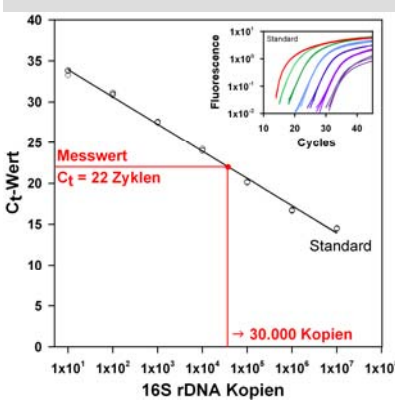


**Monitoring der  
methanbildenden Mikroflora in  
Praxis-Biogasanlagen im  
ländlichen Raum:  
Analyse des Ist-Zustandes und  
Entwicklung eines  
quantitativen Nachweissystems**



Bundesministerium für  
Ernährung, Landwirtschaft  
und Verbraucherschutz



**Bornimer Agrartechnische Berichte**

Heft 67

Potsdam-Bornim 2009

**Monitoring der  
methanbildenden Mikroflora in  
Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum:  
Analyse des Ist-Zustandes und  
Entwicklung eines  
quantitativen Nachweissystems**



Bundesministerium für  
Ernährung, Landwirtschaft  
und Verbraucherschutz

---

Bornimer Agrartechnische Berichte  
Heft 67

Potsdam-Bornim 2009

**Herausgeber:**

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.  
Max-Eyth-Allee 100  
14469 Potsdam-Bornim  
☎ (0331)-5699-0  
Fax.: (0331)-5699-849  
E-mail: [atb@atb-potsdam.de](mailto:atb@atb-potsdam.de)  
Internet: <http://www.atb-potsdam.de>

April 2009

**Autoren:**

Dr. rer. nat. Michael Klocke  
Dipl.-Biol. Edith Nettmann  
Dipl.-Biol. Ingo Bergmann

**Layout:**

Andrea Gabbert

Herausgegeben vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) mit Förderung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Ministeriums für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg.

Für den Inhalt der Beiträge zeichnen die Autoren verantwortlich.

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

ISSN 0947-7314

© Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Potsdam-Bornim 2009

# **Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweis-systems**

Dr. rer. nat. Michael Klocke  
Dipl.-Biol. Edith Nettmann  
Dipl.-Biol. Ingo Bergmann

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

## **Gefördert durch**

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

## **Projektträger**

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR)  
Hofplatz 1  
18276 Gülzow

## **Förderkennzeichen**

22011804

## **Danksagung**

Dieses Projekt wurde finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) in Projektträgerschaft durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) (Förderkennzeichen 22011804).

Weiterhin sind die Autoren folgenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ATB, der TU Berlin - FG Umweltmikrobiologie, der HAW Hamburg - FG Lifetec Engineering sowie der LfL Freising für die geleistete technische und ideelle Unterstützung zu Dank verpflichtet (in alphabetischer Reihenfolge): Frank Blume, Helene Foltan, Andrea Gabbert, Elisabeth Grohmann, Regina Hager, Christiane Herrmann, Werner B. Herppich, Niclas Krakat, Michael Lebuhn, Bernd Linke, Patrick Merz, Jan Mumme, Kerstin Mundt, Lukas Neumann, Vincent Plogsties, Stefanie Pramschüfer, Giovanna Rehde, Anika Rögner, Hannelore Schelle, Paul Scherer, Mandy Schönberg, Khadidja Souidi, Ulrich Szewzyk.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.1 Aufgabenstellung</b> .....	<b>9</b>
<b>I.2 Voraussetzungen</b> .....	<b>9</b>
<b>I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens</b> .....	<b>10</b>
I.3.1 Geplanter Versuchsablauf laut Vorhabensbeschreibung .....	10
I.3.2 Änderungen gegenüber dem geplanten Versuchsablauf .....	12
<b>I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an welchem angeknüpft wurde</b> .....	<b>14</b>
I.4.1 Bekannte Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, welche für das Vorhaben benutzt wurden .....	14
I.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur .....	14
I.4.3 Benutzte Informations- und Dokumentationsdienste .....	16
<b>I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b> .....	<b>18</b>
<b>II.1 Darstellung der Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
Teil A: Beschreibung des Ist-Zustandes in Praxis-Anlagen .....	19
<i>A-1 Beprobung von Praxisanlagen</i> .....	19
<i>A-2 Anlage der 16S rDNA Klonbibliotheken</i> .....	21
<i>A-3 Sequenzierung ausgewählter Klone mit individuellen ARDRA fingerprints</i> .....	24
<i>A-4 Anlage von mcrA Klon-Banken</i> .....	32
<i>Zusammenfassung Versuchsteil A</i> .....	42
Teil B: Entwicklung eines kulturunabhängigen quantitativen Nachweisverfahrens für methanbildende Mikroorganismen basierend auf 16S rDNA und <i>mcrA</i> Sequenz .....	43
<i>B-1 Entwicklung eines semi-quantitativen Nachweissystems mittels konventioneller PCR</i> .....	43
<i>B-2 Entwicklung eines quantitativen real-time-PCR-Protokolls</i> .....	47
<i>B-3 Anwendung des 16S rDNA Assays an Labor- und Praxisanlagen</i> .....	61
Teil C: Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	65
Zusammenfassung und Bewertung der Analyseergebnisse der methanogenen Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen .....	73
Zitierte Literatur .....	78
<b>II.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse</b> .....	<b>81</b>
<b>II.3 Fortschritte anderer Stellen</b> .....	<b>81</b>

<b>II.4 Veröffentlichungen .....</b>	<b>82</b>
II.4.1 Referierte Fachartikel .....	82
II.4.2 Beiträge zu Sammelwerken .....	82
II.4.3 Posterpräsentationen auf Fachtagungen .....	83
II.4.4 Vorträge auf Fachtagungen .....	84
Bild- und Tabellenverzeichnis .....	85
In der Reihe Bornimer Agrartechnische Berichte erschienen .....	87







## I.1 Aufgabenstellung

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlichen Primärprodukten oder Reststoffen stellt einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes sowie zur Entwicklung einer nachhaltigen Landbewirtschaftung dar. Gegenwärtig steht im Fokus der angewandten Forschung die Entwicklung von optimierten Biogas-Reaktoren, die Etablierung von optimierten Reaktorfahrweisen sowie die Optimierung der Substratbereitstellung, detaillierte Analysen der beteiligten Mikroorganismen bzw. der Artenzusammensetzung in Praxis-Biogasanlagen fehlen jedoch bislang. Kultivierungs-unabhängige Methoden für die schnelle und reproduzierbare Quantifizierung der methanogenen Archaea sind derzeit ebenfalls nicht verfügbar.

Im Rahmen dieses Projektes soll daher die Artenzusammensetzung der methanogenen Mikroflora in ausgewählten Praxis-Biogasanlagen anhand ihrer 16S rDNA analysiert werden. Weiterhin soll ein quantitatives Nachweissystem für diese Arten basierend auf spezifischen DNA Sequenzen der 16S rDNA bzw. des Gens für die Methyl-Coenzym M-Reductase (*mcrA*) entwickelt werden.

