiagen)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- RNase free DNase-Kit (Qiagen)
- DNase recombinant I RNase free (Roche)
- Vortex Adapter für 4 x 15 ml Schraubdeckelgefäße (13000-V1-15)
- Centrifuge Filter Units (Millipore)

Vorgehen:

1. Pro biologisches Replikat 4 x 4,4 g Fermenterprobe abwiegen
2. Zugabe von 1,5 ml TE (4°C) pro technisches Replikat und mischen
3. Mischung auf Filter und Zugabe von 0,75 ml TE (4°C)
4. Zentrifugieren bei 4.000 rpm, 2 Minuten
5. Ggf. nochmal zentrifugieren auf neuem Filter, falls verstopft, Durchfluss sammeln
6. Gleichen Volumen saures Phenol (4°C) zugeben und mischen
7. Durchfluss in 15 ml Schraubdeckelgefäße mit Glasskugeln überführen
8. 2 x 4 Minuten auf dem Vortex Adapter vortexen
9. Zwischendrin auf Eis kühlen.
10. Zentrifugieren bei 5.500 x g, 5 Minuten
11. Obere, wässrige Phase sammeln in Schraubdeckelgefäßen (50 ml)
12. Schritt 10 und 11 mit dem Überstand wiederholen für den Fall von Phasenbildung

Ab hier wird das RNeasy Midi kit verwendet (die Bezeichnungen der Lösungen sind aus dem Kit)

13. Pro 1 ml Probe 4 ml RLT (inklusive 2-Mercaptoethanol) hinzugeben
14. Pro 1 ml Probe (ohne RLT) 2,8 ml 95%iges Ethanol zugeben
15. Auftragen von 4 ml Probe pro Säule (wegen Verstopfen am besten 2 Säulen pro Replikat)
16. Zentrifugieren bei 5.000 x g für 5 Minuten, Durchfluss verwerfen
17. Schritt 15+16 wiederholen, bis die Probe aufgebraucht ist
18. Durchlauf verwerfen
19. Zugabe von 4 ml RW1 pro Säule
20. Zentrifugieren bei 5.000 x g, 5 Minuten RT, Durchlauf verwerfen
21. Zugabe von 2,5 ml RPE pro Probe
22. Zentrifugieren bei 5.000, 2 Minuten, RT, Durchlauf verwerfen
23. Wiederholen von 21. + 22.
24. Zentrifugieren bei 5.000 xg, 5 Min, RT

25. Säule in neues 15 ml Schraubdeckelgefäß
26. Zugabe von 150 µl RNase freiem Wasser, inkubieren 1 Min.
27. Zentrifugieren @ 5.000 x g, 3 Min, RT, Durchlauf behalten!!
28. Wiederhole 26+ 27
29. Lagern der RNA bei -80°C
30. Verbleibende DNA in den Proben wird mittels der DNase I (Roche) und der DNase und dem RNeasy Mini Kit (beides Qiagen), den jeweiligen Gebrauchsanleitungen folgend, nacheinander entfernt.

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema: **Bioindikatoren der Biogasfermentation**
Teilprojekt 5: Pathogen-Diagnostik für Biogasreaktoren

Förderkennzeichen: 03SF0440D

Zuwendungsempfänger: Beuth Hochschule für Technik Berlin
Fachbereich V - Studiengang Biotechnologie
Forum Seestrassen, Seestrassen 64
13347 Berlin

Berichtverfasser: M.Sc. Susanne Helbig
M.Sc. Susanne Fischer

Kontakt: Prof. Dr. Steffen Prowe
Tel.: 030/4504-3903, Fax: 030/4504-663903
Email: steffen.prowe@beuth-hochschule.de

Inhaltsverzeichnis

1	Kurze Darstellung zum Teilprojekt 5	261
1.1	Aufgabenstellung	261
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	261
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	263
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	263
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	263
2	Eingehende Darstellung des Teilprojektes 5	265
2.1	Erzielte Ergebnisse im TP 5.....	265
2.1.1	Auswahl der pathogenen Indikatorkeime	265
2.1.2	Kurzvorstellung der ausgewählten pathogenen Mikroorganismen.....	269
2.1.3	Grundsätzliches Vorgehen zur Etablierung der qPCR	271
2.1.4	Etablierung der Quantitativen PCR der pathogenen Mikroorganismen	275
2.1.5	Etablierung dieses real-time PCR Assays zur Anwendung in Biogasproben....	285
2.1.6	Integration einer Internen Amplifikations-Kontrolle (IAC)	285
2.1.7	Evaluation der PCR-Assays.....	288
2.1.8	Untersuchung von Biogasproben aus Praxisanlagen mit Beurteilung der Robustheit der Nachweissysteme.....	291
3	Abschlussbetrachtung des TP5	297
3.1	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	297
3.2	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	297
3.3	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	297
3.4	Fort297schritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	297
3.5	Darstellung der erfolgten Veröffentlichung der Ergebnisse.....	298
4	Zitierte Literatur	299

1 Kurze Darstellung zum Teilprojekt 5

1.1 Aufgabenstellung

Im Gesamtprojekt des Verbundvorhabens sollen molekulare Marker für Biogasanlagen entwickelt werden, so dass anhand dieser Indikatoren optimierte Strategien zur Verbesserung der Biogasproduktion entworfen werden können. Denn durch eine Benennung und quantitative als auch qualitative Erfassung der an der Biogasbildung beteiligten Mikroorganismen kann ein besseres Verständnis der Biogas-Mikrobiologie resultieren. Nutzbringende Mikroorganismen sind in diesem Zusammenhang fermentative und acetogene Bakterien, chemoorganotrophe Archaeen sowie die methanbildenden Archaeen.

Ziel des Teilprojektes ist hierbei die Entwicklung einer mikrobiologischen Schnellmethode auf Basis einer quantitativen real-time PCR zur Detektion von pathogenen Spezies in Biogasanlagen. Pathogene Spezies können zum einen als Indikator für eine Störung von Prozessen dienen. Zum anderen ist ihr Monitoring auch relevant, um eine ökologisch sinnvolle Nutzung der Biogas-Technologie bei den Nachsorgeprozessen nach der Vergasung (Entsorgung der Schlempe; Bereitstellung als Dünger oder Biokohle) abzusichern. Somit ermöglicht das Monitoring von Pathogenen die rechtzeitige Erfassung von aus Sicht der Biosicherheit potentiellen Auswirkungen dieses Bioprozesses.

Gemeinsam mit den aus den anderen Teilprojekten hervorgehenden Systemen können sich die hier zu entwickelnden Assays zur Früherkennung und Diagnose von Prozessstörungen als auch zur Überwachung und Erkennung von Gesundheitsgefährdungen an Arbeitsplätzen einsetzen lassen.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

An der Beuth Hochschule für Technik Berlin wird im Studiengang Biotechnologie u.a. das Thema Biogas vermittelt. Im Labor für Mikrobiologie wird unter der Leitung von Prof. Dr. Steffen Prowe anwendungsorientierte, mikrobiologische Diagnostik erarbeitet. In einem Labor der Schutzstufe 2 nach BioStoffV für Arbeiten mit Mikroorganismen der Risikogruppe 2 können mittels qPCR Systeme zur Detektion und (quantitativen) Identifizierung erforscht werden. So können auch innerhalb der Stoffflussskette der Biogasherstellung Nachweissysteme auf qPCR-Basis für relevante Spezies erstellt werden.

Gegenüber den Voraussetzungen des Projektantrages hat sich die Relevanz des Themas des TP 5 nicht wesentlich verändert. Nach wie vor stellt die Produktion von methanhaltigem Biogas aus landwirtschaftlichen Reststoffen und Pflanzenmaterial einen wesentlichen Bestandteil in der nachhaltigen und CO₂-neutralen Landbewirtschaftung und Energieproduktion dar. Am häufigsten werden in Biogasreaktoren nachwachsende Rohstoffe wie Maissilage, Körnergetreide, Grassilage und Getreide-Ganzpflanzensilagen vergoren, entweder als ausschließliches Substrat oder in Kombination mit Wirtschaftsdüngern wie Rinder- oder Schweinegülle. Es ist zu erwarten, dass diesen Substraten auch zukünftig große Bedeutung zukommen wird.

Innerhalb einer komplexen und dynamischen mikrobiellen Biozönose erfolgt der Aufschluss und der Abbau der organischen Biomasse zu Biogas. Die in pflanzlicher Biomasse gespeicherten langkettigen Kohlenhydrate wie z.B. Cellulose oder Hemicellulose werden dabei in Oligo- und Monomere der jeweiligen Zuckerverbindungen gespalten (Hydrolyse) und in der Folge zu Säuren, Alkoholen und anderen Intermediaten umgesetzt. Ein zentrales Produkt der Acetogenese ist Essigsäure, welche im Weiteren entweder in Methan und Kohlendioxid gespalten (acetoklastische Methanogenese) oder zu Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff oxidiert (syntrophe Acetat-Oxidation) wird. Auch letztere können zu Methan und Wasser umgesetzt werden (hydrogenotrophe Methanogenese). Methan ist die energieliefernde Komponente des Biogases und kann unter optimalen Bedingungen bis zu 80% des Biogases ausmachen.

Innerhalb dieses komplexen Konsortiums verschiedenster Mikroorganismen befinden sich aufgrund des Wertstoffeintrags (silagierte Materialien, Gülle) auch pathogene Mikroorganismen, die innerhalb des Verfahrens auch weiter angereichert werden könnten. Die in den an den Arbeitspaketen 1-4 beteiligten Arbeitsgruppen erarbeiteten Ergebnisse und entsprechend vorliegende Vorarbeiten ließen es grundsätzlich zu, den Nachweis anderer Gruppen von Mikroorganismen zu etablieren. Aus gesellschaftlicher Sicht besteht eine hohe Nachfrage auch das mikrobiologische Risiko von Biogasfermentationen insbesondere bei der Verwertung von Gärresten in Bezug auf pathogene Mikroorganismen zu untersuchen und dafür auch Nachweissysteme zu etablieren. Aus wirtschaftlicher Sicht ergibt sich dann in Folge die Frage nach der Notwendigkeit und Effizienz von Hygienisierungsverfahren sowie nach der Betrachtung der Verwertungsketten. Zudem muss der Eintrag pathogener Spezies durch den Substrateintrag als auch den Austrag der restverwertbaren Stoffe in weitere Verwertungsketten (z.B. Landwirtschaft) erfasst werden. Auch Aspekte des Arbeitsschutzes sollten hier betrachtet werden.

Grundlegende Untersuchungen mittels 16S rDNA Analyse (DOHRMANN *et al.* 2010) untersuchten die Population einer Biogasanlage auch hinsichtlich Clostridia. Die Herkunft von pathogenen Spezies kann über die Methode nachweislich gut ermittelt werden (LEBUHN *et al.* 2004). Bisher war keine Festlegung auf Indikator-Spezies für eine pathogene Belastung erfolgt, die relevant für die Beurteilung der Vor- und Nachbereitung der Biogasherstellung wäre. Abhängig vom Anlagen- und Substartyp kann hier auch keine pauschale Festlegung getroffen werden. Dennoch war vor Beginn des TP 5 aus einer Reihe von Studien bekannt, welche Spezies als Silageschädlinge auftreten (LEBUHN *et al.* 2004) und welche Spezies auf Grund von Einträgen aus der Tiermast über Gülle (GARCÉS *et al.* 2006, LEBUHN *et al.* 2003) oder Putendung (z.B. wie in LUND *et al.* 2004, BAUER *et al.* 2008) ein potentiell Target darstellen. Daher wurden neben Clostridia noch phytopathogene Spezies ausgewählt, die –vom Substrat abhängig– in unterschiedlicher Quantität vorhanden sind. Eine Selektion relevanter Spezies erfolgte daher auf Basis dieser vorhandenen Erkenntnisse zum Projektstart.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Innerhalb des Verbundes bestand die Aufgabe im TP 5 in der Definition relevanter Mikroorganismen als auch eine Etablierung von qPCR-Nachweissystemen für diese.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die technischen Voraussetzungen für die Biogasproduktion waren bei den Partnern am ATB Potsdam-Golm als auch an der LfL in Weihenstephan vorhanden. Zudem wurden Proben aus Praxisanlagen der Firma GICON GmbH zur Verfügung gestellt. In enger Abstimmung zwischen allen Partnern wurden die gleichen Probenmaterialien verwendet, um die Teilprojekt-spezifischen Analysen durchzuführen.

Der aktuelle Stand der Fachliteratur als auch der genutzten Dienste (DNA und RNA Datenbanken, Software) ist hier folgend dargestellt.

Datenbankdienste

Es wurden die Datenbankdienste der NCBI zur Recherche von DNA-Sequenzen genutzt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Software

Neben der mit einer Lizenz vorhandenen umfangreichen Auswertesoftware Geneious® (<http://www.geneious.com>) wurden z.T. noch unterschiedliche Tools zur Berechnung der DNA-Schmelzkurven herangezogen.

Genutzte Fachliteratur

Siehe Literaturliste im Anhang

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die 5 Partner des Verbundprojektes trafen sich im halbjährigen Zyklus, um vor Ort während der Verbundtreffen die Fortschritte und Absprachen zu diskutieren. Zudem fanden auch BMBF Vernetzungstreffen statt unter Einbindung des Biogas Competence Network e.V. (BCN).

Die an der Beuth Hochschule für Technik Berlin im Studiengang Biotechnologie durchgeführten Bachelor- und Masterforschungsprojekte (FP) und -Abschlussarbeiten wurden durch die Kolleginnen und Kollegen des Studiengangs im jeweiligen Prüfungsausschuss aktiv unterstützt:

Alisa Trippner (Masterarbeit)

Peter Rinck (Masterarbeit)

Nina Sperling (Masterarbeit)

Susanne Fischer (Masterarbeit)

Tatiana Kelbert (Masterarbeit)

Kathrin Kelemen (Bachelorarbeit, Masterarbeit)

Zudem wurden im Rahmen von Praxisphasen die folgenden Studierenden aktiv in das Projekt eingebunden:

Franziska Hannemann (Master-FP)

Tatiana Kelbert (Master-FP)

Kathrin Kelemen (Master-FP)

Sukanija Thillainadarasan (Bachelor Praxisprojekt)

2 Eingehende Darstellung des Teilprojektes 5

2.1 Erzielte Ergebnisse im TP 5

2.1.1 Auswahl der pathogenen Indikatorkeime

Biogasreaktoren können u.a. ein Gesundheitsrisiko für das Betriebspersonal von Biogasanlagen bergen. Weiterhin scheint auch eine potentielle Gefahr für die Verbreitung krankheitserregender Mikroorganismen von der Ausbringung der Gärreste in Form von Dünger in der Landwirtschaft auszugehen (FACHVERBAND BIOGAS e. V., 2014). Somit ergibt sich die Notwendigkeit, diejenigen Pathogenen schnell und mit hoher Funktionalität zu detektieren und zu quantifizieren, die über das Substrat in die Reaktoren eingebracht werden, hierbei den gesamten Prozess überleben und infolgedessen auch in den Gärresten wiedergefunden werden können.

Zunächst erfolgte über eine Literaturrecherche die Bestimmung der Relevanz von pathogenen Bakterien-Spezies in Biogas-Anlagen. Dabei wurden aus Publikationen Informationen zu insgesamt 38 bakteriellen Pathogenen bezüglich der Taxonomie (ihrer Familie, Gattung und Art), Spezies-Beschreibung, Risikoklasse, dem Pathogentyp, Wirt, der auslösenden Krankheit, Toxinbildung, dem Vorkommen und den Wachstumsansprüchen aufgelistet (Daten nicht gezeigt). Über ein Punktesystem und über eine Pro- und Kontra-Bewertung die Relevanzeinstufung dieser aufgelisteten Pathogene (**Tabelle 1** und **Tabelle 2**) erfolgte eine Priorisierung. Diese basierte auf den im Projekt gegebenen Biogasfermentationsbedingungen, welche ein Fermenterbetrieb bei einer Temperatur von 38°C oder 55°C darstellen sowie die Substrate Grassilage und Rindergülle als Animpfmedium. Als relevante Pathogene wurden diejenigen betrachtet, die 1.) im Substrat vorkommen, 2.) für die bekannt ist, dass sie in Biogasanlagen auftreten und 3.) die im Biogasprozess nicht abgetötet werden. Für die Erfüllung dieser drei Kriterien wurde jeweils ein Relevanzpunkt vergeben. Zudem erfolgte eine Berücksichtigung der bereits vorhandenen qPCR-Nachweissysteme (LEBUHN 2004).