## I.2 Voraussetzungen

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

Die Forschung der Abteilung Bioverfahrenstechnik ist eingebunden in die abteilungsübergreifende Forschungsstruktur des ATB, insbesondere in die Forschungsprogramme *Erzeugung und Nutzung von Bioenergie* sowie *Biokonversion stärkehaltiger Agrarrohstoffe*. Des Weiteren sind Wissenschaftler der Abteilung Bioverfahrenstechnik beteiligt an den Forschungsthemen *Stoff- und Energieströme in der nachhaltigen Ressourcenbewirtschaftung* und *Qualitätssicherung bei Futtermitteln und leichtverderblichen Produkten*.

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

Mikroorganismen sowie die gentechnische Optimierung von Fermentationsstämmen. Von wachsender Bedeutung ist die begleitende mikrobielle Analytik zur Identifikation von Isolat- und Kontaminanten.

## **I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens**

### **I.3.1 Geplanter Versuchsablauf laut Vorhabensbeschreibung**

Das Projekt gliedert sich in drei Teile. Teil A befasst sich mit der Beschreibung des Ist-Zustandes in Praxis-Biogasanlagen auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen, Teil B beinhaltet die Entwicklung eines kulturunabhängigen quantitativen Nachweisverfahrens für methanbildende Mikroorganismen basierend auf der Anwendung der quantitativen *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (Q-PCR). Ergänzend zu A und B wurde nachträglich ein weiterer Versuchsteil zur quantitativen Erfassung der Mikroorganismen mittels FISH-Mikroskopie konzipiert. Im Einzelnen sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Für eine Beschreibung des Ist-Zustandes in Praxis-Anlagen sollten Proben aus zehn produzierenden Praxis-Biogasanlagen genommen werden. Es sollten möglichst unterschiedliche Biogasanlagen ausgewählt werden. Auswahlparameter sind Fermentertyp, Art der Substrate und Fahrweise.
- Aus dem Probenmaterial sollten 16S rDNA Klonbibliotheken angelegt werden. Hierzu sollte aus den Proben die gesamte mikrobielle DNA isoliert werden. Je nach Substratqualität sollte gegebenenfalls eine Optimierung durchgeführt werden. Die Anlage der 16S rDNA Bibliotheken erfolgte nach den publizierten Methoden von FERNANDEZ *et al.* (1999) bzw. WU *et al.* (2001 a,b) und sollte spezifisch für Archaea erfolgen. Die ARDRA-Analyse (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) erfolgte nach der Methode von FERNANDEZ *et al.* (1999). Je Biogasreaktorprobe sollte eine 16S rDNA Bibliothek angelegt werden, je Bibliothek sollten ca. 50-80 positive Klone mittels ARDRA analysiert werden.
- Für jede 16S rDNA Klonbibliothek sollte die Diversität anhand der ARDRA-Muster ermittelt werden. Je ARDRA-Muster sollte ein repräsentativer Klon ausgewählt und dessen Nukleotidsequenz ermittelt werden. Mittels Datenbankrecherche (NCBI GenBank) sollte die jeweilige Artzugehörigkeit bestimmt werden, ferner sollten phylogenetische Analysen durchgeführt werden. Die Abhängigkeit der methanogenen Archaea-Biozönose von dem verwendeten Substrat und dem Reaktortyp sollte analysiert werden.
- Von Biogasreaktor-Proben mit einer nachgewiesenen hohen Diversität in der methanogenen Mikroflora sollten *mcrA* Klonbibliotheken angelegt und auf gleiche Weise wie die 16S rDNA Klonbibliotheken analysiert werden. Die Anlage der *mcrA* Klonbibliotheken

sollte analog zu LUTON *et al.* (2002) erfolgen. Die Analyse erfolgte mittels Sequenzvergleich unter Verwendung von Nukleotidsequenzen der NCBI GenBank. Ziel war eine Analyse der Diversität der *mcrA* Sequenzen in Biogas-Anlagen zur Absicherung des skizzierten Nachweissystems.

- Für die Entwicklung eines kulturunabhängigen quantitativen Nachweisverfahrens für methanbildende Mikroorganismen basierend auf der *mcrA* Gensequenz sollten verschiedene Ansätze unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) getestet werden.
- Die von LUTON *et al.* (2002) publizierten PCR-Primer sollten zur Etablierung eines Nachweissystems beruhend auf der klassischen PCR mit konventioneller Agarose-Gelelektrophorese genutzt werden. Anhand eines internen Standards (z.B. 16S rDNA) (THELLIN *et al.* 1999) sollte ein semiquantitatives Assay etabliert werden.
- Es sollten Methoden zur Isolierung intakter und enzymatisch bearbeitbarer mRNA etabliert werden. Auf Basis der mRNA sollte eine RT-PCR zur Gewinnung der cDNA durchgeführt werden. Das semi-quantitative System sollte sowohl auf Basis der DNA wie auch der cDNA erprobt werden. Beide Ansätze sollten verglichen werden.
- Nach erfolgreicher Etablierung des Nachweises der *mcrA* Sequenz auf DNA und mRNA bzw. cDNA Ebene sollte ein Q-PCR Protokoll zur genauen Quantifizierung der *mcrA* Kopien entwickelt werden. Hierbei sollten methodisch das SYBR-Green Detektionssystem mit dem 5'-Nuclease-Assay verglichen werden. Ebenso sollte die Eignung von DNA und mRNA als potentielle Basis für die Q-PCR untersucht werden. Ziel war die Etablierung eines quantitativen Nachweissystems für methanogene Archaea.
- Im Falle der erfolgreichen Etablierung sollte das quantitative Nachweissystem zur Analyse von Praxis-Biogasanlagen sowie von Labor-Fermentern genutzt werden.

Folgende Meilensteine waren in der ursprünglichen Projektplanung vorgesehen:

*Ende 2005*

- Etablierung der quantitativen Q-PCR
- Optimierte Protokolle zur DNA-Reinigung
- Primerauswahl zur Klonierung der Archaea 16S rDNA und der *mcrA* Sequenz
- Auswahl geeigneter Klonierungsvektoren und -strategien
- Erste Beprobung von Praxisanlagen
- Beginn der Anlage von Klonbibliotheken

März 2007

- Abschluss der Arbeiten zur Anlage und Analyse der Klonbibliotheken
- Publikation der phylogenetischen Analysen

Januar 2008

- Methode zur quantitativen Erfassung der methanogenen Archaea

Juli 2008 (Projektende)

- Erste Anwendung des quantitativen Nachweises zur Analyse von Praxis-Biogas-anlagen
- Publikation der Methode

### **I.3.2 Änderungen gegenüber dem geplanten Versuchsablauf**

Gegenüber dem ursprünglich geplanten Versuchsablauf haben sich folgende Änderungen ergeben:

*Versuchsteil A*

A-1: Es ergaben sich keine Änderungen gegenüber dem geplanten Versuchsablauf.

A-2: Es wurden wie geplant zehn Biogasanlagen beprobt. Zusätzlich wurde Anlage 1 im Abstand von 12 Wochen erneut beprobt. Von der zweistufigen Anlage 8 wurden Proben aus Hydrolyse-Stufe und Anaerobfilter entnommen, so dass insgesamt 12 Proben bearbeitet wurden.

A-3: Es ergaben sich keine Änderungen gegenüber dem geplanten Versuchsablauf.

A-4: Zusätzlich zu den punktuell für Biogasreaktoren mit einer erhöhten Biodiversität anzulegenden *mcrA* Klonbibliotheken wurden für alle zehn Biogasreaktoren *mcrA* Klonbibliotheken angelegt. Die Anlage der *mcrA* Klonbibliotheken erfolgte analog zu LUEDERS *et al.* (2001). In Ergänzung wurden für Anlage 1 und 4 *mcrA* Klonbibliotheken unter Verwendung eines alternativen PCR-Primerpaares (LUTON *et al.* 2002) konstruiert.

*Versuchsteil B*

B-1: Aufgrund der unzureichenden Abschätzungsmöglichkeiten für Fluoreszenz-Intensitäten sowie aufgrund der erzielten Zwischenergebnisse wurde auf die Optimierung der semi-quantitativen PCR unter Verwendung von Primern für *housekee-*

*ping* Genen zugunsten der Etablierung von Q-PCR-Assays verzichtet. Ebenso wurde der Versuchsansatz zur Isolierung von mRNA aus Biogas-Fermentern bislang nicht umgesetzt. Stattdessen wurden wesentlich umfangreichere Arbeiten als ursprünglich geplant zur Entwicklung und Etablierung von Q-PCR Ansätzen durchgeführt.

- B-2: Wie in den Zwischenberichten bereits dargestellt, wurden 2005-2006 von Yu *et al.* verschiedene Arbeiten zur Anwendung eines 16S rDNA basierten Q-PCR Assays publiziert. Dieses Assay wurde im Rahmen dieses Projektes optimiert und zur Analyse der zehn Biogasanlagen sowie von verschiedenen Labor-Fermentern eingesetzt (vgl. Vorhabensbeschreibung: Alternative Strategien). Die Arbeiten zur Entwicklung eines alternativen Q-PCR Assays auf Basis des *mcrA* Gens wurden wie geplant durchgeführt.
- B-3: Vorrangig wurde die quantitative Q-PCR auf Basis der 16S rDNA zur Analyse von Praxis-Biogasanlagen und Labor-Fermentern eingesetzt. Das *mcrA*-basierte Assay wurde bislang nur an Standards getestet.

#### *Ergänzender Versuchsteil C*

- C-1: Nach Absprache mit dem Projektträger wurde ein ergänzender Versuchsteil zur fluoreszenz-mikroskopischen Detektion von Archaea-Gruppen mittels F<sub>420</sub>-Autofluoreszenz und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von Oligonukleotidsonden in das Projekt aufgenommen. Hierzu wurden Versuchsprotokolle zur Hybridisierung von Biogasreaktorproben mit ausgewählten FISH-Sonden für Bakterien und Archaea-Gruppen etabliert und optimiert. Von ausgewählten Praxis-Biogasreaktoren wurde parallel zur 16S rDNA und *mcrA* Analyse mittels Klonbibliotheken und Q-PCR eine ergänzende Analyse mittels FISH-Mikroskopie zur Quantifizierung methanogener Archaea umgesetzt.

## **I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an welchem angeknüpft wurde**

### **I.4.1 Bekannte Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, welche für das Vorhaben benutzt wurden**

Die Arbeiten beruhen auf der Analyse von zehn Praxis-Biogasanlagen. Details hierzu werden im Rahmen folgender FNR-Projekte untersucht und gesondert publiziert:

- FNR-Projekt Bundesmessprogramm zur Bewertung neuartiger Biomasse-Biogasanlagen (FKZ 22003405)
- FNR-Verbundprojekt Energiepflanzenanbau zur Biogasgewinnung (FKZ 22002305)
- FNR-Projekt Pilotanlage mit Wannenreaktoren zur Biogasgewinnung aus organischen Feststoffen (FKZ 22004803)

Zur Analyse dieser Anlagen wurden ausschließlich Verfahren genutzt bzw. weiterentwickelt, welche für die öffentlich-finanzierte Forschung freigegeben sind. Schutzrechte Dritter wurden durch die im Rahmen dieses Projektes umgesetzten Arbeiten nicht berührt. Eine detaillierte Darstellung aller im Verlauf dieses Projektes genutzten Verfahren kann den publizierten Fachartikeln entnommen werden.

### **I.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur**

Für einzelne Fachgebiete relevante Literatur wird im Folgenden aufgeführt. Weitere Literaturhinweise finden sich im Sachzusammenhang im Zuge der Ergebnisdarstellung sowie in den publizierten Fachartikeln.

#### *16S rDNA Bibliotheken & ARDRA*

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

*mcrA Bibliotheken*

- LUEDERS T., CHIN K.-J., CONRAD R., FRIEDRICH M. (2001): Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ. Microbiol.* 3: 194-204.
- LUTON P.E., WAYNE J.M., SHARP R.J., RILEY P.W. (2002): The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiol.* 148: 3521-3530.

*16S rDNA Q-PCR*

- YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. (2005): Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Technol.* 52: 85-91.
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005): Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bio-technol. Bioeng.* 89: 670-679.

*mcrA Q-PCR*

- DENMAN S.E., TOMKINS N.W., MCSWEENEY C.S. (2007): Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
- NUNOURA T., OIDA H., TOKI T., ASHI J., TAKAI K., HORIKOSHI K. (2006): Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 149-157.
- NUNOURA T., OIDA H., MIYAZAKI J., MIYASHITA A., IMACHI H., TAKAI K. (2008): Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64 (2): 240-247.

*Fluoreszenz in situ Hybridisierung*

- DELONG E.F., WICKHAM G.S., PACE N.R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- AMANN R.I., BINDER B.J., OLSON R.J., CHRISHOLM S.W., DEVEREUX R., STAHL D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *App. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- STAHL D.A., AMANN R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.



- RASKIN L., STROMLEY J.M., RITTMANN B.E., STAHL D. (1994). Group-specific 16S ribosomal-RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240.
- AMANN R., FUCHS B.M., BEHRENS S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 231-236.
- CROCKETTI G., MURTO M., BJORNSSON L. (2006). An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *J. Microbiol. Meth.* 65: 194-201.

### *Statistische Auswertung*

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

### **1.4.3 Benutzte Informations- und Dokumentationsdienste**

Im Folgenden wird eine Übersicht über die verwendeten Dienste gegeben.

#### *Literaturdatenbanken*

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

*Informations- und Dokumentationsdienste*

- GenBank und ergänzende Dienste des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Ribosomal database project (<http://rdp.cme.msu.edu/>)
- Sonden-Datenbank probeBase der Universität Wien (URL:<http://www.microbial-ecology.net/probebase>)

*Schutzrechtsanmeldungen*

Schutzrechtsanmeldungen sind nicht beabsichtigt. Aufgrund der Ansiedlung der Thematik im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung sollen die Arbeitsergebnisse in erster Linie über geeignete Publikationsformen der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden.