Die maximale Relevanzpunktzahl von drei erreichte zum einen das Phytopathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg). Xtg verursacht bakterielle Gräserwelke und kann somit über das Substrat Grassilage in den Biogasprozess eingebracht werden. In bisherigen Untersuchungen wurde Xtg in Biogasanlagen nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass Xtg im Biogasfermenter bis zu 50 Tage bei mesophilen Temperaturen (38°C) überlebt (SEIGNER *et al.* 2012). Weitere Pathogene mit drei Relevanzpunkten waren *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens*. Verschiedene andere Clostridien-Arten wie beispielsweise *C. tetani*, *C. botulinum* oder *C. gigas* folgten mit zwei Relevanzpunkten. Die Relevanz der Clostridien ist begründet durch das Vorhandensein in Rindergülle, ihrer Eigenschaft zur Toxinbildung und ihrer guten Überlebensfähigkeit bedingt durch die Fähigkeit zur Endosporenbildung. *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* wurden bereits in Biogasanlagen nachgewiesen (EIKMEYER *et al.* 2013). Auch der Sporen- und Toxin-bildende *Bacillus cereus* konnte in Biogasanlagen detektiert werden (LEBUHN *et al.* 2004) und ist daher mit zwei erhaltenen Relevanzpunkten als wichtiges Pathogen zu betrachten, ist aber wegen seiner vorwiegend aeroben Lebens-

weise zunächst nachrangig betrachtet worden. Ebenfalls zwei Relevanzpunkte wurden dem Humanpathogen *Listeria monocytogenes* zugewiesen. Dieses in Gülle vorkommende Pathogen wurde nach 60 Tagen bei 37°C in einem Biogasfermenter nachgewiesen (GOBERNA *et al.* 2011). Unter thermophilen Prozess-Bedingungen wird *Listeria* jedoch innerhalb von 24 h abgetötet (WAGNER *et al.* 2008). In den folgenden **Tabelle 1** und **Tabelle 2** ist eine Zusammenfassung dieser Relevanzbetrachtung enthalten. Als relevante Pathogene wurden danach diejenigen betrachtet, die 1.) im Substrat nachweislich vorkommen, 2.) für die bekannt ist, dass sie in Biogasanlagen auftreten und 3.) die im Biogasprozess nicht abgetötet werden. Für die Erfüllung dieser drei Kriterien wurde jeweils ein Relevanzpunkt vergeben.

Im Rahmen einer Masterarbeit (TRIPPNER 2013) wurden daher für das TP5 als relevante Mikroorganismen Clostridien (hier die Spezies *C. difficile* und *C. sordellii*), Listerien (hier die Spezies *L. monocytogenes*) und Pythopathogene der Art *Xanthomonas* (hier die Spezies *X. translucens* pv. *graminis*, kurz Xtg) definiert.

Tabelle 1: Relevanzbeurteilung von 38 bakteriellen Pathogenen mittels Literaturrecherche

Pathogen	Relevanzbeurteilung			Vorkommen			Abtötung			Relevanz-Punkte	Literatur
	Pro	Kontra		Grassilage (+1 RP)	Rindergülle (+1 RP)	Biogas (+1 RP)	mesophil (-1 RP)	thermophil (0 RP)	nicht (-+1 RP)		
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	relevant wegen Gräserbefall			1	0	1			1	3	Seigner et al., 2012; Maes et al., 1996
<i>Clostridium perfringens</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor	Gräser-Befall ist Standortabhängig, thermophile Abtötung nicht getestet?		1	1	1			1	3	Eikmeyer et al., 2013; Leubhn et al., 2004
<i>Clostridium difficile</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor	Nachweisverfahren für RNA Typen (16S-23S Spacer Region) Amplicon Diagnostik		1	1	1			1	3	Eikmeyer et al., 2013
<i>Listeria monocytogenes</i>	in Anaerobic Digestion- und Gülleproben vorhanden (Nachweis über Kultivierung [1]); assoziiert mit Rindergülle, -abfall/-eines der 5 gefährlichsten Rinderabfall-Pathogene [2]; nach 60-tägiger Verweilzeit in mesophilen (37°C) Anaerobic Digestion-Reaktor vorhanden [3]	Abtötung nach 24 h bei thermophilen Bedingungen in Anaerobic Digestion (Nachweis über Kultivierung) [4]		1	1	1		0		2	[1] Bonetta et al., 2011; [2] Klein et al., 2010; [3] Goberna et al., 2011; [4] Wagner et al., 2008
<i>Clostridium botulinum</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Song et al., 2002; Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium chauvoei</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Bagge, 2009; Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium gigas</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium haemolyticum</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Bagge, 2009; Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium novyi</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium piliforme</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium septicum</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium sordellii</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse		1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clostridium sporiforme</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor			1					1	2	Bagge, 2009; Song et al., 2002
<i>Clostridium tetani</i>	verschiedenste <i>Clostridium</i> -Spezies kommen im Biogas vor	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse		1					1	2	Eikmeyer et al., 2013
<i>Bacillus cereus</i>						1			1	2	Leubhn et al., 2004
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	häufig auftretende Tierseuche; über 2 Monate bei mesophilen Prozess (41-42°C) nachweisbar	jedoch extrem langsames Wachstum wird von anderen MO verdrängt		0	1	1		0		2	Siana et al., 2011
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> spp. sind Hitze-resistent, persistieren bei 55°C; einer der am meisten vorkommenden <i>Enterococcus</i> -Spezies in Rinder-Faeces			1	1	1		-1		1	Leubhn et al., 2003; Kuhn et al., 2003; Klein et al., 2010
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i> spp. sind Hitze-resistent, persistieren bei 55°C; einer der am meisten vorkommenden <i>Enterococcus</i> -Spezies in Rinder-Faeces [1]	überlebte in Anaerobic-Digestion-Probe (mit Gülle) bei RT(18,25°C) bis zu 35 Tage u. bei 35°C bis zu 15 Tage [2]		1	1	1		-1		1	Leubhn et al., 2003; [1] Kuhn et al., 2003; Klein et al., 2010; [2] Kumar et al., 1999
<i>Campylobacter jejuni</i>	eines der 5 gefährlichsten Rinderabfall-Pathogene [1]	unterschiedliche Aussagen zu Überleben bei mesophiler Fermentation [2]; Abtötung nach 24 h bei thermophilen Bedingungen in Anaerobic Digestion (Nachweis über Kultivierung) [3]		1				0		1	Leubhn et al., 2003; [1] Klein 2010; [2] Bagge, 2009; [3] Wagner et al., 2008

Tabelle 2: Relevanzbeurteilung von 38 bakteriellen Pathogenen mittels Literaturrecherche

Pathogen	Relevanzbeurteilung		Vorkommen			Abtötung		Relevanz-Punkte	Literatur
	Pro	Kontra	Grassilage Rindergülle (+1 RP)	Biogas Rindergülle (+1 RP)	mesophil (-1 RP)	thermophil (0 RP)	nicht (+1 RP)		
<i>Salmonella enterica</i>	Nachweis gefordert durch Düngemittelgesetz (DüMV), ein es der 5 gefürchteten Rinderabfall-Pathogene [1]	Abtötung bei thermophilen Prozessen, Reduktion der Keimzahl bei mesophilen Prozessen [2], nicht identifiziert durch Metagenomanalyse [3], Abtötung nach 24 h bei thermophilen Bedingungen in Anaerobic Digestion (Nachweis über Kultivierung) [4]	1	1	-1	0		1	[1] Klein et al., 2010; [2] Bagge, 2009; [3] Eikmeyer et al., 2013; [4] Wagner et al., 2008; Fröschle und Leubuh, 2012
<i>Streptococcus agalactiae</i>	vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Streptococcus pyogenes</i>	vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Streptococcus infantarius</i>	vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Streptococcus mitis</i>	vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse	nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Yersinia enterocolitica</i>	in Rindergülle vorhanden [1]	<i>Yersinia spp</i> waren weder in Rindergülle noch in der Probe nach Anaerobic Digestion vorhanden [2], empfindlich gegenüber thermophilen Prozessen [3] und mesophilen Prozessen [4]	(1)			(0)		0	[1] Leubuh et al., 2005; [2] Bonetta et al., 2011; [3] Dr. Ca., 2007; [4] Sahström, 2003
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	eines der 5 gefürchteten Rinderabfall-Pathogene; in Rindergülle vorhanden		1		-1			0	Klein et al., 2010
<i>Escherichia coli</i>	eines der 5 gefürchteten Rinderabfall-Pathogene [1]; bei mesophilen Prozessen reduziert aber nicht komplett eliminiert [2]; nur in Landwirt Biogasanlage vereinzeit identifiziert durch Metagenomanalyse [3]; E.coli-DNA noch nach 29 Tagen bei 37°C detektierbar [4]	E.coli 0157:H7 wurde bei mesophiler Anaerobic Digestion-Prob u. Rindergülle nicht nachgewiesen [5], Abtötung nach 24 h bei thermophilen Bedingungen in Anaerobic Digestion (Nachweis über Kultivierung) [6]; überlebte Anaerobic Digestion (mit Rinderdung) bei RT(18-25°C) bis zu 20 Tage u. bei 35°C bis zu 10 Tage [7]	(1)	(1)	(-1)	0		0	Leubuh et al., 2003; [1] Klein et al., 2010; [2] Bagge, 2009; Horan et al., 2004; [3] Eikmeyer et al., 2013; [4] Klein et al., 2011; [5] Bonetta et al., 2011; [6] Wagner et al., 2008; [7] Kumar et al., 1999;
<i>Salmonella typhi</i>	Nachweis gefordert durch Düngemittelgesetz (DüMV)	überlebte AD (mit Rinderdung) bei RT(18-25°C) bis zu 20 Tage u. bei 35°C bis zu 10 Tage	1		-1			0	Kumar et al., 1999
<i>Salmonella senftenberg</i>	Nachweis gefordert durch Düngemittelgesetz (DüMV)	Abtötung bei thermophilen Prozessen, Reduktion der Keimzahl bei mesophilen Prozessen	1		-1			0	Bagge, 2009
<i>Shigella boydii</i>		nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Shigella flexneri</i>		nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Shigella sonnei</i>		nicht identifiziert durch Metagenomanalyse						0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Shigella dysenteriae</i>		sensitiv, überlebte Anaerobic Digestion (mit Rinderdung) bei RT(18-25°C) 10 Tage und bei 35°C bis zu 5 Tage [1]; nicht identifiziert durch Metagenomanalyse [2]						0	[1] Kumar et al., 1999; [2] Eikmeyer et al., 2013
<i>Vibrio cholerae</i>		nicht identifiziert durch Metagenomanalyse		0				0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>								0	x
<i>Vibrio alginolyticus</i>								0	x
<i>Vibrio fischeri</i>				0				0	Eikmeyer et al., 2013
<i>Clavibacter michiganensis sub.sp. sepe domesticus</i>		nicht identifiziert durch Metagenomanalyse weniger relevant, da nicht mit Grassilage assoziiert						0	Seigner et al., 2007

2.1.2 Kurzvorstellung der ausgewählten pathogenen Mikroorganismen

Clostridium difficile

Clostridien gehören zur Familie der *Clostridiaceae* (DE VOS *et al.* 2009) und setzen sich zurzeit aus 213 Arten zusammen, wovon 43 der Risikogruppe 2 angehören (BAuA 2016).

Bei *C. difficile* handelt es sich um eine Spezies von Gram-positiven, begeißelten, stäbchenförmigen und sporenbildenden Bakterien, die in anaerobem Milieu leben. Etwa 3% gesunder Erwachsener und bei Säuglingen bis zu 70% weisen eine geringe Anzahl des Bakteriums in der mikrobiellen Flora ihres Verdauungstraktes auf.

C. difficile besitzt ein Temperaturoptimum zwischen 30°C und 37°C und kommt u.a. in Erde, Sand und Kot unterschiedlicher Nutz- und Haustiere vor. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich auf dem fäkal-oralen Weg, durch kontaminierte Lebensmittel oder durch die Infektionsträger selbst (z.B. Händeschütteln) (YOO & LIGHTNER 2010). Intestinale Überwucherungen mit *C. difficile* und die in diesem Zusammenhang mögliche Toxinbildung treten insbesondere in immunsupprimierten Personen nach Antibiotikatherapie durch die häufig bereits in der Darmflora beheimateten Clostridien auf. In diesem Zusammenhang besitzen die von *C. difficile* gebildeten Toxine A und B die größte Relevanz, da sie die höchste Virulenz aufweisen und im Rahmen einer pseudomembranösen Kollitis zu schweren Darmentzündungen führen können (RYAN 2004). Dabei kann es neben intraabdominalen Abszessen, Gewebenekrosen und Geschwürbildung zur Darmperforationen und massiven, z.T. blutigen Durchfällen kommen (LIBBY & BEARMAN 2009). Durch Studien konnte gezeigt, dass diese Stämme auch in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vorhanden sein können, sodass eine Übertragung von Tier zu Mensch und umgekehrt nicht ausgeschlossen werden kann (GOULD & LIMBAGO 2010, KEEL *et al.* 2007).

Clostridium sordellii

C. sordellii ist ebenfalls ein anaerobes, Gram-positives und begeißeltes Stäbchen, das zwischen 30°C und 37°C optimale Wachstumsbedingungen findet. Der Organismus wird vorwiegend im Boden und im Verdauungstrakt von Tieren gefunden, zu 0,5% konnte er innerhalb des Verdauungstraktes der menschlichen Bevölkerung nachgewiesen werden (ABOU-DONIA 2015). Obwohl viele Stämme keine Pathogenität aufweisen, geht von virulenten Stämmen eine umso größere Gefahr aus, da sie tödliche Infektionen in Mensch und Tier hervorrufen können. Hierzu gehören u.a. Enteritis und Enterotoxämie in Schafen und Vieh, sowie Gasbrand und das Toxische Schocksyndrom im Menschen (CLARK 2003, LEWIS & NAYLOR 1998, DE GROOT *et al.* 1997, AL-MASHAT & TAYLOR 1983). Die Virulenz wird durch eine Anzahl von Exotoxinen hervorgerufen, von denen insbesondere das letale (TcsL) und das hämorrhagische Toxin die größte Virulenz besitzen. Sie verfügen über eine ähnliche biologische Aktivität und Antigenität wie Toxin A und Toxin B (TcdB) von *C. difficile* (CARTER *et al.* 2011). Als anaerobe Sporenbildner, die sich auch im Verdauungstrakt gesunder Wiederkäuer finden lassen, besitzen Clostridien gute Voraussetzungen um im Milieu von Biogasreaktoren überleben zu

können (DE VOS *et al.* 2009). Hieraus ergibt sich speziell in Bezug auf pathogene Spezies der eindeutige Bedarf nach einer schnellen und zuverlässigen Detektionsmethode.

Listeria monocytogenes

Von den sechs bekannten Listerien-Spezies, führt *L. monocytogenes* zur Infektion des Menschen (LORBER 2000). Die geschätzte infektiöse Dosis für *L. monocytogenes* liegt in gesunden Personen bei etwa 10 bis 100 Millionen Kolonien bildenden Einheiten (KBE), fällt jedoch bei Hochrisikopatienten mit 0,1 bis 10 Millionen KBE deutlich geringer aus (FARBER *et al.* 1996).

Dabei spielen Nahrungsmittel wie rohes Gemüse, Rohmilchprodukte (Weichkäse) sowie Fleisch als Infektionsquelle eine entscheidende Rolle. Die Symptome einer Erkrankung reichen von leichten grippeähnlichen Infektionen bei gesunden Erwachsenen über systemischen Befall bis hin zu Hirnhaut- und Gehirnentzündungen, die gerade bei Personen mit geschwächter Immunabwehr tödlich verlaufen können. Eine besondere Risikogruppe stellen schwangere Frauen dar, da eine Infektion hier zu Fehl- oder Frühgeburten und schweren Behinderungen beim Neugeborenen führen kann (BfR, 2016).

Das Hämolysin Listeriolysin O, welches maßgeblich an einer Infektion mit *L. monocytogenes* beteiligt ist, wird durch das Gen *hlyA* kodiert und gilt als bedeutendster Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* (NOGVA *et al.* 2000). Im Rahmen einer Infektion ist es für die Auflösung der Phagozytenvakuole und folglich für die Vermehrung des Bakteriums im Zytoplasma der Zielzellen verantwortlich (DARAI *et al.* 2009).

Da Listerien als häufig in Substraten vorkommende, pathogene Organismen gelten, erscheinen eine nähere Untersuchung und ein verlässlicher Nachweis für Biogasanlagen sinnvoll.

***Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg)**

Die Gattung *Xanthomonas* gehört zur Familie der *Xanthomonadaceae* und besteht insgesamt aus 27 Spezies (PARKINSON *et al.* 2007), die relevante pathogene Eigenschaften in Bezug auf Getreide- und Kulturpflanzen aufweisen. Es handelt sich um eine Gattung stäbchenförmiger, Gram-negativer und obligat aerober Gamma-Proteobakterien, die mit einer einzelnen polaren Flagelle begeißelt sind. Ihr Temperaturoptimum liegt zwischen 25°C bis 30°C und damit im mesophilen Bereich. Das von *Xanthomonas* gebildete Exopolysaccharid Xanthan dient dem Schutz vor Austrocknung und toxischen Umwelteinflüssen, ruft aber gleichzeitig speziell im Fall von *X. translucens* pv. *graminis* (Xtg) dessen phytopathogene Eigenschaften hervor. Die durch Xtg ausgelöste bakterielle Gräserwelke wird vermutlich durch die Blockung des Wasserflusses in den Hohlgefäßen des Xylems bewirkt. Weiterhin unterdrückt Xanthan die Aktivierung grundlegender Abwehrmechanismen innerhalb der Pflanze (WICHMANN 2011). Somit wird die Notwendigkeit nach einer mikrobiologischen Schnellmethode auf Basis einer quantitativen real-time PCR zur Detektion von Xtg in Biogasanlagen deutlich, da hier sowohl das in Form von Grassilage eingebrachte Substrat als auch die im Anschluss landwirtschaftlich als

Düngemittel eingesetzten Gärreste Kontaminationen aufweisen können (Bachelorarbeit KELEMEN 2014).

2.1.3 Grundsätzliches Vorgehen zur Etablierung der qPCR

Für die definierten Mikroorganismen wurden Primer-Sonden-Systeme etabliert. Grundsätzlich wurde anhand in Datenbanken verfügbaren genomischen Informationen passende und Spezies-spezifische Primerpaare (forward und reverse) mit Hilfe der Software Geneious® definiert. Zur Detektion nach einer im Verbundprojekt mittels zweier Ringproben etablierten DNA-Extraktionsmethode (LEBUHN *et al.* 2016) für alle Proben (Grassilage über Biogas-Fermenter Perkolatproben bis Gärrest) wurde zwischen das Primerpaar eine ebenso spezifische Sonde positioniert, die eine selektive und Fluoreszenz-spezifische qualitative Detektion und quantitative Erfassung ermöglichen sollte. Diese Systeme mussten spezifisch für jeden der Mikroorganismen individuell optimiert werden, Versuche zur Darstellung in einem gemeinsamen Multiplex-System erfolgten ebenso. Zudem wurde mittels bekannter Primer und Sonden für Bacteria (BAC) nach (Amann) der bakterielle Gesamt- DNA-Gehalt bestimmt, so dass diesbezüglich quantifiziert wurde. Um die entwickelten PCR-System vor falsch-positiven oder –negativen Resultaten abzusichern, erfolgte noch eine im Diagnostikmarkt übliche Integration einer sogenannten „Internen Amplifikationskontrolle“ (IAC). Zum Abschluss des Projektes erfolgte die Evaluation der etablierten Assays anhand einer Bestimmung des Limit of Detection (LOD) und des Limit of Quantification (LOQ), womit die Leistungsfähigkeit der Assays dokumentiert werden kann.

In der Folge wird für jeden Mikroorganismus, für die IAC als auch die Bestimmung der Limite deren Entwicklung dokumentiert.

2.1.3.1 Etablierung der DNA-Extraktionsmethode

Grassilage als auch die Gärreste wurden zunächst aus der Lagerung bei -20°C über Nacht im Kühlschrank vollständig aufgetaut. Je Ansatz wurden 10 g der Silage bzw. 10 g der Gärreste eingewogen. Nach der Zugabe von 20 mL PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer und einer Einwirkzeit von 10 min wurde für 1 min extrahiert (Stomacher; Stufe normal). Es erfolgte eine weitere Zugabe von 20 mL PBS mit erneuter Extraktion für 1 min. Der Überstand (20 mL) wurde 10 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 mL PBS vollständig gelöst. Danach wurde je 1 mL Probe auf drei 2 mL Eppendorfgefäße verteilt. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 14000 g an. Das Pellet wurde abermals in 1 mL PBS gelöst und nochmals für 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet direkt in 978 µL Natrium Phosphat Puffer des Extraktionskits (Fast-DNA® Spin Kit for Soil, MP Biomedicals) gelöst.

Perkolatproben wurden in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 12100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet direkt in 978 µL

Natrium Phosphat Puffer des Extraktionskits (FastDNA® Spin Kit for Soil, MP Biomedicals) gelöst

Die DNA-Extraktion der Silage- und Perkolatproben als auch der Gärreste wurde nach dem Extraktionsprotokoll des FastDNA® Spin Kit for Soil der Firma MP Biomedicals nach der im Ringtest etablierten Methode (LEBUHN *et al.* 2016) durchgeführt.

2.1.3.2 Etablierung eines Mastermix und der Parameter für die qPCR

Für die quantitative PCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, der alle für die Reaktion erforderlichen Bestandteile enthielt. Dabei wurde für den Ansatz ein 5%iger Überschuss kalkuliert, um mögliche Pipettierfehler zu kompensieren. Die nachfolgend aufgeführten **Tabelle 3** bis **Tabelle 6** stellen die Zusammensetzung für die jeweiligen Mastermixe der qPCRs dar.

Tabelle 3: Pipettierschema für den Mastermix zur Quantifizierung der Gesamtbakterien DNA (Bac)

Gesamt-Mastermix				Volumen für x Reaktionen	
				1	96+5%
	Einheit	C _{Stock}	C _{pro Ansatz} (µM)	Vol. (µL)	Vol. (µL)
PCR H ₂ O				10,055	1013,5
Incomplete 10x Reaction	x-fach	10	1	2,0	201,6
Bac338F	µM	10	0,3	0,6	60,5
Bac805R	µM	10	0,3	0,6	60,5
Bac516TS	µM	2	0,2	2,0	201,6
IAC Template	copies/µL	2,86E+03	5	0,035	3,5
IAC Probe	µM	2	0,05	0,5	50,4
dNTPs+dTTP	mM	40	0,8	0,4	40,3
BSA	mg/mL	20	0,5	0,5	50,4
MgCl ₂	mM	100	3	0,6	60,5
UDG	U/µL	10	0,005	0,01	1,0
SuperHot Taq	U/µL	5	0,05	0,2	20,2
Gesamt				17,5	1764,0

Tabelle 4: Pipettierschema für den Mastermix zur Quantifizierung von *C. difficile* und *C. sordellii* im Multiplex-Assay

Gesamt-Mastermix				Volumen für x Reaktionen	
				1	96+5%
	Einheit	C _{Stock}	C _{pro Ansatz} (μM)	Vol. (μL)	Vol. (μL)
PCR H ₂ O				7,255	731,3
Incomplete 10x Reaction	x-fach	10	1	2,0	201,6
CSD_F2	μM	10	0,5	1,0	100,8
CSD_R1	μM	10	0,5	1,0	100,8
S1CD-FAM	μM	2	0,2	2,0	201,6
S1CS-Hex	μM	2	0,2	2,0	201,6
IAC Template	copies/μL	2,86E+03	5	0,035	3,5
IAC Probe	μM	2	0,05	0,5	50,4
dNTPs+dTTP	mM	40	0,8	0,4	40,3
BSA	mg/mL	20	0,5	0,5	50,4
MgCl ₂	mM	100	3	0,6	60,5
UDG	U/μL	10	0,005	0,01	1,0
SuperHot Taq	U/μL	5	0,05	0,2	20,2
Gesamt				17,5	1764,0

Tabelle 5: Pipettierschema für den Mastermix zur Quantifizierung von *L. monocytogenes*

Gesamt-Mastermix				Volumen für x Reaktionen	
				1	96+5%
	Einheit	C _{Stock}	C _{pro Ansatz} (μM)	Vol. (μL)	Vol. (μL)
PCR H ₂ O				10,055	1013,5
Incomplete 10x Reaction	x-fach	10	1	2,0	201,6
Lmono_FP1	μM	10	0,3	0,6	60,5
Lmono_RP1	μM	10	0,3	0,6	60,5
Lmono_Probe1	μM	2	0,2	2,0	201,6
IAC Template	copies/μL	2,86E+03	5	0,035	3,5
IAC Probe	μM	2	0,05	0,5	50,4
dNTPs+dTTP	mM	40	0,8	0,4	40,3
BSA	mg/mL	20	0,5	0,5	50,4
MgCl ₂	mM	100	3	0,6	60,5
UDG	U/μL	10	0,005	0,01	1,0
SuperHot Taq	U/μL	5	0,05	0,2	20,2
Gesamt				17,5	1764,0

Tabelle 6: Pipettierschema für den Mastermix zur Quantifizierung von Xtg

Gesamt-Mastermix				Volumen für x Reaktionen	
				1	96+5%
	Einheit	C _{Stock}	C _{pro Ansatz} (μM)	Vol. (μL)	Vol. (μL)
PCR H ₂ O				10,255	1033,7
Incomplete 10x Reaction	x-fach	10	1	2,0	201,6
Xtg_FP2	μM	10	0,5	1,0	100,8
Xtg_RP2	μM	10	0,5	1,0	100,8
Xtg_Probe	μM	2	0,1	1,0	100,8
IAC Template	copies/μL	2,86E+03	5	0,035	3,5
IAC Probe	μM	2	0,05	0,5	50,4
dNTPs+dTTP	mM	40	0,8	0,4	40,3
BSA	mg/mL	20	0,5	0,5	50,4
MgCl ₂	mM	100	3	0,6	60,5
UDG	U/μL	10	0,005	0,01	1,0
SuperHot Taq	U/μL	5	0,05	0,2	20,2
Gesamt				17,5	1764,0

Hierfür wurden dNTPs+dTTP, die entsprechenden Primer sowie PCR-H₂O zusammengegeben. Weiterhin wurde eine für die jeweilige Detektion der Ziel-DNA erforderliche Hydrolyse-Sonde verwendet. Für die Amplifikation wurde das Enzym SuperHot Taq eingesetzt. Weiterhin wurden MgCl₂, BSA und Incomplete 10x Reaction Buffer hinzugefügt. Der Zusatz des Enzyms UDG diente der Vermeidung von Kontaminationen in den PCR-Reaktionsansätzen. Nach Befüllen der PCR-Platten mit 17,5 μL Mastermix erfolgte die Zugabe der DNA unter einer PCR-Sterilwerkbank. Als Untersuchungsmaterial diente die DNA der Grassilage, Gärreste und Perkolatproben, die zuvor über das Fast-DNA® Spin Kit for Soil der Firma MP Biomedicals isoliert wurde. Hierbei wurden je 2,5 μL der Proben in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. In **Tabelle 7** bis **Tabelle 10** sind die Mess- und Temperaturprofile der verwendeten LightCycler 480 Programme aufgeführt.

Tabelle 7: Mess- und Temperaturprofil des verwendeten LightCycler480 Programms für die qPCR mit Bac-Primern

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Haltezeit (min:sec)	Messung
1. UDG und Denaturierung	1	40	04:00	-
		95	10:00	-
2. Amplifikation	45	95	00:10	-
		60	00:30	einfach
3. Kühlung	1	40	00:30	-

Tabelle 8: Mess- und Temperaturprofil des verwendeten LightCycler480 Programms für die qPCR mit Clostridien-Primern

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Haltezeit (min:sec)	Messung
1. UDG und Denaturierung	1	40	04:00	-
		95	10:00	-
2. Amplifikation	45	95	00:10	-
		60	00:30	einfach
3. Kühlung	1	40	00:30	-

Tabelle 9: Mess- und Temperaturprofil des verwendeten LightCycler480 Programms für die qPCR mit Listerien-Primern

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Haltezeit (min:sec)	Messung
1. UDG und Denaturierung	1	40	04:00	-
		95	10:00	-
2. Amplifikation	45	95	00:10	-
		60	00:15	einfach
3. Kühlung	1	40	00:30	-

Tabelle 10: Mess- und Temperaturprofil des verwendeten LightCycler480 Programms für die qPCR mit Xtg-Primern

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Haltezeit (min:sec)	Messung
1. UDG und Denaturierung	1	40	02:00	-
		95	05:00	-
2. Amplifikation	45	95	00:10	-
		62	00:30	einfach
3. Kühlung	1	40	00:30	-

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die LightCycler 480 Software.

2.1.4 Etablierung der Quantitativen PCR der pathogenen Mikroorganismen

2.1.4.1 qPCR zum Nachweis von *X. translucens*

Der Nachweis des Phytopathogens *X. translucens* erfolgt über den Einsatz eines spezifischen Vorwärts- (Xtg_FP2) und Rückwärtsprimerpaares (Xtg_RP2). Die Primer binden dabei am Anfang und Ende eines für *X. translucens* pv. *graminis* kennzeichnenden 113 bp langen Genabschnitts in einer Spacerregion zwischen der 16S und der 23S rRNA auf dem Bakterienchromosom. Neben der Detektion der graspathogenen *X. translucens* pv. *graminis* Stämme (LMG 596, 713 und 726), wird hier aufgrund von Sequenzanalogien auch der Nachweis der *Xanthomonas translucens* Pathovaren *X.*

translucens pv. *poae* (LMG 728, Graspfadenpathogen), *X. translucens* pv. *undulosa* (LMG 892, Getreidepathogen) und *X. translucens* pv. *translucens* (LMG 876, Getreidepathogen) erlaubt und ermöglicht so die Detektion eines weitreichenden Erregerspektrums. Diese besitzt insbesondere hinsichtlich eines ausreichenden Sicherheits-Monitorings eine besonders hohe Relevanz, da so speziell im Bereich der Nachsorgeprozesse (Ausbringen der Gärreste in Form von Dünger), frühzeitig eine weitere Ausbreitung der Erreger verhindert werden kann. Der Nachweis kann dabei entweder unspezifisch über den in dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green erfolgen oder hochspezifisch über eine Hydrolyse Sonde (Taqman), die an eine kurze Sequenz auf dem zu amplifizierenden Genabschnitt bindet, geschehen (**Abbildung 1**).

Das für die Quantifizierung eingesetzte Plasmid wurde im Folgeversuche als Plasmidstandard eingesetzt.

2.1.4.2 Untersuchung des Einflusses der Biogasprobenmatrix auf die Aufarbeitungseffizienz und PCR basierte Quantifizierung von *X. translucens*

Um die Wirkung der Biogasprobenmatrix zu charakterisieren und in Relation zur Effizienz der Aufarbeitung und qPCR basierten Detektion von *X. translucens* zu bringen, wurde eine Spiking-Extraktion mit anschließender fluorometrischer Konzentrationsbestimmung und Quantifizierung der Extrakte über qPCR durchgeführt. Die Untersuchung aller Proben erfolgte hier sowohl *Xanthomonas* spezifisch über den Einsatz sequenzspezifischer Primer (Xtg_FP2 und Xtg_RP2) und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, als auch über die Anwendung von Primern (Bac338F und Bac805R) und einer Hydrolyse Sonde (Bac516F TS), die die Quantifizierung der gesamten bakteriellen DNA innerhalb der Proben ermöglichte. Dabei wurde in der Referenzreihe *X. translucens*-DNA aus jeweils fünf mit 1 mL Saline versetzten Ansätzen in den Verdünnungsstufen 100 bis 10⁻⁴ in Doppelbestimmung extrahiert. Bei der Spikingreihe wurden zur *X. translucens*-DNA der jeweiligen Verdünnungsstufe je 2 mL Xtg-negativ-getestetes Perkolat (Tag 0 der Biogasfermentation, äquivalentes Gemisch der thermophilen Reaktoren) hinzugefügt. Auch hier erfolgte die Extraktion in Doppelbestimmung in den Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻⁴. Anschließend wurden sowohl die Konzentrationen als auch die detektierten DNA-Mengen miteinander verglichen (**Tabelle 11**). Die tabellarisch aufgeführten Konzentrationen und Kopien/μL ergeben sich aus den gebildeten Mittelwerten der Doppelbestimmung. Weiterhin wurden je 100 μL der hergestellten Verdünnungen in Doppelbestimmung ausplattiert, um eine Zellzahlbestimmung innerhalb der Ansätze zu ermöglichen. Es waren nur die zwei Platten der Verdünnungen 10⁻⁵ und 10⁻⁶ auszählbar. Die Zellzahl in der Ausgangslösung von 100 konnte mit 8,1*10⁸ KBE/mL berechnet werden.

Um einen genauen Zusammenhang und damit eine Bestimmung der Extraktionseffizienz zwischen der in den Proben quantifizierten Kopien/μL und der eingesetzten Kopien/μL entsprechend der Verdünnungsstufe herstellen zu können, wurde die Häufigkeit des Vorkommens der Zielsequenz auf dem Genom von *X. translucens* pv. *graminis* ermittelt (BERGMANN *et al.* 2012). Hierfür fand ein Abgleich des für die sequenzspezifischen Primer ausgewählten Abschnitte zwischen der 16S rRNA und 23S rRNA auf dem Genom von *X. translucens* pv. *graminis* gegen das Gesamtgenom des Phytopathogens mittels Basic Local Alignment Searching Tool (BLAST) statt (ALTSCHUL *et al.* 1997). Dabei wurde die gesuchte Sequenz genau einmal mit 100%iger Übereinstimmung im Abschnitt 285 des untersuchten Stammes Xtg29 (ID:GI181222) gefunden. Anhand der ermittelten Ergebnisse (**Tabelle 11**) entspricht eine Xtg-DNA-Kopie somit exakt einer Zelle.