## I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Reihe von akademischen Kontakten aufgebaut bzw. intensiviert:

### *Universitäten*

- Technische Universität Berlin  
Institut für Technischen Umweltschutz  
Fachgebiet Umweltmikrobiologie

### *Fachhochschulen*

- Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fachgebiet Lifetec Engineering
- Technische Fachhochschule Berlin  
Fachbereich Life Sciences and Technology
- Hochschule Anhalt (FH), Köthen  
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

### *Außeruniversitäre Forschungseinrichtungen*

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising  
Institut für Landtechnik und Tierhaltung  
Abteilung Umwelttechnik in der Landnutzung
- Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie  
Anwenderzentrum für Mikrotechnik (AZM)

### *Forschungsverbände*

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

## II.1 Darstellung der Ergebnisse

### Teil A: Beschreibung des Ist-Zustandes in Praxis-Anlagen

#### *A-1 Beprobung von Praxisanlagen*

Die zu beprobenden zehn Biogasanlagen (BA1 - BA10) wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: (1) Stabiler und kontinuierlicher Betrieb sowie Konstanz der Substrate, (2) Variation der Substrate zwischen den Anlagen, (3) Verknüpfung mit anderen FNR-Projekten. In **Tabelle 1** wird eine Übersicht über die ausgewählten Anlagen gegeben.

Bei den Anlagen BA1 bis BA6, BA9 und BA10 handelte es sich um konventionelle Nassvergärungsanlagen mit unterschiedlichen Wirtschafts- und NawaRo-Substratkombinationen. Anhand dieser Anlagen wurde der Einfluss der Substratzusammensetzung auf die Diversität der methanogenen Archaea untersucht. Um die Auswirkung von Gülle als Kosubstrat auf die Zusammensetzung der Archaea-Population zu analysieren, wurde die güllfreie Anlage BA7 ausgewählt. Mit der zweistufigen Trockenvergärungsanlage BA8 wurde die Abhängigkeit der methanogenen Archaea-Biozönose von der Reaktorfahrweise und dem Reaktortyp analysiert.

Alle zehn Anlagen wurden beprobt und auf ihre Archaea-Diversität hin analysiert. Eine Anlage (BA 1) wurde nach 12 Wochen erneut beprobt (BA1a) zur Verifizierung der erhaltenen Daten auf Basis der ersten Probenahme. Bei der mehrstufigen Biogasanlage BA 8 wurden Proben sowohl aus der Hydrolysestufe (FR) als auch aus dem Anaerobfilter (AF) entnommen.

Aufgrund der Konstruktionsweise sowie des verhältnismäßig großen Reaktorinhaltes von Praxis-Biogasanlagen erfolgte die Probennahme in Form von vier Einzelproben zu je 10 l aus dem Ablauf des Reaktors. Aus diesen wurden wiederum je 500 ml für die weiteren Analysen entnommen. Nach der Vereinigung der Einzelproben wurde in drei parallelen Aufarbeitungsschritten die gesamte mikrobielle DNA isoliert. Zur Reduzierung des systematischen Fehlers wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ebenfalls in drei parallelen Ansätzen je DNA Präparation durchgeführt. Eine DNA Klonbibliothek wurde also jeweils aus insgesamt neun einzelnen PCR Ansätzen entwickelt. Die Erstellung der Klonbibliotheken, die Analyse mittels RFLP-Mustervergleich, die Sequenzierung repräsentativer Klone, die phylogenetische Einteilung der ermittelten Nukleotidsequenzen und die statische Bewertung der Klonbibliotheken erfolgte wie bei NETTMANN *et al.* (2008) beschrieben.

Die Ergebnisse der Diversitätsanalysen wurden mit den Prozessparametern der untersuchten Biogasanlagen in Beziehung gesetzt, welche im Rahmen von gesonderten Projekten (überwiegend in Projektträgerschaft durch die FNR) ermittelt wurden. Hierzu zählt u.a. der Gesamt-Ammoniumgehalt als Summe aus freiem  $\text{NH}_3$  und dissoziiertem  $\text{NH}_4^+$ .

**Table 1:** Übersicht über die beprobten Biogasanlagen.

Anlage	Standort	Inbetriebnahme	Verfahren	Fahrweise	Wirtschaftssubstrat	Pflanzliches Substrat	Tag der Probenahme	Verknüpfung zu Projekt
BA 1	Langengrassau (Brandenburg)	Dez 2004	Nassvergärung	mesophil	Schweinegülle	Silomais, Roggenkörner, Lieschkolbensilage	04.05.2006 und 24.07.2006	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 2	Kerkow - Angermünde (Brandenburg)	Dez 2005	Nassvergärung	mesophil	Rindermist Rinderjauche Wasser	Silomais, Roggenkörner	29.03.2007	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 3	Ailkalen (Mecklenburg-Vorpommern)	Okt 2004	Nassvergärung	mesophil	Schweinegülle	Silomais, Weizenkörner	20.07.2006	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 4	Jürgenstorf (Mecklenburg-Vorpommern)	Dez 2004	Nassvergärung	mesophil	Rindergülle	Silomais	20.07.2006	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 5	Bernitt (Mecklenburg-Vorpommern)	Okt 2005	Nassvergärung	mesophil	Schweinegülle Putendung	Silomais, Grassilage, Getreidebrei	28.08.2006	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 6	Klein Wanzeleben (Sachsen-Anhalt)	Dez 2002	Nassvergärung	mesophil	Schweinegülle Hühnertrockenkot	Silomais, Gerstenschrot, Maiskolgen	23.05.2007	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 7	Dolgsin (Brandenburg)	Mai .2003	Nassvergärung	mesophil	Wasser	Silomais, Gerstenkörner	23.04.2007	Verbundprojekt Energiepflanzenanbau zur Biogasgewinnung (FNR 22002305)
BA 8	Clausnitz (Sachsen)	Okt 2004	Trockenvergärung	mesophil	☐	Triticale	09.11.2006	Projekt Pilotanlage mit Wärmeraktoren zur Biogasgewinnung aus organischen Feststoffen (FNR 22004803)
BA 9	Schlieven (Mecklenburg-Vorpommern)	Dez 2005	Nassvergärung	mesophil	Schweinegülle Rindergülle Putenmist	Silomais, Roggen GPS (Ganzpflanzensilage)	25.07.2007	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)
BA 10	Erksleben (Sachsen-Anhalt)	Dez 2005	Nassvergärung	mesophil	Rindergülle Rindermist	Silomais, Grassilage, Getreidekörner	26.07.2007	Bundesmessprogramm (FNR 22003405)

Nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur ist nicht genau bekannt, welcher der beiden Stoffe,  $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{NH}_3$ , letztendlich inhibierend auf den mikrobiellen Stoffwechsel oder gar toxisch für Mikroorganismen wirkt. Zu der zellulären Wirkung werden derzeit verschiedene Mechanismen diskutiert. Das unpolare  $\text{NH}_3$  kann relativ schnell durch die Zellmembran diffundieren. Es kann somit direkt auf cytosolische Enzyme einwirken und Stoffwechselreaktionen inhibieren. Absorbiertes  $\text{NH}_3$  kann weiterhin abhängig von dem intrazellulären pH in der Zelle zu  $\text{NH}_4^+$  dissoziieren, welches bei Anreicherung in der Zelle wiederum den pH-Gradienten und mit diesem verbundene Protonen abhängige Prozesse (z.B. ATP-Synthese) negativ beeinflusst. Zudem hat intrazelluläres  $\text{NH}_4^+$  einen negativen Einfluss auf den Ionenhaushalt der Zelle z.B. auf die Konzentration anderer Kationen wie Kalium (KADAM & BOONE 1996, GALLERT *et al.* 1997).