Tabelle 11: Darstellung der DNA-Konzentrationen, sowie der über qPCR detektierten Kopien/ μL für *X. translucens* (gemessen: unverdünnt und 1:10) als auch für die gesamte bakterielle DNA (gemessen: 1:10 und 1:1000) innerhalb der Referenzreihe und der Spikingreihe für die Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-4} . Alle aufgeführten Werte sind Mittelwerte für 2 biologische Replikate gemessen in den zwei Verdünnungen mit einer Abweichung von 1% bis 17% mit Ausnahme von 10^0 (75%). *n.a.: nicht analysierbar

Probe	Zellzahl/mL Extrakt	DNA-Konzentration (ng/ μL)	Xtg-DNA (Kopien/75 μL)	Bac-DNA (Kopien/75 μL)
Saline 10^0	$8,1 \cdot 10^8$	92,58	$6,8 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^9$
Saline 10^{-1}	$8,1 \cdot 10^7$	18,57	$1,1 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$
Saline 10^{-2}	$8,1 \cdot 10^6$	n.a.	$1,8 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$
Saline 10^{-3}	$8,1 \cdot 10^5$	n.a.	$<10^2$	$<10^2$
Saline 10^{-4}	$8,1 \cdot 10^4$	n.a.	$<10^2$	$<10^2$
Spiking 10^0	$8,1 \cdot 10^8$	107,57	$2,7 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$
Spiking 10^{-1}	$8,1 \cdot 10^7$	27,85	$3,5 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$
Spiking 10^{-2}	$8,1 \cdot 10^6$	5,79	$3,1 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$
Spiking 10^{-3}	$8,1 \cdot 10^5$	3,88	$2,6 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^7$
Spiking 10^{-4}	$8,1 \cdot 10^4$	3,15	$4,5 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^7$

Es wurde deutlich, dass die Spiking-Proben höhere DNA-Konzentrationen zeigten, als die Ansätze, die ausschließlich mit Saline durchgeführt wurden. Hier konnte nur innerhalb der ersten beiden Verdünnungsstufen über den in dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen ein Wert bestimmt werden, während bei den Spikingansätzen alle Verdünnungsstufen eine Konzentrationsbestimmung erlaubten. Mit Zunahme der Verdünnung sank auch die DNA-Konzentration, jedoch war dabei keine Proportionalität zu entsprechendem Verdünnungsfaktor gegeben. Analog verhielt es sich auch bei der Ermittlung der Kopienzahl/ μL . Sowohl bei der spezifischen Detektion von *X. translucens*, als auch in Bezug auf die Quantifizierung der gesamten in den Proben enthaltenen Bakterien-DNA konnten bei der Referenzreihe Ergebnisse bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} erhalten werden, bei den Spikingansätzen führten alle Verdünnungen zu auswertbaren Resultaten. Bei der Gegenüberstellung von Xtg- und Bac-DNA-Mengen fiel auf, dass die Kopien/ μL bei der spezifischen Bestimmung von *X. translucens* in einem ähnlichen Bereich lagen wie die Gesamtbakterien-DNA. Anders als bei der Konzentrationsbestimmung wurde jedoch im Fall der quantifizierten Xtg-DNA-Mengen innerhalb der Spikingansätze der Faktor 10 mit zunehmender Verdünnung bei den ermittelten Kopien/ μL erkennbar, während die über Bac-Primer quantifizierten Ansätze größtenteils gleichbleibende Werte aufwiesen. Bei der Gegenüberstellung der Zellzahl/mL mit der Kopienzahl des Eluats (Kopien/75 μL) konnte man nur für die Xtg-DNA bei den Spiking-Ansätzen eine direkte Korrelation erkennen, wobei die qPCR Ergebnisse hier um eine Zehnerpotenz höher lagen als die über die Zellzahlbestimmung erhaltenen Werte.

2.1.4.3 qPCR zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Um ein Nachweissystem für Listerien, basierend auf der quantitativen real-time PCR, zu entwickeln, musste zunächst ein Primer-Sonden-System designt werden. Hierbei wurde für die Spezies *L. monocytogenes* als Region das hlyA-Gen gewählt. Ein Sequenzvergleich der verschiedenen verfügbaren *L. monocytogenes* Stämme (aus der Nukleotid-Datenbank der NCBI) im Vergleich zu den verwendeten Primer ist in Abbildung zu sehen. Hierbei ist der forward Primer dunkelgrün dargestellt, die Sonde rot und der reverse Primer in hellgrün.

Die jeweilige Richtung der Oligonukleotide ist durch die Pfeilrichtung gekennzeichnet. In diesem Alignment fällt auf, dass es zu einzelnen Nukleotidaustauschen bzw. Nukleotid-unterschieden zwischen den einzelnen Stämmen kommt. Größere Unterschiede weisen die Stämme von *L. ivanovii* auf (zu sehen im unteren Teil der **Abbildung 2**). Hier sind bis zu zehn fehlerhafte Basenübereinstimmungen zu verzeichnen. Währenddessen zeigt der Stamm *L. innocua* nur eine Fehlpaarung.

Hierauf erfolgte eine Optimierung des Mastermixes, zum einen im Singleplex-Verfahren, aber auch für ein Multiplex-Verfahren mit *Listeria ivanovii*. Dieser Stamm wurde bei den späteren Untersuchungen wegen schlechtem Wachstumsverhalten als auch geringerer Prävalenz in Biogasanlagen (Daten der Partner CeBiTec) nicht weiter betrachtet. Somit wurde *Listeria monocytogenes* als Indikatorstamm der Gattung *Listeria* ausgewählt.

In **Abbildung 3** sind zwischen dem Singleplex-System von *L. monocytogenes* und den Multiplex-Systemen keine Unterschiede in der Fluoreszenz und in der Kurvenform zu erkennen. Die verringerte Primerkonzentration (grün) zeigte allerdings auch hier einen minimal schlechteren Kurvenverlauf. Alle mitgeführten Negativkontrollen waren negativ.

Trotz der schwächeren Fluoreszenzen bei der verringerten Primerkonzentration wurde mit dieser Konzentration zunächst weitergearbeitet, da eine geringere Primerkonzentration zu Einsparungen bei den Assay-Kosten führt und prinzipiell eine geringere Oligo-konzentration weniger Magnesium-Ionen bindet. So ergeben sich folgende Versuchspa-rameter (**Tabelle 12**), mit denen der Assay qualifiziert wurde:

Tabelle 12: Zusammenfassung der etablierten Versuchsparemeter im Multiplex-System zum Nachweis von *L. ivanovii* und *L. monocytogenes*

	Konzentration	Etabliert im
Primer	0,15 µM	Multiplex-System
MgCl ₂	6 mM	Multiplex-System
BSA	0,5 mg /ml	Multiplex-System
dTTP	2,5 mM	Multiplex-System
dUTP	7,5 mM	Multiplex-System

Die Annealingtemperatur wurde bei 60°C für 15 Sekunden festgelegt.

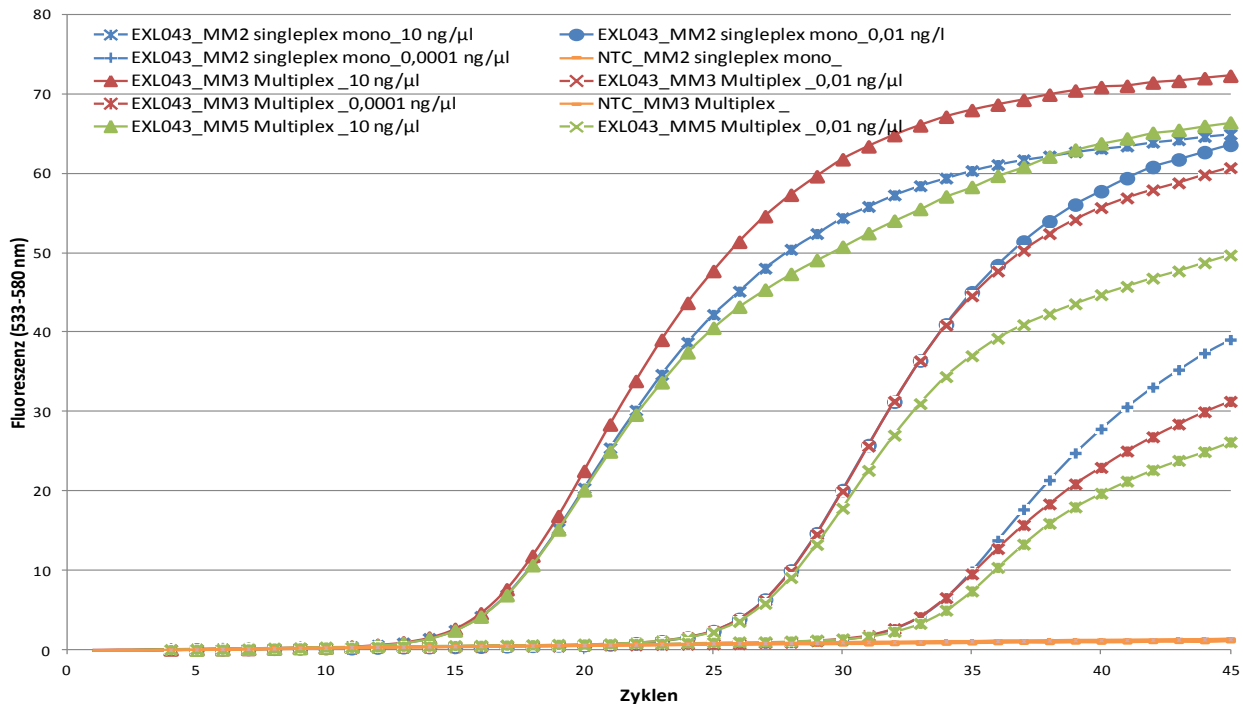


Abbildung 3: Etablierung PCR-System im HEX-Kanal zur Detektion von *L. monocytogenes*. Extrakt EXL043 (*L. monocytogenes* 20600 mit Biogasreaktor-Probe versetzt) in verschiedenen Verdünnungen im Singleplex- und Multiplex-System, sowie einer Variation in der Primerkonzentration (grün). MM2 (blau): Singleplex *L. monocytogenes*, 6 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA und 3 µM Primer; MM3 (rot): Multiplex, 6 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA, 0,3 µM Primer; MM5 (grün): Multiplex, 6 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA, 0,15 µM Primer

2.1.4.4 qPCR zum Nachweis von *Clostridium sordellii* und *Clostridium difficile*

Zu den bekanntesten pathogenen Clostridien gehören *Clostridium tetani*, Auslöser des Wundstarrkrampfes, und *Clostridium botulinum*, Verursacher des Botulismus (DE VOS *et al.* 2009). Da aufgrund der durchgeführten Literaturrecherche (Masterarbeit TRIPPNER, **Tabelle 1** und **Tabelle 2**) für diese Arbeit eine hohe Relevanz für *Clostridium sordellii* und *Clostridium difficile* als Pathogene im Biogasprozess ermittelt wurde, werden beide Arten als Target identifiziert. In der AG Lebuhn der LfL wurde parallel für *Clostridium botulinum* ein PCR-System entwickelt (FRÖSCHLE *et al.* 2015).

Auf Basis ihrer einzigartigen Toxine konnten mit Hilfe der Geneious® Software drei Forward und fünf Reverse Primer für die zeitgleiche Amplifikation des lethal Toxin und Toxin B entworfen werden, für den gleichzeitigen Nachweis von *C. difficile* und *C. sordellii* und wurden passende Sonden zur Differenzierung beider Arten (**Abbildung 4**) mit spezifischen Fluoreszenz-Kanälen (**Abbildung 5**) entworfen.

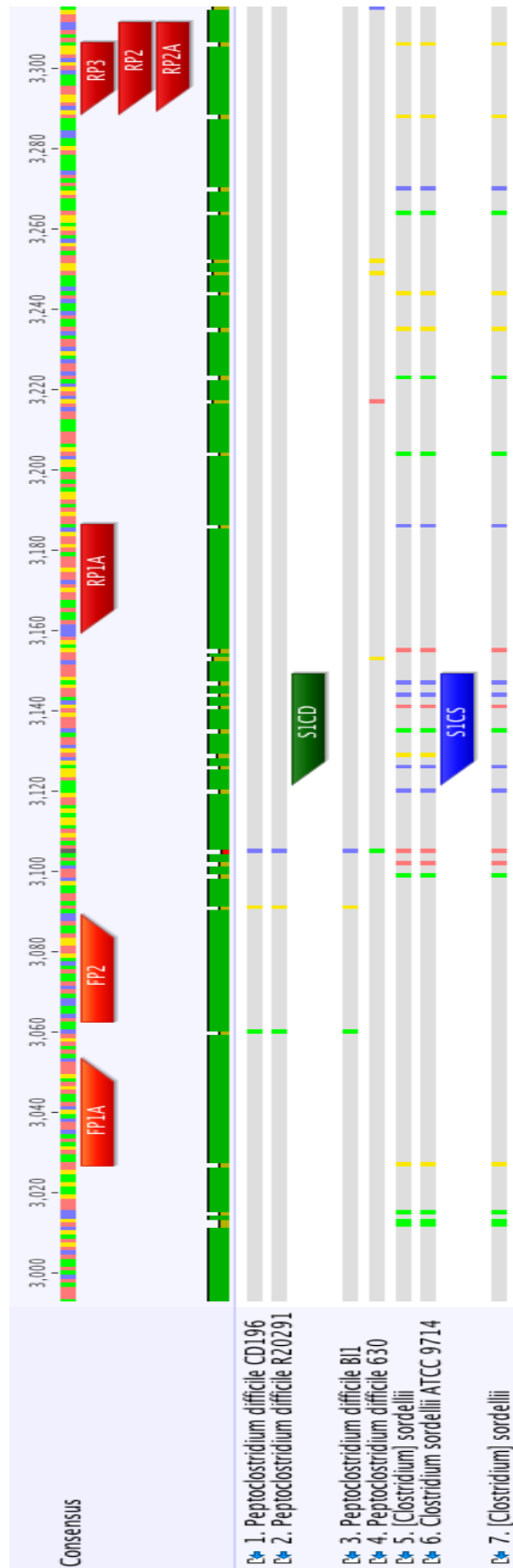


Abbildung 4: Alignment bestehend aus drei Sequenzen des lethalen Toxins (*C. sordellii*) und vier Sequenzen des Toxin B (*C. difficile*). Forward (Hellrot) und Reverse Primer (Dunkelrot) ermöglichen den zeitgleichen Nachweis beider Toxingene. Für die Differenzierung wurden die Sonden S1CS (Blau, *C. sordellii*) und S1CD (Grün, *C. difficile*) entworfen. Der grüne Balken zeigt Übereinstimmungen der Basen aller Sequenzen des Alignments. Lücken zeigen Unterschiede zwischen den Basen der Sequenzen im Alignment.

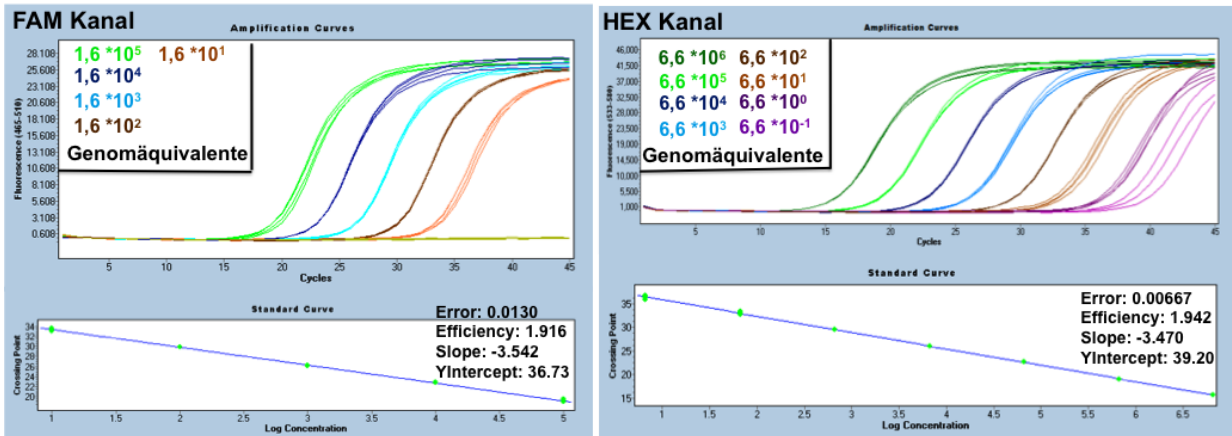


Abbildung 5: Nachweis von *C. difficile* (links) und *C. sordellii* (rechts) mittels des entwickelten qPCR Assays. Die DNA wurde aus den Reinkulturen extrahiert und die Genomäquivalente über die Genomgröße der verwendeten Stämme und der DNA-Konzentrationen der Extrakte berechnet.