Aufgrund der nicht eindeutigen Kausalzusammenhänge und der in der Literatur häufig fehlenden Unterscheidung zwischen Gesamt-Ammoniumgehalt einerseits und konkreter  $\text{NH}_4^+$ - und  $\text{NH}_3$ -Konzentration andererseits wird in dieser Studie generell der Gesamt-Ammoniumgehalt angegeben.

#### *A-2 Anlage der 16S rDNA Klonbibliotheken*

Biogasanlagen werden in der Praxis mit einer Reihe unterschiedlicher Substrate beladen. Übliche Substrate sind Gülle verschiedener Tierarten (Rind, Schwein, Geflügel) oder Silage aus verschiedenen Kulturpflanzen (Mais, Futterrübe, Triticale etc.). Vereinzelt werden auch Reststoffe aus verschiedenen Industrien (Schlempen etc.) oder Haushaltsabfälle als Substrat genutzt.

Zur Analyse des mikrobiellen Besatzes dieser Substrate während der Fermentation im Biogasreaktor ist ein robustes, einfaches und idealerweise auch schnelles Protokoll zur sukzessiven Reinigung der mikrobiellen DNA erforderlich. Dieses schließt folgende Aufarbeitungsschritte ein: (1) Trennung der Mikroorganismen von dem Substrat, (2) Reinigung der mikrobiellen Zellen, (3) Lyse der Zellen, (4) Trennung der Nukleinsäuren von den übrigen Zellbestandteilen, (5) Reinigung der Nukleinsäuren, (6) Trennung von DNA und RNA Bestandteilen abhängig von der späteren experimentellen Verwendung.

Insbesondere bei einer späteren enzymatischen Bearbeitung der Nukleinsäuren z.B. deren Vervielfältigung mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren erforderlich. Problematisch ist insbesondere die Anwesenheit von Inhibitoren wie z.B. Huminsäuren, welche in höheren Konzentrationen auch in Güllen und Silagen vorliegen.

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Reihe an Optimierungsversuchen zur Erstellung eines entsprechenden Laborprotokolls vorgenommen. Exemplarisch sollen im Folgenden drei Versuchsreihen hierzu vorgestellt werden:

- (1) Die Lyse der mikrobiellen Zellen kann durch eine Reihe unterschiedlicher Techniken erzielt werden. Häufig verwendet wird ein enzymatischer Aufschluss der Zellen mit Lysozymen und Proteasen. Alternativ lassen sich die Zellen auch durch physikalische oder mechanische Methoden auf-,„brechen“. Letzteres Prinzip nutzen verschiedene automatische Systeme wie z.B. das FastPrep-System (Vertrieb: MP Biomedicals). Dieses System wurde erstmals im Jahr 2006 auf seine Eignung für den Zellaufschluss von Reaktormaterial am ATB getestet. Hierzu wurde ein Protokoll, das für Bodenproben konzipiert wurde, verwendet. In der praktischen Anwendung mit einer Reihe von unterschiedlichen Biogasreaktor-Füllungen zeigte sich allerdings, dass nach einem mechanischen Aufschluss hohe Anteile an fragmentierter DNA in den Präparationen vorlagen. Bei dieser DNA kann es sich sowohl um fragmentierte mikrobielle DNA oder um DNA-Anteile aus dem Substrat handeln. In einem zweiten Ansatz 2008 (s.u.) mit veränderten Reaktionsbedingungen wurde eine Fragmentierung jedoch nicht beobachtet. Bei einer enzymatischen Zellyse liegt dagegen ausschließlich hochmolekulare DNA vor.
- (2) Wichtig für eine weitere Bearbeitung der isolierten DNA insbesondere mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind eine hohe Reinheit der DNA und die Abwesenheit von Inhibitoren. Daher wurde eine Reihe von verschiedenen Detergenzien auf eine Eignung zur Reinigung der DNA hin geprüft. Eine wesentliche Verbesserung des Reinheitsgrades konnte durch die Verwendung von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) erzielt werden. Dieses Detergenz wird u.a. häufig bei der Präparation von DNA aus Pflanzenzellen eingesetzt um diese von Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels zu reinigen. Durch die Verwendung von CTAB kann die Vermehrung der mikrobiellen 16S rDNA mittels PCR bei wesentlich höheren DNA-Konzentrationen (ca. Faktor 100) erfolgen, welches den experimentellen Fehler wesentlich mindert und einen besseren Rückschluss auf die Populationsstruktur im Biogasreaktor ermöglicht.
- (3) Eine weitere Methode zur DNA-Aufreinigung ist die Verwendung von LMP-Agarose (*low meltingpoint* Agarose). Bei dieser Methode wird die extrahierte und optisch verunreinigte DNA in LMP-Agarose eingeschlossen und in einem 1x TE-Puffer (pH 8,0) für mehrere Stunden gewaschen. Während des Waschschrilles werden DNA-Verunreinigungen, wie Huminsäuren und Polysaccharide, aus dem DNA-Komplex in den Puffer abgegeben. Die DNA verbleibt in der Agarose-Matrix und kann in dieser Form weiter verwendet werden. Durch den Einsatz der LMP-Agarose konnte eine höhere Reinheit der DNA erzielt werden, welche für die Vervielfältigung der 16S rDNA und *mcrA* durch die PCR erforderlich ist.

Unter Verwendung der in den o.g. Optimierungsexperimenten erhaltenen Ergebnisse wurde nun ein Standard-Protokoll zur Isolierung von mikrobieller DNA aus Biogasreaktoren erstellt. Dieses Protokoll umfasst die Aufreinigung des Probenmaterials mittels Zentrifugation und den enzymatischen Zellaufschluss unter Verwendung von Lysozym, Proteinase K und der Detergenz SDS. Die freigesetzte Gesamt-DNA wurde durch den Einsatz von CTAB gereinigt und durch eine Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung extrahiert. Bei DNA-Proben (BA2 und BA10), die weiterhin Verunreinigungen zeigten, wurde als zusätzlicher Aufreinigungsschritt die LMP-Agarose-Methode (s.o.) eingesetzt. Das Standard-Protokoll wurde bei der Probenaufarbeitung zur Extraktion von genomischer DNA aus Praxis-Biogasanlagen im Rahmen des Versuchsteils A kontinuierlich verwendet (NETTMANN *et al.* 2008).

Für die im zweiten Versuchsteil B anzuwendende Q-PCR ist besonders reine DNA erforderlich. Daher wurde hierfür eine weitere Optimierung der Methodik zur DNA-Isolierung und Reinigung vorgenommen (s. II.1.B-2).

**Tabelle 2:** Im Rahmen dieses Projektes erstellte 16S rDNA Klonbibliotheken.

Biogasanlage	Anzahl Klone 16S rDNA	Anzahl detektierter Archae Klone	Anzahl detektierter Bacteria Klone	Anzahl unbrauchbarer Sequenzen
BA1	104	103	1	-
BA1a	104	35	67	2
BA2	102	28	57	17
BA3	107	101	6	-
BA4	118	97	19	2
BA5	108	99	8	1
BA6	103	88	5	10
BA7	100	80	20	-
BA8-AF	106	95	6	5
BA8-FR	106	101	2	3
BA9	113	105	8	-
BA10	117	88	28	1
	1288	1020	227	41

Insgesamt wurden 25 16S rDNA und *mcrA* Bibliotheken erstellt. Aus diesen wurden 1288 16S rDNA Klone mittels genetischem *fingerprinting* (ADRDA, PCR-RFLP) analysiert (**Tabelle 2**). Davon wurden 1020 16S rDNA Sequenzen der Domäne Archaea zugeordnet, 227 Klone waren bakteriellen Ursprungs.



Der Umfang der 16S rDNA Klonbibliotheken wurde auf 100 bis 118 Klone vergrößert, um den zum Teil sehr hohen Anteil von unerwünschter Bacteria DNA auszugleichen. Ferner war so eine statistisch gesicherte Analyse der Archaea-Diversität durchführbar.

Mittels 16S rDNA Analyse konnten insgesamt 68 verschiedene taxonomische Gruppen (*operational taxonomic units*, OTUs) detektiert werden. Mit Ausnahme der Methanococcales wurden Vertreter aller bekannten methanbildenden Ordnungen der Euryarchaeota nachgewiesen. Ebenfalls wurde die Anwesenheit von Spezies der bisher taxonomisch nicht klassifizierten Gruppen CA-11 und ARC-I detektiert (**Tabelle 3**).

#### *A-3 Sequenzierung ausgewählter Klone mit individuellen ARDRA fingerprints*

Die im Rahmen dieses Projektes ermittelten 16S rDNA Nukleotidsequenzen wurden unter folgenden Akzessionsnummern bei der NCBI GenBank registriert und veröffentlicht: EU636895-EU636905, FJ222199-FJ222236.

Nach der Sequenzanalyse und dem Vergleich mit bekannten veröffentlichten Nukleotidsequenzen (NCBI GenBank) wurde zur phylogenetischen Zuordnung der ermittelten 16S rDNA Sequenzen ein Stammbaum (Mega 4.0) erstellt. Zur Überprüfung der Phylogenie wurde die paarweise Distanz (*p-distance*, Mega 4.0) berechnet. OTUs, die nicht mehr als 3% Unterschied zu demselben Sequenzabschnitt bekannter Typenstämmen aufwiesen, wurden der entsprechenden Gattung zugeordnet.

Dominierende Methanbildner in den untersuchten 16S rDNA Bibliotheken waren OTUs der Familie Methanomicrobiaceae und hierunter OTUs, die der hydrogenotrophen Gattung *Methanoculleus* zugeordnet werden konnten. OTUs der Gattung *Methanoculleus* fanden sich bei 32% bis 100% aller untersuchten 16S rDNA Klone (**Tabelle 3**).

*Methanoculleus* wächst unter strikt anaeroben und mesophilen bis thermophilen Bedingungen. Als Elektronendonator zur Reduktion von CO<sub>2</sub> fungiert H<sub>2</sub>, seltener auch Formiat und sekundäre Alkohole. Die Typenart *Methanoculleus bourgensis* wurde ursprünglich erstmals aus einem anaeroben Fermenter isoliert.

Neben der dominierenden Gattung *Methanoculleus* wurden auch OTUs der Gattungen *Methanocorpusculum*, *Methanospirillum* und *Methanogenium* der Ordnung Methanomicrobiales in verschiedenen Biogasanlagen detektiert. Diese Gattungen zählen ebenfalls zu den hydrogenotrophen Methanogenen.

Aus der Ordnung der hydrogenotrophen Methanobacteriales wurden nur die Gattungen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanothermobacter* nachgewiesen. Der Anteil der Methanobacteriales an der Gesamtzahl der Archaea Klone der 16S rDNA Klonbibliotheken betrug nur 1 bis 8% (**Tabelle 3**).

Ausschließlich Acetat-verwertende Methanbildner (acetoklastische Methanogene) sind nur für die Gattung *Methanosaeta* (Familie Methanosaetaceae, Ordnung Methanosarcinales) beschrieben. Diese Mikroorganismen können Zellketten mit einer Länge von bis zu 150 µm bilden. *Methanosaeta* zugeordnete OTUs fanden sich in über der Hälfte der Biogasanlagen (**Tabelle 3**). Ihr Anteil an der archaellen Gesamtpopulation, sofern nachgewiesen, schwankte in den einzelnen Biogasanlagen jedoch sehr stark von 1% bis 40%.

Die Gattung *Methanosarcina* ist unter bestimmten Bedingungen ebenfalls in der Lage Acetat zu verwerten. Mikroorganismen dieser Gattung nutzen zusätzlich Methyl-Verbindungen, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, CO oder Methanol für ihren Metabolismus und sind in der Lage Zellaggregate mit einem Durchmesser von bis zu 1000 µm bilden. OTUs dieser Gattung wurden in den Biogasanlagen 2, 6, 8 und 9 mit 1% bis 24% aller Archaea Klone nachgewiesen.

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken

Prozentuale Angaben geben die Häufigkeit des Nachweises der entsprechenden taxonomischen Gruppen (*operational taxonomic units*, OTU) mittels ARDRA bzw. PCR-RFLP innerhalb der jeweiligen DNA Klonbibliothek bezogen auf alle Klone archaischen Ursprungs wieder.