Zur Quantifizierung von *C. sordellii* und *C. difficile* wurden entsprechende Plasmidstandards kloniert. Dazu wurde ein Amplifikat der Toxin Sequenz in den pGem-T Vektor kloniert, die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung kontrolliert. Danach erfolgte die Vermehrung und Linearisierung des Plasmids, eine Bestimmung der DNA-Konzentration und erfolgreiche Berechnung der Molekülzahl erlaubt den Einsatz des Plasmids für die qPCR zur Quantifizierung unbekannter Proben (**Abbildung 6**).

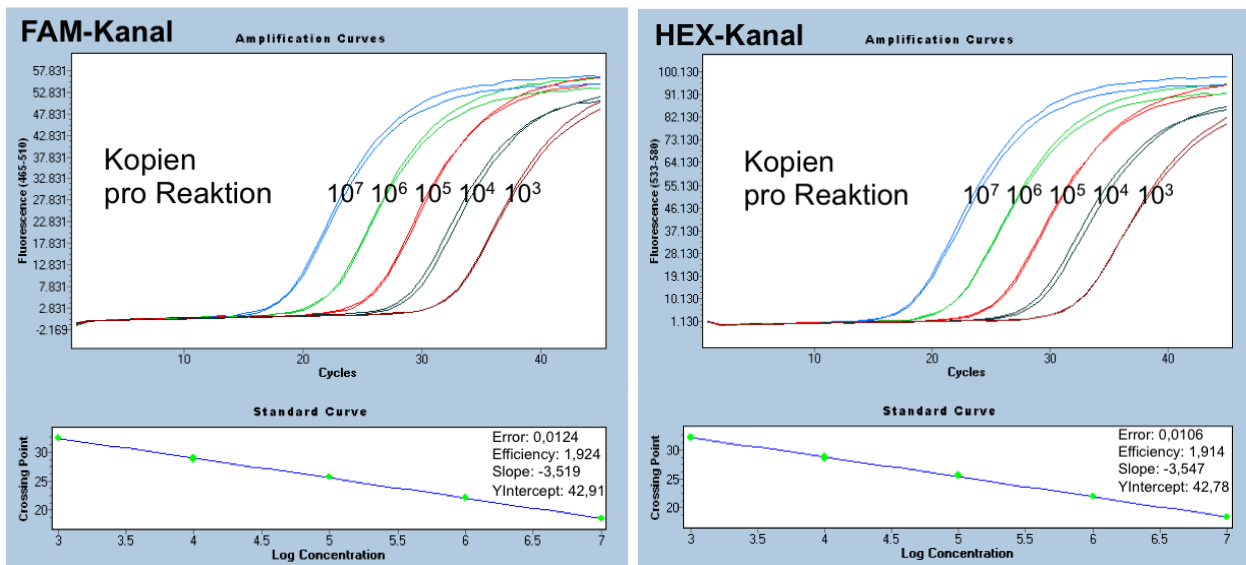


Abbildung 6: Durchführung der quantitativen real-time PCR mit einer Plasmidstandardreihe (10^7 Kopien bis 10^3 Kopien) in Doppelbestimmung am LightCycler480 zum Nachweis von *C. difficile* (links) und *C. sordellii* (rechts): dargestellt sind die Amplifikationskurven sowie die daraus ermittelten Standardgeraden mit Effizienzen von $>1,9$ (Maximum 2,0).

2.1.5 Etablierung dieses real-time PCR Assays zur Anwendung in Biogasproben

Durch einen Spiking-Versuch (Dotierung mit *Clostridium sordellii* bzw. *C. difficile* Zellen in eine Biogas-Reaktor-Probe des ATB) konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Assays ein Nachweis der Pathogene aus einer Biogas-Reaktor-Probe möglich ist, und dass die Matrix der Biogas-Reaktor-Probe keinen negativen Einfluss auf das Ergebnis des Assays hat.

Bei den untersuchten Proben (Grassilage, Reaktorflüssigkeit und Gärrest) des ATB konnten *C. sordellii* und *C. difficile* in der Reaktorflüssigkeit, als auch in den Gärresten nachgewiesen werden (**Tabelle 13**). In der Grassilage konnten *C. sordellii* und *C. difficile* nicht nachgewiesen werden. Die Cp-Werte in der Reaktorflüssigkeit für *C. difficile* lagen zwischen 30,89 und 31,98 bei einer 1:10 Verdünnung und waren damit geringer als die Cp-Werte von *C. sordellii* mit 33,98 und 34,82 bei einer 1:10 Verdünnung. Die Cp-Werte bei den Extrakten aus den Gärresten lagen bei beiden Stämmen über 36 und somit wahrscheinlich an der Nachweisgrenze.

Tabelle 13: Ergebnisse der real-time PCR für den Nachweis von *C. sordellii* und *C. difficile* aus Reaktorflüssigkeit (3 Extrakte) und Gärresten (2 Extrakte) aus einer Batchfermentation von Grassilage und Rindergülle. Die DNA-Extrakte wurden 1 : 10 verdünnt und in Duplikaten (Reaktorflüssigkeit) oder Triplikaten (Gärrest) aufgetragen. Verwendet wurde das Primerpaar FP2_RP1A. Abgebildet sind die Mittelwerte der Cp-Werte.

	Reaktorflüssigkeit 1	Reaktorflüssigkeit 2	Reaktorflüssigkeit 3	Gärrest G7	Gärrest G8
<i>C. sordellii</i>	33,98	34,82	34,59	37,24	Kein Signal
<i>C. difficile</i>	30,89	31,98	31,78	36,82	38,32

2.1.6 Integration einer Internen Amplifikations-Kontrolle (IAC)

Für die in o.g. angewendeten Assays wurde ein neuartiges IAC-Kontrollsystem konstruiert. Dabei dienten eine universell einsetzbare IAC sowie die zugehörige Hydrolyse Sonde (IAC_Probe) als Grundlage. Die Konstruktion der IAC erfolgte auf nur einem DNA-Fragment, indem die Hybridisierungssequenz für die IAC-Sonde zwischen die verschiedenen Forward- und Reverse-Primersequenzen geschaltet wurde und so die Integration in alle relevanten Assays ermöglicht (HOORFAR *et al.* 2004).

Die zu detektierende DNA und die Kontroll-DNA wurden in diesem Fall von Primern derselben Sequenz amplifiziert, so dass es folglich in einer kompetitiven PCR zu einer Konkurrenz um das gleiche Primerpaar kommt. Die Anwesenheit der IAC kann so zur Verringerung der Effizienz und dadurch zu einem veränderten Detektionslimit führen. Daher wurde die Konzentration der zugesetzten IAC-DNA als einer der kritischsten Parameter bestimmt. Dabei musste die geringste reproduzierbare IAC-Konzentration sorgfältig ermittelt werden. Andernfalls besteht die Gefahr, dass eine zu hohe Zahl an IAC-Amplifikaten mit dem eigentlichen Zielprodukt interferiert und so das Zielsignal stört.

Durch die Verwendung einer IAC-Sonde (siehe **Abbildung 7**), die mit einem von den übrigen Sonden abweichenden Farbstoff (hier: Cyanin 5) modifiziert wurde, können anhand der unterschiedlichen Emissionsfluoreszenz die Detektion des IAC-Amplifikats eindeutig von den Amplifikaten der nachzuweisenden DNA unterschieden werden.

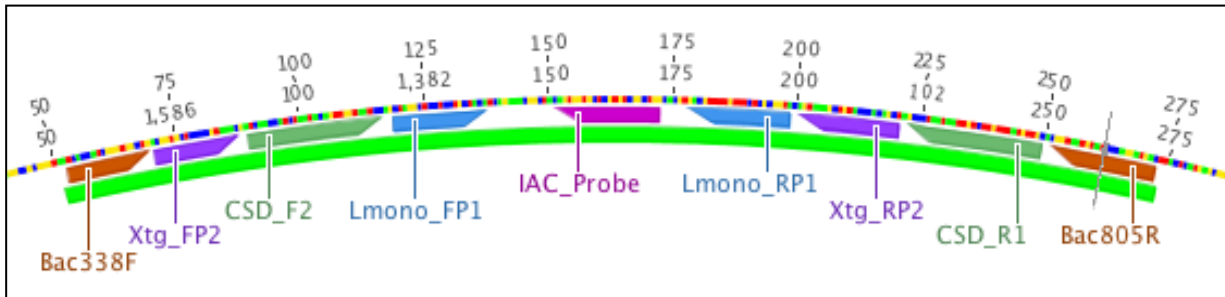


Abbildung 7: Darstellung der internen Amplifikationskontrolle über die Geneious® Software.

Die geeignete Konzentration für IAC-Standard als auch IAC-Sonde wurde basierend auf den o.g. Ergebnissen ausgewählt. Hierfür wurde für jeden Assay eine entsprechende qPCR durchgeführt, die neben dem IAC-Plasmid in der Konzentration 5 Kopien pro Ansatz (20 µL), die IAC-Sonde mit 0,05 µM pro Ansatz, als auch die für den jeweiligen Assay benötigten Primer, Sonden und die Ziel-DNA des entsprechend nachzuweisenden Organismus in einer Standardreihe von $5 \cdot 10^7$ Kopien/2,5 µL bis $1,9 \cdot 10^2$ Kopien/2,5 µL enthielt. Die IAC wurde in entsprechender Menge direkt dem Mastermix hinzugegeben. Die Herstellung der Standards erfolgte in 1:8 Verdünnungsstufen. Daneben wurde außerdem als Referenz eine Standardreihe ohne Zugabe von IAC-Plasmid und -Sonde mitgeführt. Parallel dazu erfolgte weiterhin eine Quantifizierung von mit Ziel-DNA gespickten Biogasproben mit und ohne IAC-Plasmid und -Sonde, um zu prüfen, ob das Gesamtsystem auch unter den dafür vorgesehenen, realen Bedingungen die gewünschte Funktionalität zeigt. Dabei wurden alle Ansätze im Triplikot aufgetragen.

Nachfolgend sind in **Tabelle 14** die Cp-Werte der Standardreihe für die Quantifizierung von *Xtg*, *Bac*, *C. difficile*, *C. sordellii* und *L. monocytogenes* mit und ohne IAC gegenübergestellt. Ebenso sind die Messergebnisse der detektierten Ziel-DNA in der mit Zellen versetzten Biogasmatrix aufgeführt.

Tabelle 14: Übersicht über die mittels qPCR bestimmten mittleren Cp-Werte als auch über die Quantifizierungsergebnisse der Ziel-DNA in Biogasmatrix mit und ohne IAC für die Assays von Xtg, Bac, C. difficile, C. sordellii und L. monocytogenes. Die Standardreihe wurde in Dreifachbestimmung in den Konzentrationen 5*107 Kopien/2,5 µL bis 1,9*102 Kopien/2,5 µL und NTC gemessen. ΔCp führt die Abweichung der mittleren Cp-Werte voneinander in Prozent auf. Die mit Zellen gespikete Biogasmatrix wurde jeweils im Duplikat in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 aufgetragen, die dargestellten Zellen in Biogasmatrix wurden aus dem Mittelwert gebildet. Die Bestimmung erfolgte über die LightCycler 480 Software.

Standardkonzentration (Kopien/2,5 µL)	Xtg		ΔCp (%)	Bac		ΔCp (%)	C. difficile		ΔCp (%)	C. sordellii		ΔCp (%)	L. monocytogenes		ΔCp (%)
	/	IAC		/	IAC		/	IAC		/	IAC		/	IAC	
5,0*10 ⁷	15,81	16,13	1,98	15,29	15,28	0,07	14,85	14,89	0,27	14,08	14,06	0,14	15,77	15,86	0,57
6,3*10 ⁶	19,17	19,66	2,49	18,88	18,71	0,91	17,95	17,92	0,17	17,12	17,09	0,18	19,06	19,02	0,21
7,8*10 ⁵	22,49	22,92	1,88	21,93	22,03	0,45	21,10	21,10	0,00	20,24	20,19	0,25	22,40	22,47	0,31
9,8*10 ⁴	25,71	26,09	1,46	25,08	25,09	0,04	24,25	24,12	0,54	23,45	23,28	0,73	25,72	25,66	0,23
1,2*10 ⁴	29,17	29,66	1,65	27,61	27,56	0,18	27,20	27,13	0,26	26,45	26,32	0,49	28,57	28,45	0,42
1,5*10 ³	32,15	32,51	1,11	29,12	28,89	0,80	30,32	29,96	1,20	29,39	28,95	1,52	31,94	31,17	2,47
1,9*10 ²	35,13	35,23	0,28	-	-	-	32,82	32,50	0,98	31,74	31,23	1,63	34,20	32,91	3,92
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zellen in Biogasmatrix (Kopien)	1,19*10 ⁸	1,72*10 ⁸	1,72*10 ⁸	2,65*10 ¹⁰	2,51*10 ¹⁰	2,51*10 ¹⁰	4,62*10 ⁴	6,15*10 ⁴	6,15*10 ⁴	4,44*10 ⁸	4,25*10 ⁸	4,25*10 ⁸	7,43*10 ⁸	7,76*10 ⁸	7,76*10 ⁸
	8,95*10 ⁵	1,47*10 ⁶	1,47*10 ⁶	4,04*10 ⁹	3,97*10 ⁹	3,97*10 ⁹	8,12*10 ⁵	8,85*10 ⁵	8,85*10 ⁵	2,79*10 ⁶	2,79*10 ⁶	2,79*10 ⁶	3,57*10 ⁶	3,57*10 ⁶	3,57*10 ⁶

Weiterhin wurden sowohl Effizienz als auch Steigung der resultierenden Standardgeraden innerhalb der Assays mit und ohne IAC miteinander verglichen. Die dabei erhaltenen Resultate können **Tabelle 14** entnommen werden. Sowohl die in **Tabelle 14** aufgeführten Cp-Werte der jeweiligen Konzentration mit und ohne IAC, als auch die entsprechend der Standardgerade ermittelten Werte für Effizienz und Steigung der einzelnen Assays (**Tabelle 15**) zeigten keine auffälligen Unterschiede. Anhand der erhaltenen Resultate konnte gezeigt werden, dass die Integration der IAC in die relevanten Assays nicht zu einer Verschlechterung der Quantifizierungsleistung führt. Entsprechend wurden im weiteren Verlauf alle Versuche inklusive der internen Amplifikationskontrolle durchgeführt.

Tabelle 15: Übersicht der über die Berechnung der Standardgeraden kalkulierten Werte der Effizienz und der Steigung bei dem Vergleich der Assays von Xtg, Bac, *C. difficile*, *C. sordellii* und *L. monocytogenes* mit und ohne IAC. Es wurde jeweils eine Standardreihe von $5 \cdot 10^7$ Kopien/2,5 μ L bis $1,9 \cdot 10^2$ Kopien/2,5 μ L des Plasmidstandards sowie eine NTC in Dreifachbestimmung pipettiert. Die Werte wurden durch die Light Cyler 480 Software bestimmt.

Assay		Steigung	Effizienz
Xtg	/	-3,688	1,867
	IAC	-3,707	1,861
Bac	/	-3,590	1,899
	IAC	-3,610	1,893
C. difficile	/	-3,420	1,960
	IAC	-3,420	1,961
C. sordellii	/	-3,450	1,949
	IAC	-3,402	1,968
L. monocytogenes	/	-3,658	1,877
	IAC	-3,494	1,933

2.1.7 Evaluation der PCR-Assays

Die Evaluation der qPCR-Assays ist Ausgangspunkt zuverlässiger Quantifizierungsergebnisse, speziell im Detektionsbereich niedriger Konzentrationen des nachzuweisenden Zielorganismus, da gerade an der Untergrenze des Kalibrierbereichs die relative Unsicherheit der Messwerte am größten ist. Hierbei wird generell zwischen dem Limit of Detection (LOD) und dem Limit of Quantification (LOQ) unterschieden. Bei dem LOD handelt es sich um die Nachweisgrenze, welche die niedrigste gemessene Konzentration darstellt, die mit festlegbarer Sicherheit von Null unterschieden werden kann. Der LOQ-Wert bezeichnet die Erfassungsgrenze und sagt aus, ab welcher DNA-Menge eine verlässliche Quantifizierung stattfinden kann (ARMBRUSTER & PRY 2008).