	1. Probenahme												
	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8-AF	BA8-FR	BA9	BA10		
<b>Gesamt-OTUs (Archaea)</b>	<b>5 OTUs</b>	<b>7 OTUs</b>	<b>16 OTUs</b>	<b>12 OTUs</b>	<b>11 OTUs</b>	<b>10 OTUs</b>	<b>9 OTUs</b>	<b>21 OTUs</b>	<b>22 OTUs</b>	<b>11 OTUs</b>	<b>13 OTUs</b>		
<b>Methanomicrobiaceae</b>	<b>3 (94%)</b>	<b>2 (32%)</b>	<b>8 (64%)</b>	<b>7 (79%)</b>	<b>10 (99%)</b>	<b>8 (98%)</b>	<b>7 (96%)</b>	<b>11 (72%)</b>	<b>8 (52%)</b>	<b>7 (93%)</b>	<b>5 (32%)</b>		
<i>Methanoculleus</i> sp.	3 (94%)	2 (32%)	6 (62%)	7 (79%)	10 (99%)	8 (98%)	7 (96%)	11 (72%)	8 (52%)	7 (93%)	5 (32%)		
<i>Methanogenium</i> sp.	n.d.	n.d.	2 (2%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Methanofollis</i> sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (2%)	n.d.	n.d.		
nicht klassifizierbar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (2%)	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>Methanocorpusculaceae</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>		
<i>Methanocorpusculum</i> sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>Methanospirillaceae</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (43%)</b>	<b>1 (6%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (5%)</b>	<b>1 (9%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>2 (17%)</b>		
<i>Methanospirillum</i> sp.	n.d.	1 (43%)	1 (6%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (5%)	1 (9%)	n.d.	2 (17%)		
<b>Methanosarcinaceae</b>	<b>2 (6%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>2 (9%)</b>	<b>4 (25%)</b>	<b>1 (4%)</b>	<b>n.d.</b>		
<i>Methanosarcina</i> sp.	2 (6%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (1%)	n.d.	2 (9%)	3 (24%)	1 (4%)	n.d.		
<i>Methanomicrococcus</i> sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (1%)	n.d.	n.d.		
<b>Methanosaetaceae</b>	<b>n.d.</b>	<b>3 (21%)</b>	<b>1 (13%)</b>	<b>2 (14%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>2 (2%)</b>	<b>2 (5%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>2 (40%)</b>		
<i>Methanosaeta</i> sp.	n.d.	3 (21%)	1 (13%)	2 (14%)	n.d.	1 (1%)	n.d.	2 (2%)	2 (5%)	n.d.	2 (40%)		
<b>Methanobacteriaceae</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (4%)</b>	<b>4 (6%)</b>	<b>2 (5%)</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>3 (8%)</b>	<b>3 (4%)</b>	<b>1 (1%)</b>	<b>3 (5%)</b>		
<i>Methanobacterium</i> sp.	n.d.	1 (4%)	2 (2%)	1 (1%)	n.d.	n.d.	1 (1%)	1 (1%)	2 (2%)	n.d.	1 (3%)		
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	n.d.	n.d.	2 (4%)	1 (4%)	1 (1%)	n.d.	n.d.	2 (7%)	1 (2%)	1 (1%)	2 (2%)		
<i>Methanothermobacter</i> sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
nicht klassifizierbar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>sonstige Archaea-Gruppen</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>2 (11%)</b>	<b>1 (2%)</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>1 (3%)</b>	<b>2 (4%)</b>	<b>4 (5%)</b>	<b>2 (2%)</b>	<b>1 (6%)</b>		
CA-11-Cluster	n.d.	n.d.	1 (1%)	n.d.	n.d.	n.d.	1 (3%)	1 (2%)	2 (3%)	2 (2%)	n.d.		
Arch-1-Cluster	n.d.	n.d.	1 (10%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (2%)	1 (1%)	n.d.	1 (6%)		
unbekannte Archaea-Gruppe	n.d.	n.d.	n.d.	1 (2%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (1%)	n.d.	n.d.		

Anhand der Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken konnte festgestellt werden, dass in allen Biogasanlagen hydrogenotrophe Methanogene die dominante Archaea-Gruppe darstellten. Nur in den Anlagen BA8-FR (30%) und BA10 (40%) konnte ein höherer DNA-Anteil der acetoklastischen Gattungen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* nachgewiesen werden (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4:** Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Klone für hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
hydrogenotroph	94-100%	79%	76%	84%	100%	98%	97%	85%	65%	94%	54%
acetoclastisch*	0-6%	21%	13%	14%	-	2%	-	11%	30%	4%	40%
CA-11-Cluster, Arch-I-Cluster und unbekannte Euryarchaeota	n.d.	n.d.	11%	2%	-	-	3%	4%	5%	2%	6%

\* *Methanosarcina* wurde als acetoklastische Gattung gewertet

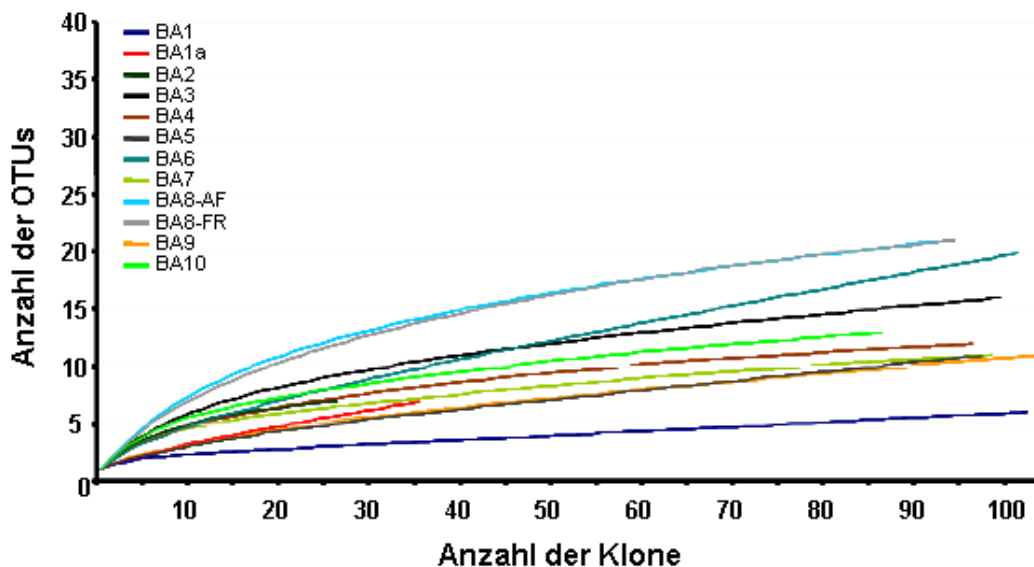
Die Ergebnisse der Diversitätsanalyse mittels 16S rDNA Klonbibliotheken wurden statisch ausgewertet. Hierzu wurden folgende Parameter berechnet:

- (1) Mit der Rarefaction Analyse, dem Chao I Index und der Coverage (C) wurde der Probenumfang jeder einzelnen Klonbibliothek statistisch bewertet.
- (2) Die Diversität jeder Klonbibliothek wurde anhand des Shannon-Diversitätsindex (H) und der Evenness (E, Gleichverteilung) analysiert.
- (3) Mit den Ähnlichkeits-Indices (*similarity indices*) nach Bray-Curtis und Chao-Jaccard wurden die Diversitätsergebnisse aller Biogasanlagen untereinander auf Ähnlichkeiten untersucht.

- (1) *Abschätzung des Probenumfangs:* Zur Beurteilung der Vollständigkeit der Erfassung der methanogenen Diversität der einzelnen Biogasreaktoren wurde die Rarefaction-Methode (HUGHES *et al.* 2001, HOLLAND 2003) angewandt, welche eine Interpolationsmethode innerhalb der Grenzen des tatsächlichen Probenumfangs darstellt (**Bild 1**). Zeigt die Rarefaction-Kurve ein asymptotisches Verhalten, deutet dies darauf hin, dass die tatsächliche Artenzahl nahezu erreicht ist. Dies war jedoch nicht bei allen 16S rDNA Klonbibliotheken der Fall: die Rarefaction-Kurven der Anlagen BA1a, BA2, BA3, BA6, BA8-AF und BA8-FR konvergierten noch nicht im Bereich des vorliegenden Probenvolumens (**Bild 1**).