Für die Evaluation der Assays war es erforderlich sowohl die Nachweisgrenze LOD als auch die Bestimmungsgrenze LOQ zu ermitteln, um so im Rahmen der Quantifizierung

unbekannter Proben eine Aussage über die Validität der Ergebnisse vornehmen zu können. Hierfür wurden für jeden Assay die entsprechenden Standardreihen in den Konzentrationen 10^7 - 10^1 Kopien/ 2,5 μ L Kopien und NTC jeweils in 10-facher Bestimmung aufgetragen. Dadurch konnten über die Intra-Assay-Varianz Fehler berücksichtigt werden, die innerhalb einer Messung auftreten können. Weiterhin erfolgte die Wiederholung des Versuches über drei Tage, so dass jeder Assay im Triplikate durchgeführt wurde. Hierdurch konnten über die Inter-Assay-Varianz Abweichungen aufgedeckt werden, die sich bei Messungen über verschiedene Tage hinweg ergeben. In der Betrachtung wurden ausschließlich Quantifizierungsergebnisse der niedrigsten quantifizierbaren Molekülkonzentration erfasst. D.h., dass einzig die Residualstreuung in die Berechnungen für LOD und LOQ einbezogen wurde. Nachfolgend sind die dabei erhaltenen Werte für LOD und LOQ in Tabelle aufgeführt. Die Ergebnisse basieren auf dem exemplarisch dargestellten Berechnungsmodell.

Tabelle 16: Übersicht der Ergebnisse von Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für die Assays von Xtg, Bac, *C. difficile*, *C. sordellii* und *L. monocytogenes*. Es wurden für jeden Assay die entsprechenden Standardreihen in den Konzentrationen 10^7 - 10^1 Kopien/2,5 μ L Kopien und NTC jeweils in 10-facher Bestimmung aufgetragen. Die Bestimmung erfolgte im Triplikate. Die dargestellten Resultate ergeben sich aus dem Mittelwert der an drei Tagen durchgeführten Messungen.

Organismus	Xtg	Bac	<i>C. difficile</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>L. monocytogenes</i>
LOD (Kopien)	$2,62 \cdot 10^2$	$1,06 \cdot 10^5$	$6,18 \cdot 10^4$	$6,12 \cdot 10^4$	$7,77 \cdot 10^4$
LOQ (Kopien)	$5,25 \cdot 10^2$	$2,12 \cdot 10^5$	$1,24 \cdot 10^5$	$1,22 \cdot 10^5$	$1,55 \cdot 10^5$

Bei der Gegenüberstellung der LOD- und LOQ-Werte aller Detektionssysteme wird erkennbar, dass lediglich die Ergebnisse des Xtg-Nachweissystems auf eine wünschenswerte Funktionalität im niedrigen Quantifizierungsbereich der Assays hinweisen. Hier konnten Werte von 262 Kopien für LOD und 525 Kopien für LOQ ermittelt werden. Die Berechnung der Residualstreuung erfolgte mittels der Cp-Werte der niedrigsten Standardkonzentration der 10-fach Bestimmung mit 10^1 Kopien/2,5 μ L. Für das Bac- und *L. monocytogenes*-Nachweissystem konnte ebenso wie für den im Multiplex-Verfahren durchgeführten Clostridien-Assay (*C. difficile* und *C. sordellii*) ein valider Nachweis der Organismen erst ab Werten von 104 Kopien (LOD) erreicht werden. Hier liegen die Ergebnisse der Nachweisgrenze für Bac bei LOD=100600 Kopien bzw. für die Bestimmungsgrenze bei LOQ=212000 Kopien, *L. monocytogenes* kann erst ab einem LOD von 77700 Kopien nachgewiesen und ab 155000 Kopien (LOQ) quantitativ bestimmt werden. Das Multiplex-Detektionssystem zeigte mit LOD=60180 Kopien und LOQ=124000 Kopien für *C. difficile* bzw. LOD=60120 Kopien und LOQ=122000 Kopien für *C. sordellii* eine ähnlich schlechte Leistungsfähigkeit im Quantifizierungsbereich niedriger Konzentrationen. Sowohl für den Bac- und *L. monocytogenes*- als auch für den Clostridien-Multiplex-Assay entsprach die geringste Konzentration der 10-fach Bestimmung, die für die Berechnung der Residualstreuung in die Ermittlung der Werte für LOD und LOQ einbezogen werden konnte, 10^2 Kopien.

Anhand der erhaltenen Resultate, insbesondere für den Clostridien-Assay und den damit verbundenen Abweichungen gegenüber den im Forschungsprojekt ermittelten Werten von 10^2 Kopien für LOD und LOQ, wurde im weiteren Verlauf eine erneute Bestimmung der Parameter für *C. difficile* und *C. sordellii* im Mono-Assay durchgeführt (Forschungsbericht Master, KELBERT & KELEMEN 2016). Dabei konnten die in Tabelle dargestellten Ergebnisse ermittelt werden.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für *C. difficile* und *C. sordellii* im Mono-Assay sowie im Multiplex-Verfahren. Es wurden für jeden Assay die entsprechenden Standardreihen in den Konzentrationen 10^7 - 10^1 Kopien und NTC jeweils in 10-facher Bestimmung aufgetragen. Die Bestimmung erfolgte im Triplikat. Die dargestellten Resultate ergeben sich aus dem Mittelwert der an drei Tagen durchgeführten Messungen.

Organismus	Mono-Assay		Multiplex-Assay	
	<i>C. difficile</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. sordellii</i>
LOD (Kopien)	$5,00 \cdot 10^2$	$3,26 \cdot 10^2$	$6,18 \cdot 10^4$	$6,12 \cdot 10^4$
LOQ (Kopien)	$9,99 \cdot 10^2$	$6,53 \cdot 10^2$	$1,24 \cdot 10^5$	$1,22 \cdot 10^5$

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen eine deutliche Steigerung der Funktionalität im niedrigen Quantifizierungsbereich, sowohl für das *C. difficile*- als auch für das *C. sordellii*- Nachweissystem im Mono-Assay. Dabei konnte eine Reduktion für LOD und LOQ um etwa 2 log-Stufen auf 999 Kopien (LOQ) für *C. difficile* bzw. 653 Kopien (LOQ) für *C. sordellii* erreicht werden. Entsprechend des größeren Messbereichs als auch der höheren Assay-Empfindlichkeit wurden alle nachfolgenden Quantifizierungen im Mono-Assay durchgeführt.

Um die Leistungsfähigkeit bei der künftigen Anwendung entsprechender Assays über die Werte LOD und LOQ zu ermitteln, eignet sich die 10-fach Bestimmung einer Standardreihe über 7 log-Stufen im jeweiligen Assay am gleichen Tag. So können über die Intra-Assay-Varianz (Wiederholbarkeit) Fehler erfasst werden, welche sich innerhalb einer Messung ergeben können. Der Versuch wird über mehrere Tage hinweg in drei verschiedenen Assays je Organismus durchgeführt, um so zusätzlich Fehler aufzudecken, die bei Messungen über mehrere Tage hinweg entstehen können und als Inter-Assay-Varianz bezeichnet werden (Reproduzierbarkeit) (SIEPRATH 2005).

Die Berechnung von LOD und LOQ erfolgt dann anhand nachfolgend aufgeführter Berechnungsformeln. Die Betrachtung bezieht sich hier ausschließlich auf die Residualstreuung im Quantifizierungsbereich der niedrigsten Konzentration, da nur in diesem Kontext eine als relevant eingestufte Streuung vorliegt.

1. Berechnung von s_y

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (b * x_i + a)]^2}{n - 2}}$$

s_y = Residualstandardabweichung

y_i = Cp-Werte der Verdünnungsstufe

x_i = Verdünnungsstufe (z.B. log 101)

b = Steigung der Geradengleichung

a = Ordinatenabschnitt der Geradengleichung

2. Berechnung von LOD

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (b * x_i + a)]^2}{n - 2}}$$

$t_{f,\alpha}$ = α -Fehler (0,05)

m = Anzahl der Einzelbestimmungen

n = Gesamtanzahl der Messungen

= Mittelwert (MW) der Verdünnungsstufen

Q_{xx} = Summe der Quadrate aller Konzentrationen

3. Berechnung von LOQ

$$LOQ = 2 * LOD$$

(FUNK *et al.* 2005)

Die Anwendung von LOD und LOQ im Rahmen der Quantifizierung unbekannter Proben erfolgt über einen F-Test (FUNK 2005) zwischen der mittleren Residualstreuung $\overline{s_y}$ aus den Assays zur Bestimmung von LOD und LOQ und der jeweils aktuell vorliegenden Residualstreuung s_y aus der im Triplikat mitgeführten Standardreihe.

2.1.8 Untersuchung von Biogasproben aus Praxisanlagen mit Beurteilung der Robustheit der Nachweissysteme

2.1.8.1 Analyse der Biogasproben - Voruntersuchungen

Um eine Anwendung und abschließende Beurteilung der qPCR-Assays mit integrierter IAC unter Praxisbedingungen durchführen zu können, wurden sowohl Perkolatproben einer Laboranlage des ATB als auch Realproben aus einer Biogasanlage der Firma GICON extrahiert und quantifiziert. Die quantitative Bestimmung der bakteriellen DNA in dem in den Biogasreaktor eingebrachten Substrat Grassilage, der Prozessflüssigkeit (Perkolat) und den Gärresten ermöglichte neben einer Einschätzung der Assay-Funktionalität eine weiterführende Charakterisierung bezüglich der vorherrschenden Bedingungen für die Bakteriengemeinschaft und deren Überlebensfähigkeit.

Vor der eigentlichen Auswertung der Daten wurde zunächst der o.g. F-Test zwischen der mittleren Residualstreuung \bar{s}_y aus den Assays zur Bestimmung von LOD und LOQ und der jeweils aktuell vorliegenden Residualstreuung s_y aus der im Triplikat mitgeführten Standardreihe durchgeführt.

Die in **Tabelle 18** dargestellten Ergebnisse zeigen zunächst die resultierenden F-Werte und erlauben so in einem ersten Schritt eine entsprechende Aussage über die Validität der durchgeführten Assays. Eine zuverlässige Quantifizierung konnte schließlich nur unter der Maßgabe $\frac{s_y}{\bar{s}_y} \leq 3,35$ erfolgen. Für $\frac{s_y}{\bar{s}_y} \leq 3,35$ lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Residualstreuungen vor, so dass die Quantifizierungsergebnisse ausgewertet und LOD und LOQ entsprechend für den jeweiligen Assay angewendet werden konnten.

Tabelle 18: Übersicht der Ergebnisse der berechneten F-Werte für die Assays von Xtg, Bac, *C. difficile*, *C. sordellii* und *L. monocytogenes* bei der Quantifizierung unbekannter Proben aus der Laboranlage des ATB und der Praxisanlage der Firma GICON. Die Werte wurden dabei aus dem Quotienten von s_y zu \bar{s}_y gebildet. Alle Assays mit einem Resultat $<3,35$ können valide ausgewertet werden.

Messung	Proben	Xtg	<i>C. difficile</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Bac
1	GICON	1,50	1,72	1,57	1,40	2,59
2	GICON+ATB	1,58	1,64	1,70	2,25	2,53
3	ATB	1,51	1,62	1,55	1,53	3,23
4	ATB	2,96	1,58	1,66	0,96	2,63
5	ATB	1,62	1,64	1,60	1,52	1,12

Insgesamt konnten für alle durchgeführten Assays Werte $<3,35$ erzielt werden, so dass die zu quantifizierenden Proben und die daraus erhaltenen Messergebnisse valide bestimmt werden konnten. Speziell für die beiden Clostridien-Nachweissysteme wird bei Betrachtung der Werte deutlich, dass sie nur einer geringen Schwankungsbreite unterliegen (*C. difficile*: 1,58-1,72; *C. sordellii*: 1,55-1,70) und in sich eine große Konsistenz aufweisen. Das Bac-System zeigt mit höheren F-Werten bei etwa 2,50, dass ein zwar annehmbarer jedoch ersichtlicher Unterschied zu den durchgeführten LOD- und LOQ-Quantifizierungen besteht.

2.1.8.2 ATB-Proben

Weiteres Untersuchungsmaterial waren Proben aus einer Laboranlage des Projektpartners Leibniz Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) aus einem vierwöchigen Batchversuch mit einmaliger Befüllung. Die Charge verweilt dabei ohne Substratwechsel bis zum Ende der gewählten Zeit. Die Gasproduktion setzt nach der Füllung ein, erreicht ein Maximum und flacht dann im weiteren Verlauf wieder ab. Bei den betriebenen Reaktoren handelt es sich um zweistufige thermophile (55°C) als auch

zweistufige mesophile (37°C) Anlagen. Diese bestehen aus je einem Feststofffermenter, der zwei Siebe zur Platzierung der Grassilage beinhaltet, einem Perkolatspeicher (Ort der Hydrolyse) und einem anaeroben Festbett-Methanreaktor, der eine Biofilmbildung auf insgesamt 220 Füllkörpern ermöglicht. Die Durchflussrate liegt hier bei 18,4 mL/min. Die Gasabfuhr erfolgt sowohl aus dem Festbett Methanreaktor, als auch aus dem Feststofffermenter in je einen angeschlossenen Gasbeutel. Alle 2 h kommt es zur Umwälzung, indem 2 L der Prozessflüssigkeit aus dem Perkolatspeicher in den Feststofffermenter gepumpt werden. Um die Adaptation der Mikroorganismen im System zu gewährleisten, handelt es sich um eine kontinuierliche, pH Sonden gekoppelte Perkolation. Im Gesamtsystem befinden sich 32 L Prozessflüssigkeit. Als Substrat werden je Reaktor 500 g Grassilage eingesetzt, als Inokulationsmedium dient Rindergülle. Das für die Analytik bereit gestellte Perkolat entstammt dem Hydrolysereaktor.

Alle nachfolgend dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte, die aus jeweils drei technischen Replikaten gebildet wurden. Die Quantifizierungsergebnisse der Perkolatproben von Tag 0 der Fermentation basieren auf der DNA-Extraktion von nur einer Probe. In allen negativ durchgeführten Messungen konnten stets positive Signale für die IAC erhalten werden, so dass eine Inhibition der PCR und damit falsch-negative Resultate ausgeschlossen werden konnten. **Tabelle 19** führt die für Xtg detektierten Werte aus beiden mesophilen (HRIm und HRIlm) und thermophilen Hydrolysereaktoren (HRIt und HRItt) für den gesamten Fermentationszeitraum auf.

Tabelle 19: Ergebnisse der DNA-Quantifizierung zum Nachweis von Xtg (gemessen: 1:10 und 1:25) über einen Zeitraum von 28 Tagen aus zwei mesophilen und zwei thermophilen Biogasreaktoren der Laboranlagen des ATB. Die untersuchte DNA wurde aus der Prozessflüssigkeit extrahiert. Die Probenahme erfolgte an den Tagen 0 (nur für HRIm und HRIt), 2, 4, 7 und 28. Die Extraktion wurde im Triplikate durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte in Doppelbestimmung. Die tabellarisch aufgeführten Mittelwerte wurden entsprechend aus den Messwerten der technischen Triplikate gebildet. Als Basis für die Quantifizierung des Perkolats an Tag 0 diente nur das Extrakt einer Perkolatprobe.

Tag	HRIm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIlm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIt (Kopien/2mL Perkolat)	HRItt (Kopien/2mL Perkolat)
0	1,48*10 ⁴	-	8,95*10 ³	-
2	7,35*10 ⁴	8,24*10 ⁴	1,97*10 ⁵	2,53*10 ⁵
4	6,38*10 ⁴	4,13*10 ⁴	1,61*10 ⁵	1,19*10 ⁵
7	2,99*10 ⁴	4,10*10 ⁴	1,76*10 ⁵	1,28*10 ⁵
28	2,47*10 ⁴	9,48*10 ³	4,60*10 ⁴	2,86*10 ⁴

Die Bakterienzahl innerhalb der beiden mesophilen als auch der beiden thermophilen Reaktoren verhielt sich über den gesamten Fermentationszeitraum relativ konstant im Exponentialbereich von 10⁴ Kopien/2 mL Perkolat (HRIm und HRIlm) bzw. 10⁵ Kopien/2 mL Perkolat (HRIt und HRItt). Zwischen mesophiler und thermophiler Fermentation konnte eine geringfügig höhere bakterielle Besiedlung mit Xtg auf thermophiler Seite beobachtet werden. Alle Werte liegen sowohl oberhalb der Nachweisgrenze LOD mit

262 Kopien, als auch oberhalb der Bestimmungsgrenze LOQ mit 525 Kopien und können somit als valide Quantifizierungsergebnisse angenommen werden. **Tabelle 20** zeigt die für *L. monocytogenes* erhaltenen Ergebnisse für den Fermentationszeitraum von 28 Tagen.

Tabelle 20: Ergebnisse der DNA-Quantifizierung zum Nachweis von *L. monocytogenes* (gemessen: 1:10 und 1:25) über einen Zeitraum von 28 Tagen aus zwei mesophilen und zwei thermophilen Biogasreaktoren der Laboranlagen des ATB. Die untersuchte DNA wurde aus der Prozessflüssigkeit extrahiert. Die Probenahme erfolgte an den Tagen 0 (nur für HRIm und HRIt), 2, 4, 7 und 28. Die Extraktion wurde im Triplikate durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte in Doppelbestimmung. Die tabellarisch aufgeführten Mittelwerte wurden entsprechend aus den Messwerten der technischen Triplikate gebildet. Als Basis für die Quantifizierung des Perkolats an Tag 0 diente nur das Extrakt einer Perkolatprobe

. *unterhalb der Nachweisgrenze (LOD)

Tag	HRIm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIt (Kopien/2mL Perkolat)	HRIt (Kopien/2mL Perkolat)
0	1,06*10 ⁶	-	3,78*10 ⁴	-
2	1,48*10 ⁵	1,10*10 ⁵	8,80*10 ⁵	6,89*10 ⁴
4	3,92*10 ⁵	1,47*10 ⁶	3,89*10 ⁵	5,17*10 ⁴
7	2,70*10 ⁵	2,07*10 ⁵	1,11*10 ⁵	4,37*10 ⁴
28	6,54*10 ⁵	8,14*10 ⁵	9,50*10 ⁵	1,52*10 ⁵

Ähnlich wie bei Xtg konnten auch hier Quantifizierungswerte im Exponentialbereich von 10⁵ Kopien/2 mL Perkolat auf mesophiler und thermophiler Seite erhalten werden. Für HRIt lagen die Werte zwischen 4,37*10⁴ Kopien/2mL Perkolat und 6,89*10⁴ Kopien/2mL Perkolat und damit unterhalb der Nachweisgrenze LOD von 7777 Kopien. Die Ergebnisse für die beiden mesophilen Reaktoren können mit Werten >LOD als zuverlässiger Nachweis von *L. monocytogens* eingestuft werden. Auch hier unterlag die Besiedlung keinen Schwankungen und verhielt sich über den gesamten Zeitraum relativ unverändert. Weiterhin wurde die gesamte bakterielle Besiedlung der Reaktoren untersucht. Die dabei ermittelten Quantifizierungsergebnisse sind in **Tabelle 21** aufgeführt.

Tabelle 21: Ergebnisse der DNA-Quantifizierung zum Nachweis der Gesamtbakterien-DNA Bac (gemessen: 1:250 und 1:1000) über einen Zeitraum von 28 Tagen aus aus zwei mesophilen und zwei thermophilen Biogasreaktoren der Laboranlagen des ATB. Die untersuchte DNA wurde aus der Prozessflüssigkeit extrahiert. Die Probenahme erfolgte an den Tagen 0 (nur für HRIm und HRIt), 2, 4, 7 und 28. Die Extraktion wurde im Triplikate durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte in Doppelbestimmung. Die tabellarisch aufgeführten Mittelwerte wurden entsprechend aus den Messwerten der technischen Triplikate gebildet. Als Basis für die Quantifizierung des Perkolats an Tag 0 diente nur das Extrakt einer Perkolatprobe.

Tag	HRIm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIlm (Kopien/2mL Perkolat)	HRIt (Kopien/2mL Perkolat)	HRItt (Kopien/2mL Perkolat)
0	4,24*10 ¹⁰	-	6,60*10 ⁹	-
2	3,75*10 ¹⁰	9,76*10 ¹⁰	2,36*10 ¹⁰	2,55*10 ¹⁰
4	2,90*10 ¹⁰	7,40*10 ¹⁰	8,90*10 ⁹	7,78*10 ⁹
7	3,54*10 ¹⁰	6,32*10 ¹⁰	8,91*10 ⁹	1,29*10 ¹⁰
28	2,23*10 ¹⁰	3,93*10 ¹⁰	8,58*10 ⁹	8,25*10 ⁹

Innerhalb der beiden mesophilen als auch der beiden thermophilen Reaktoren zeigte die Gesamtbakterienzahl ebenso wie bei den Bakterien spezifischen Quantifizierungen von Xtg und *L. monocytogenes* über den gesamten Fermentationszeitraum einen konstanten Verlauf. Die Ergebnisse beliefen sich dabei auf Werte im Exponentialbereich von 10¹⁰ Kopien/2 mL Perkolat, sowohl für HRIm und HRIlm, als auch HRIt und HRItt. Zwischen mesophiler und thermophiler Fermentation konnten keine markanten Unterschiede der bakteriellen Besiedlung bemerkt werden.

Für *C. difficile* war weder ein qualitativer noch ein quantitativer Nachweis möglich. Eine Detektion von *C. sordellii* erfolgte vereinzelt, aber lieferte in wenigen Proben inhomogene, nicht aussagekräftige Ergebnisse in sehr späten Zyklen der PCR.

2.1.8.3 Gicon-Proben

Dazu standen Proben einer Praxisanlage der Firma GICON über einen Fermentationszeitraum von 21 Tagen zur Verfügung. Das GICON-System besteht dabei aus 6 Perkolatoren (37°C), die mit dem Substrat (in diesem Fall Grassilage) befüllt sind. Die Prozessflüssigkeit (Perkolat) dieser Perkolatoren wird in einem System vereint bevor sie in den mit Füllkörpern gefüllten Methanreaktor überführt wird. Nach dem Durchströmen des Methanreaktors wird das Perkolat zurück in die Perkolatoren geleitet. Die Substrat- und Gärrestproben wurden aus einem der 6 Perkolatoren entnommen. Die Perkolatproben vom Starttag wurden einmal vor bzw. nach dem Methanreaktor entnommen. Weitere Proben stammen aus dem Ablauf des Perkolators.

Die zuvor aufgeführten Ergebnisse zeigen die Werte der gesamten bakteriellen Besiedlung als auch für die einzelnen Stämme *C. difficile*, *C. sordellii*, *L. monocytogenes* und Xtg des mesophilen Reaktors (37°C) der Firma GICON über den Zeitraum von drei Wochen. Ebenso werden die in der Grassilage detektierten DNA-Konzentrationen und die Betrachtung der Gärreste des Reaktors dargestellt. Die untersuchten Substrat- und

Gärrestproben wurden dabei aus einem der sechs mesophilen, das Gesamtsystem umfassenden Perkolatoren entnommen. Die Perkolatproben vom Starttag wurden einmal vor bzw. nach dem Methanreaktor entnommen. Weitere Proben wurden aus dem Ablauf des Perkolators gewonnen.

Die Analytik der untersuchten Proben konnte herausstellen, dass weder *C. difficile*, noch *C. sordellii* in den Realproben der Biogasanlage nachweisbar waren. Dieses Ergebnis ist allerdings kritisch zu bewerten, da die bereits zuvor im Rahmen des Forschungsprojektes ohne IAC durchgeführte Quantifizierung sowohl mit einem positiven Nachweis von *C. difficile* als auch *C. sordellii* im Output der Anlage erfolgte. Ähnlich verhält es sich auch für die Ergebnisse von Xtg. Hier konnte in vorangegangenen Versuchen ohne IAC in fast allen untersuchten Proben DNA des Phytopathogens nachgewiesen werden (Forschungsbericht Master, KELBERT & KELEMEN 2016).

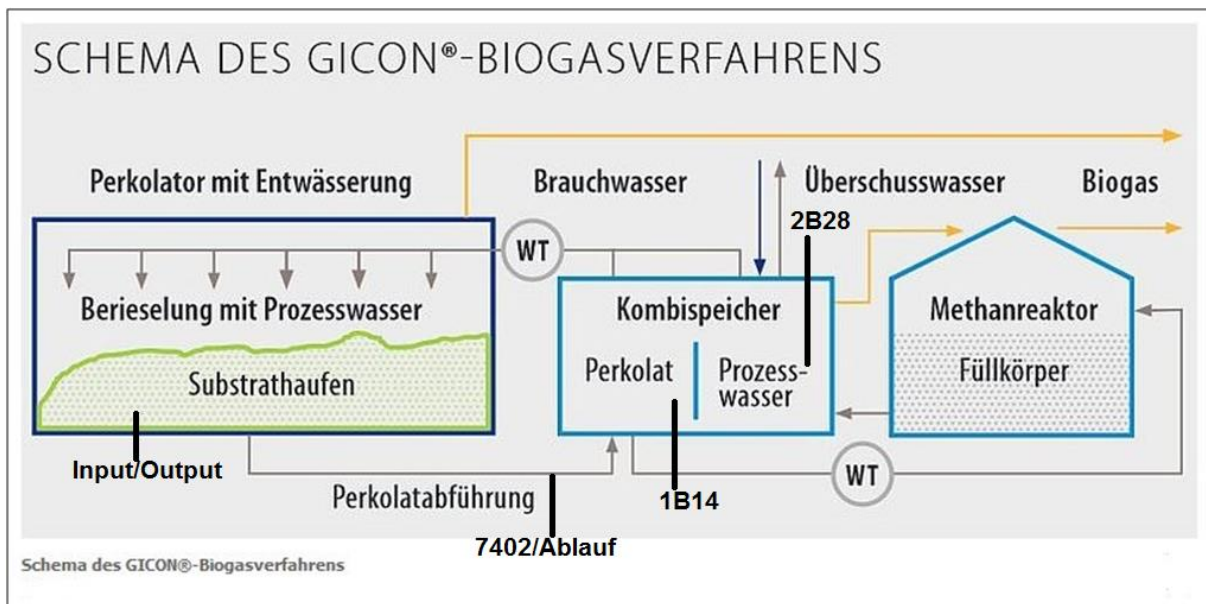


Abbildung 8: Schema des GICON®-Biogasverfahrens mit Kennzeichnung der Probenahme (<http://www.gicon-engineering.com/gicon-biogas-technologien/das-gicon-biogasverfahren.html>; 31.08.2016)

3 Abschlussbetrachtung des TP5

Insgesamt ist es im TP5 daher gelungen, für alle als relevant erachteten Mikroorganismen ein robustes und im Praxistest an unterschiedlichen Anlagentypen sich bewährt habendes qPCR-Nachweissystem zu etablieren. Das System besitzt durch die Integration einer IAC eine für den Routineeinsatz notwendige interne Kontrolle. Die entsprechenden Nachweisgrenzen des LOQ und LOD wurden bestimmt. Das Projekt konnte daher erfolgreich abgeschlossen werden. Eine Publikation der Einzelresultate ist noch in Arbeit.

3.1 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Arbeiten wurden größtenteils wie geplant durchgeführt. Notwendige Änderungen des Arbeitsprogramms wurden in den einzelnen Zwischenberichten erläutert und jeweils mit den Projektpartnern abgestimmt.

Investitionen wurden nur in geringem Maße wie im Mittelnachweis aufgeführt getätigt, die Beschaffungen im Kleinmaßstab als auch Aufträge erfolgten wie berichtet durch die Haushalts-Abrechnung der Beuth Hochschule für Technik Berlin.

3.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Ein großer Erfolg waren die vergleichenden Analysen zur DNA-Analytik (LEBUHN *et al.* 2016) als auch die erfolgreiche Implementierung der TP5-qPCR-Analysen für Material aus Biogasreaktoren der Partner als auch einer Praxisanlage. Auch die Metagenom- und Transkriptomanalysen der Partner halfen hier die geeigneten Indikatorkeime auszuwählen und zu bestätigen. Daher betrachten wir die gewonnenen Erkenntnisse als relevant, um zukünftig molekularbiologische Nachweisverfahren für prozessrelevante Bakterien zum Monitoring von Biogasanlagen einführen zu können.

3.3 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Bei einer weiter zunehmenden Kommerzialisierung und Notwendigkeit zur Überwachung von Biogasanlagen können die aus dem TP5 als auch aus dem Gesamtprojekt gewonnenen Erkenntnisse gut vorstellbar in Praxisassays eingesetzt werden.

3.4 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Hier verweisen wir auf die Gesamtbetrachtung des Projektkoordinators. Im Bereich des Nachweises pathogener Mikroorganismen sind stetige Fortschritte erzielt worden, jedoch sind außer beim Nachweis Antibiotika-resistenter Keime () nur wenige Biogasrelevante Arbeiten zum Nachweis pathogener Mikroorganismen publiziert worden (z.B.: FRÖSCHLE *et al.* 2015).

3.5 Darstellung der erfolgten Veröffentlichung der Ergebnisse

Beiträge auf Fachtagungen:

RINCK P, TSCHÖRTNER J, HELBIG S*, PROWE S, „Development of a rapid detection system for *Clostridium sordellii* and *Clostridium difficile* in biogas reactors based on quantitative real-time PCR”, VAAM-Jahrestagung, 05.-08. Oktober 2014, Dresden

KELEMEN K, KELBERT T, HELBIG S, FISCHER S, PROWE S, “Validation of assays for detection of relevant pathogenic microorganisms in a grass-silage biogas process” VAAM-Jahrestagung, 13.-16. März 2016, Jena

PROWE S, KELEMEN K, HANNEMANN F, “Qualification of rtPCR assays for detection of selected pathogenic microorganisms in a grass- silage biogas process “,VAAM-Jahrestagung, 05.-08. März 2017, Würzburg

Veröffentlichungen:

LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, STOLZE Y, PROWE S, SCHWARZ WH, SCHLÜTER A, LIEBL W & KLOCKE M (2016) “DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison”, *Bioengineering*, 3(1) – article no. 7, online via <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering3010007>

PROWE S, HELBIG S, FISCHER S, Etablierung von molekularen Nachweissystemen auf Basis der quantitativen (real-time) PCR zum Monitoren pathogener Mikroorganismen in einem Biogasprozess IN: *Research Day 2016 Stadt der Zukunft: Tagungsband - 5.7.2016*, ISBN 978-3-8305-3756-4

Abschlussarbeiten und Praxisphasen (Studierende der Beuth Hochschule für Technik, Studiengang Biotechnologie:

Alisa Trippner (Masterarbeit)

Peter Rinck (Masterarbeit)

Nina Sperling (Master-Forschungsprojekt)

Tatiana Kelbert (Master-Forschungsprojekt)

Kathrin Kelemen (Bachelorarbeit; Master-Forschungsprojekt; Masterarbeit)

Jenny Tschörtner (Master-Forschungsprojekt, BTU Cottbus)

4 Zitierte Literatur

- ABOU-DONIA M (ed.) (2015):** Mammalian Toxicology. Wiley & Sons Ltd, ISBN: 978-1-119-94041-8.
- AL-MASHAT RR, TAYLOR DJ (1983):** Production of diarrhoea and enteric lesions in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Clostridium sordellii*. The Veterinary Record 112: 141-146.
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997):** "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs." Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.
- ARMBRUSTER AD, PRY T (2008):** Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. The Clinical Biochemist Reviews 29: 49-52.
- BAGGE E (2009):** Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteria. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- BAuA, TRBA 466** Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html> (Zugriff 2016)
- BAUER C, KORTHALS M, GRONAUER A, LEBUHN M (2008):** Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. Water Science & Technology 58: 1433.
- BERGMANN I, MUNDT K, SONTAG M, BAUMSTARK I, NETTMANN E, KLOCKE M (2012):** Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. Systematic and Applied Microbiology 33: 78-84.
- BFR: BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2016):** Lebensmittelsicherheit: *Listerien*. <http://www.bfr.bund.de/de/listerien-54356.html> (abgerufen 10.08.2016).
- BONETTA S, FERRETTI E, FEZIA G, CARRARO E (2011):** Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. Letters in Applied Microbiology 53: 552-557.
- CARTER GP, DOUCE GR, GOVIND R, HOWARTH PM, MACKIN KE, et al. (2011a):** The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. PLOS Pathogens 7: e1002317.
- CLARK S (2003):** Sudden death in periparturient sheep associated with *Clostridium sordellii*. The Veterinary Record 153: 340.
- DARAI G, HANDERMANN M, HINZ E, SONNTAG H-G (2009):** Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Springer Verlag (Heidelberg), 3. Auflage, 488-498.
- DE GROOT B, DEWEY CE, GRIFFIN DD, PERINO LJ, MOXLEY RA, HAHN GL (1997):** Effect of booster vaccination with a multivalent clostridial bacterin-toxoid on sudden death syndrome mortality rate among feedlot cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 211: 749-753.
- DE VOS P, GARRITY GM, JONES D, KRIEG NR, LUDWIG W, RAINEY FA, SCHLEIFER K-H, WHITMANN WB (2009):** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes., (2nd ed., 1-26), Springer Verlag (New York).
- DOHRMANN AB, BAUMERT S, KLINGEBIEL L, WEILAND P, TEBBE CC (2010):** Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. Applied Microbiology and Biotechnology 89: 1991-2004.
- DRCA M (2007):** Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen

Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und Escherichia coli aus biologischem Material. Universität Leipzig.

- EIKMEYER F, RADEMACHER A, HANREICH A, HENNIG S, JAENICKE S, MAUS I, WIBBERG D, ZAKRZEWSKI M, PÜHLER A, KLOCKE M, SCHLÜTER A (2013):** Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. *Biotechnology for Biofuels* 6: 49.
- FACHVERBAND BIOGAS E. V. (2014):** Hygienepapier. Verhalten von Krankheitserregern in Biogasanlagen. Hintergrundpapier H-002, Freising, 1-10.
- FARBER JM, ROSS WH, HARWIG J (1996):** Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 30: 145-156.
- FRÖSCHLE B, MESSELHAEUSSER U, HÖLLER C, LEBUHN M (2015):** Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. *Journal of Applied Microbiology* 119: 936-947.
- FUNK W, DAMMANN V, DONNEVERT G (2005):** Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. Kapitel 1.3, WILLEY-VCH, Weinheim.
- GARCÉS G, EFFENBERGER M, NAJDROWSKI M, WACKWITZ C, GRONAUER A, WILDERER PA, LEBUHN M (2006):** Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. *Water Science & Technology* 53: 195.
- GOBERNA M, PODMIRSEG SM, WALDHUBER S, KNAP, BA, GARCÍA,C. INSAM H (2011):** Pathogenic bacteria and mineral N in soils following the land spreading of biogas digestates and fresh manure. *Applied Soil Ecology* 49: 18-25.
- GOULD LH, LIMBAGO B (2010):** *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new food-borne pathogen? *Clinical Infectious Diseases* 51: 577-582.
- HOORFAR J, MALORNY B, ABDULMAWJOOD A, COOK N, WAGNER M, FACH P (2004):** Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1863-1868.
- HORAN NJ, FLETCHER L, BETMAL SM, WILKS SA, KEEVIL CW (2004):** Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research* 38: 1113-1120.
- KEEL K, BRAZIER JS, POST KW, WEESE S, SONGER JG (2007):** Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1963-1964.
- KELBERT T, KELEMEN K (2016):** Optimierung, Validierung und Evaluation etablierter qPCR-Assays zur Detektion relevanter Pathogene im Biogasprozess, Forschungsarbeit an der Beuth Hochschule für Technik Berlin, 1-90.
- KELEMEN K (2014):** Quantitative Analyse des Pflanzenpathogens *Xanthomonas translucens* innerhalb von mesophilen und thermophilen zweistufigen Biogasanlagen unter Verwendung des Substrats Grassilage. Bachelorarbeit an der Beuth Hochschule für Technik Berlin, 1-36.
- KLEIN M, BROWN L, ASHBOLT NJ, STUETZ RM, ROSER DJ (2011):** Inactivation of indicators and pathogens in cattle feedlot manures and compost as determined by molecular and culture assays. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 200-210.
- KLEIN M, BROWN L, VAN DEN AKKER B, PETERS GM, STUETZ RM, ROSER DJ (2010):** Monitoring bacterial indicators and pathogens in cattle feedlot waste by real-time PCR. *Water Research* 44: 1381-1388.
- KUHN I, IVERSEN A, BURMAN LG, OLSSON-LILJEQUIST B, FRANKLIN A, FINN M, AARESTRUP F, et al. (2003):** Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *International Journal of Food Microbiology* 88: 133-145.

- KUMAR R, GUPTA MK., KANWAR SS (1999):** Fate of bacterial pathogens in cattle dung slurry subjected to anaerobic digestion, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 335-338.
- LEBUHN M, DERENKÓ J, RADEMACHER A, HELBIG S, MUNK B, PECHTL A, et al. (2016):** DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison. *Bioengineering* 3: 7.
- LEBUHN M, EFFENBERGER M, GARCÉS G, GRONAUER A, WILDERER PA (2005):** Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Science & Technology* 52: 93-99.
- LEBUHN M, EFFENBERGER M, GARCÉS G, GRONAUER A, WILDERER PA (2004):** Evaluating real-time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Science & Technology* 50: 263-270.
- LEBUHN M, EFFENBERGER M, GRONAUER A, WILDERER PA, WUERTZ S (2003):** Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Science & Technology* 48: 97-103.
- LEWIS CJ, NAYLOR RD (1998):** Sudden death in sheep associated with *Clostridium sordellii*. *The Veterinary Record* 142: 417-421.
- LIBBY DB, BEARMAN G (2009):** Bacteremia due to *Clostridium difficile*-review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases* 13: 305-309.
- LORBER B (2000):** *Listeria monocytogenes*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, (5th ed., 2208-2214), Elsevier Saunders.
- LUND M, NORDENTOFT S, PEDERSEN K, MADSEN M (2004):** Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5125-5132.
- MAES M, GARBEVA P., KAMOEN O (1996):** Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 63-69.
- NOGVA HK, RUDI K, NATERSTAD K, HOLCK A, LILLEHAUQ D (2000):** Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4266-4271.
- PARKINSON N, ARITUA V, HEENEY J, COWIE C, BEW J, STEAD D (2007):** Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2881-2887.
- RYAN JR (2004):** *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroids*, and other Anaerobes. In KJ RYAN, CG RAY, Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases (4th ed., 309-326), The McGraw-Hill Companies.
- SAHLSTRÖM L (2003):** A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 87: 161-166.
- SEIGNER LR, KAEMMERER D, BUTTNER P, POSCHENRIEDER G, HERMANN A, GRONAUER A (2012):** "Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses, Ergebnisse aus einem Forschungsprojekt". Freising-Weihenstephan. http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_23481.pdf.
- SIEPRATH U (2005):** Spektrofluorometrische Selenbestimmung in Urinproben. Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 1-85.
- SLANA I, PRIBYLOVA R, KRALOVA A, PAVLIK I (2011):** Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3115-3119.

SONG Y, LIU C, MOLITORIS D, TOMZYNSKI TJ, TEAGUE MM, READ E, FINEGOLD SM (2002): Use of 16S–23S rRNA spacer-region (SR) - PCR for identification of intestinal Clostridia. *Systematic and Applied Microbiology* 535: 528-535.

TRIPPNER A (2013): Evaluation von *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* als einer der pathogenen Indikatoren im Biogasprozess, Masterarbeit.

WAGNER AO, GSTRANTHALER G, ILLMER P (2008): Survival of bacterial pathogens during the thermophilic anaerobic digestion of biowaste: laboratory experiments and in situ validation. *Anaerobe* 14: 181-183.

WICHMANN F (2011): Genetic Characterization of the Interaction Between Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. Dissertation an der Universität Zürich (http://www.zora.uzh.ch/59375/1/Dissertation_Wichmann.pdf)

YOO J, LIGHTNER AL (2010): *Clostridium difficile* infections: what every clinician should know. *The Permanente Journal* 14: 35-40.

In der Reihe

Bornimer Agrartechnische Berichte

sind bisher erschienen:

Heft 1	Technik und Verfahren der Landschaftspflege	1992
Heft 2	Beiträge zur Lagerung und Verarbeitung pflanzenbaulicher Produkte	1993
Heft 3	Technik und Verfahren in der Tierhaltung	1993
Heft 4	Technik und Verfahren der Landschaftspflege und für die Verwendung der anfallenden Materialien	1994
Heft 5	Verfahrenstechnik der Aufbereitung, Lagerung und Qualitätserhaltung pflanzlicher Produkte	1994
Heft 6	Biokonversion nachwachsender Rohstoffe und Verfahren für Reststoffbehandlung	1994
Heft 7	Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Landarbeit und Schlepperprüffeld in Bornim 1927 bis 1945	1995
Heft 8	Qualitätssicherung und Direktvermarktung	1996
Heft 9	Konservierende Bodenbearbeitung auf Sandböden	1996
Heft 10	Anwendung wärme- und strömungstechnischer Grundlagen in der Landwirtschaft	1996
Heft 11	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1996	1996
Heft 12	Aufbereitung und Verwertung organischer Reststoffe im ländlichen Raum	1996
Heft 13	Wege zur Verbesserung der Kartoffelqualität durch Verminderung der mechanischen Beanspruchung	1997
Heft 14	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1997	1997
Heft 15	Technische und ökonomische Aspekte der Nutztierhaltung in großen Beständen	1997
Heft 16	11. Arbeitswissenschaftliches Seminar	1997
Heft 17	Nachwachsende Rohstoffe im Land Brandenburg Stand Aktivitäten und Perspektiven einer zukunftsfähigen und umweltgerechten Entwicklung	1998
Heft 18	Qualität von Agrarprodukten	1998
Heft 19	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1998	1998
Heft 20	Beiträge zur teilflächenspezifischen Bewirtschaftung	1998

Heft 21	Landnutzung im Spiegel der Technikbewertung – Methoden Indikatoren, Fallbeispiele	1998
Heft 22	Kriterien der Nachhaltigkeit in der Verfahrensentwicklung für die Nutztierhaltung	1999
Heft 23	Situation und Trends in der Landtechnik / Erneuerbare Energien in der Landwirtschaft	1999
Heft 24	Institut für Landtechnik der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 1951 bis 1965	1999
Heft 25	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1999 / 2000	2000
Heft 26	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2001	2001
Heft 27	Approaching Agricultural technology and Economic Development of Central and Eastern Europe	2001
Heft 28	6 th International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering	2001
Heft 29	Measurement Systems for Animal Data and their Importance for Herd Management on Dairy Cow Farms	2002
Heft 30	Produktion, Verarbeitung und Anwendung von Naturfasern	2002
Heft 31	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2002	2002
Heft 32	Biogas und Energielandwirtschaft - Potenzial, Nutzung, Grünes Gas TM , Ökologie und Ökonomie	2003
Heft 33	Sozioökonomische Aspekte zu Perspektiven des Offenlandmanagements	2003
Heft 34	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2003	2003
Heft 35	Energieholzproduktion in der Landwirtschaft Potenzial, Anbau, Technologie, Ökologie und Ökonomie	2004
Heft 36	High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 2003	2004
Heft 37	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2004	2004
Heft 38	Die Landmaschinenprüfung in der DDR 1951-1991 und ihre Vorgeschichte	2004
Heft 39	Energieverlust und Schimmelpilzentwicklung bei der Lagerung von Feldholz-Hackgut	2005
Heft 40	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2005	2005
Heft 41	Demonstration der Langzeitwirkung bedarfsorientierter Fungizidbehandlung mit dem CROP-Meter	2005

Heft 42	Biochemicals and Energy from Sustainable Utilization of herbaceous Biomass (BESUB)	2005
Heft 43	Ozontes Waschwasser zur Qualitätssicherung leichtverderblicher Produkte - Entwicklung einer <i>Fuzzy-Logic</i> -Steuerung des Waschprozesses	2005
Heft 44	Messsystem zur Bewertung des Unkrautvorkommens	2005
Heft 45	Anwendung der Thermographie zur Optimierung der Belüftungssteuerung bei der Lagerhaltung landwirtschaftlicher Produkte	2005
Heft 46	Membranbioreaktor zur Aufbereitung von Schlachthofabwässern Prozesssteuerung von Biogasanlagen mit Kofermentation	2005
Heft 47	Verschleißeinfluss auf das Förderverhalten von Drehkolbenpumpen	2005
Heft 48	Qualitätserhaltung und Qualitätssicherung von Bioobst und Biogemüse in der Nachernte	2005
Heft 49	Miniaturisiertes Datenerfassungs-System zum Implantieren in Früchte und zur Messung ihrer mechanischen Belastung durch Ernte- und Nachernteverfahren	2005
Heft 50	Prozesskontrolle der Qualität von frischem Obst und Gemüse mit Hilfe eines Multigas-Sensors	2005
Heft 51	Entwicklung eines Echtzeitsensors für die Stärkebestimmung bei Kartoffeln als funktionaler Bestandteil eines optoelektronischen Verleseautomaten	2005
Heft 52	Optimierte Steuerung von Getreide-Schachttrocknern	2005
Heft 53	Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung von Rizinusöl	2005
Heft 54	Non-Destructive Methods for Detecting Health-Promoting Compounds COST Action 924 Working Group Meeting	2005
Heft 55	4 th IFAC / CIGR Workshop Control Applications in Post - Harvest and Processing Technology (CAPPT 2006) 26th - 29th March 2006, Potsdam, GERMANY	2006
Heft 56	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2006	2006
Heft 57	Kontrolle der Frische in der Nacherntekette von Ökogemüse	2006
Heft 58	Entwicklung eines innovativen Dekontaminationsverfahrens als Technologieantwort auf zukünftiges Qualitätsmanagement im Nacherntebereich	2006
Heft 59	Experimental Studies and Mathematical Modelling of Solar Drying System for Production of High Quality Dried Tomato	2007

Heft 60	13. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft & 4. Workshop Precision Farming	2007
Heft 61	Energiepflanzen im Aufwind Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Erfahrungen zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz	2007
Heft 62	14. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft	2008
Heft 63	Experten-Workshop Lagerung von Holzhackschnitzeln	2008
Heft 64	Postharvest unlimited 2008	2008
Heft 65	Vom Agrarrohstoff zu neuen Produkten – Verfahrens- technische Forschung im Nacherntebereich	2009
Heft 66	16. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau	2009
Heft 67	Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis- Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist- Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissys- tems	2009
Heft 68	Wieviel Biogas steckt in Pflanzen? Abschluss- Symposium des "Biogas-Crops-Network" (BCN) 7. Mai 2009 Potsdam	2009
Heft 69	Image Analysis for Agricultural Products and Processes 27 to 28. Aug. 2009 Potsdam	2009
Heft 70	5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management 31. Aug. to 02. Sept. 2009 Potsdam	2009
Heft 71	Einsatz von Biogas in PEM-Brennstoffzellen	2009
Heft 72	Teilflächenspezifische Grunddüngung	2009
Heft 73	16. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 04. Mai 2010 Braunschweig	2010
Heft 74	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette Getreide-</i>	2010
Heft 75	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette pflanzliche Frischeprodukte-</i>	2010
Heft 76	International Workshop The future of the quarter individual milking 14. – 15. September 2010 Potsdam	2010
Heft 77	A flow cytometric approach to monitor the effects of gentle preservation techniques in the postharvest chain	2011

Heft 78	17. und 18. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 05. Mai 2011 Stuttgart und 09. Mai 2012 Osnabrück	2012
Heft 79	2. Öffentliches Symposium des „BCN“ BiogasPOTENZIALE Erkennen, Erforschen, Erwirtschaften	2012
Heft 80	Mechanisms of Bacillus spore germination and inactivation during high pressure processing	2013
Heft 81	19. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 2. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme in der Landwirtschaft 06. – 07. Mai 2013 Berlin	2013
Heft 82	3rd Global Workshop on Proximal Soil Sensing	2013
Heft 83	19. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau 11. – 12. März 2014 Dresden	2014
Heft 84	Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen Schlussbericht zum Forschungsverbund BIOGAS-BIOCOENOSIS	2014
Heft 85	Sensoren. Modelle. Erntetechnik Kolloquium zur Verabschiedung von Dr. Ehlert 27. Mai 2014, Potsdam-Bornim	2014
Heft 86	Phosphor für die Landwirtschaft – Strategien für eine endliche Ressource 11. Juni 2014, Potsdam-Bornim	2014
Heft 87	Biofilme in Biogasanlagen - Struktur, Einfluss auf die Bio- gasausbeute und Optimierung technischer Systeme zur Rück- haltung der mikrobiellen Biomasse BIOGAS-BIOFILM	2015
Heft 88	20. und 21. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirt- schaft 3. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme (UAS) in der Landwirtschaft 26. Mai 2014, Osnabrück und 06. und 07. Mai 2015, Braun- schweig	2015
Heft 89	International Biochar Symposium: Biochar Contribution to Sus- tainable Agriculture 28 th – 29 th May 2015, Potsdam	2015
Heft 90	ISHS Symposium 2016 “Sensing Plant Water Status” Methods and Applications in Horticultural Science 05 th – 07 th October 2016 Potsdam	2016
Heft 91	10 Th International FRUTIC Symposium Quality and Safety of Fresh Horticultural Commodities February 07, 2017	2017

Heft 92	Etablierung eines <i>core</i> -Mikrobioms für Biogasanlagen Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen BIOGAS-CORE	2017
Heft 93	22. Workshop Computer-Bildanalyse und Unbemannte auto- nom fliegende Systeme in der Landwirtschaft 23. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 21. April 2016, Wernigerode und 27. April 2017, Potsdam- Marquardt	2017
Heft 94	Leitfaden für die Trocknung von Arznei- und Gewürzpflanzen	2017
Heft 95	Entwicklung von molekularen Markern und Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen PCR für das Monitoring von pro- zessrelevanten Mikroorganismen als Frühwarnsysteme für Prozessstörungen	2017

Interessenten wenden sich an:

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam

Tel.: (0331) 5699-820
Fax.: (0331) 5699-849
E-Mail: atb@atb-potsdam.de

Schutzgebühr Print: 20,00 Euro

CD-Rom: 10,00 Euro