Daher wurde mittels einer Extrapolationsmethode (Schätzungsmethode) die tatsächliche Artenzahl (OTU-Anzahl) geschätzt. Zu den Extrapolationsmethoden zählt der

nicht-metrische Chao I Index (CHAO 1987), der auf die Abundanz (Klonanzahl pro OTU) basiert. Hierbei wird die Anzahl der OTUs, die nur mit einem oder zwei Klonen in der Probe vertreten sind zur Abschätzung der tatsächlichen Diversität herangezogen. Die 95% Konfidenzintervalle stellen dabei die Signifikanz der Messpunkte dar. Ein breites Konfidenzintervall weist auf einen zu geringen Stichprobenumfang hin. Da die unteren 95% Konfidenzintervalle meist nicht sehr stark von der tatsächlich detektierten OTU-Anzahl abweichen, war der Probenumfang statistisch ausreichend. Dies wurde durch die *Coverage*-Werte (GOOD 1953), die zwischen 75% (BA2) und 97% (BA4) lagen, bestätigt (**Tabell 5**).



**Bild 1:** Rarefaction-Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken.

Die Anzahl der Klone wurde gegen die Anzahl der ermittelten OTUs aufgetragen und interpoliert.

(2) *Abschätzung der Diversität:* Die ermittelten Shannon-Diversitätsindices (SHANNON & WEAVER 1963) der 12 16S rDNA Bibliotheken sind stark schwankend (**Tabelle 5**). Die Diversität innerhalb der methanogenen Archaea ist bei BA1 am niedrigsten. Hier wurde ausschließlich die Gattung *Methanoculleus* nachgewiesen. Dagegen wurde in dem Anaerobfilter der Biogasanlage 8 die höchste Diversität ermittelt. In dieser 16S rDNA Bibliothek konnten insgesamt 9 unterschiedliche Gattungen dokumentiert werden. Der Wert der *Evenness* (E) beschreibt die Gleichverteilung der OTUs innerhalb einer Klonbibliothek. Ist  $E = 1$ , so treten alle OTUs mit derselben Anzahl auf. Je kleiner E ist desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass in der Klonbibliothek dominante OTUs auftreten.

Bei den 16S rDNA Bibliotheken BA5, BA9, BA6, BA1a und BA1 wurden die niedrigsten Evenness-Werte (**Tabelle 5**) ermittelt. In diesen Biogasanlagen wurden dominante OTUs detektiert, die der hydrogenotrophen Gattung *Methanoculleus* zugewiesen werden konnten. BA2 besaß mit 0,71 den höchsten E-Wert (**Tabelle 5**). In dieser Anlage wurden Archaea nachgewiesen, welche sich überwiegend auf 3 Gattungen verteilten.

Die prozentuale Verteilung dieser Klone betrug 32% für *Methanoculleus*, 43% für *Methanospirillum* und 21% für *Methanosaeta* (**Tabelle 3**).

**Tabelle 5:** Statistische Auswertung der 16S rDNA Klonbibliotheken.

Werte in Klammern repräsentieren die Werte bei Annahme eines 95% Konfidenzintervalls.

	BA1	BA1a	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
<b>Archaea OTUs</b>	5	5	7	16	11	11	10	9	21	22	11	13
<b>Shannon Index</b>	0,65	0,94	1,60	2,10	1,68	0,96	1,26	1,43	2,61	2,56	1,04	1,99
<b>Evenness</b>	0,38	0,37	0,71	0,51	0,40	0,24	0,35	0,47	0,64	0,59	0,29	0,56
<b>Chao-I</b>	8 (5/29)	17 (9/59)	7 (7/15)	27 (18/70)	14 (12/28)	39 (18/116)	25 (13/78)	10 (9/18)	28 (23/55)	25 (23/39)	32 (16/97)	16 (13/35)
<b>Coverage [%]</b>	95	81	75	93	97	92	93	96	92	93	90	94

(3) *Vergleich der Klonbibliotheken mittels Ähnlichkeits-Indices:* Für einen paarweisen Vergleich der Diversität der Biogasanlagen wurden zwei Ähnlichkeits-Indices berechnet, der Chao-Jaccard (CJ-Index) sowie der Bray-Curtis Index (BC-Index). Beide Indices berücksichtigen neben dem Vorhandensein eines OTU auch seine Häufigkeit in einer Biogasanlage und stellen somit einen quantitativen Ähnlichkeits-Index dar (BRAY & CURTIS 1957). Die Werte können zwischen 0 und 1 schwanken, wobei 1 eine vollständige Übereinstimmung der Diversität zweier Biogasanlagen ausdrückt. Der CJ-Index unterscheidet sich vom BC-Index dadurch, dass er auch OTUs berücksichtigt, die möglicherweise in zwei Proben vorhanden sind, aber während der Probennahme nicht erfasst wurden (*unseen shared species*). Bei einem Vergleich von Proben mit unterschiedlichem Probenumfang oder Proben mit vielen Einzel-OTUs, wie in dieser Analyse, ist der Chao-Jaccard-Index daher aussagekräftiger (CHAO *et al.* 2005).

Die Werte der entsprechenden Parameter für die untersuchten Biogasanlagen werden in **Tabelle 6** dargestellt. Mit Ausnahme der paarweisen Vergleiche von BA2 und BA10 bzw. BA3 und BA4 lagen bei der überwiegenden Mehrheit der Anlagen die Ähnlichkeitswerte unter 0,5 (CJ-Index). Es konnten mit Ausnahme von BA2 und BA10 keine weiteren Anlagen ermittelt werden, die eine höhere Übereinstimmung in der methanogenen Diversität als 91% (CJ-Index × 100) besaßen.

**Tabelle 6:** Ähnlichkeits-Indices der 16S rDNA Klonbibliotheken.

	BA1	BA1a	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8-AF	BA8-FR	BA9	BA10	Chao-Jaccard similarity index	
<b>BA1</b>	–	0,890	0,151	0,214	0,347	0,108	0,646	0,023	0,083	0,118	0,195	0,261		
<b>BA1a</b>	0,464	–	0,152	0,229	0,323	0,084	0,656	0,128	0,083	0,119	0,110	0,259		
<b>BA2</b>	0,085	0,164	–	0,309	0,294	0,227	0,233	0,000	0,226	0,286	0,051	0,914		
<b>BA3</b>	0,204	0,328	0,198	–	0,734	0,710	0,566	0,102	0,383	0,258	0,581	0,569		
<b>BA4</b>	0,332	0,489	0,179	0,751	–	0,703	0,414	0,016	0,204	0,157	0,504	0,494		
<b>BA5</b>	0,089	0,119	0,131	0,510	0,482	–	0,262	0,087	0,174	0,171	0,171	0,276		
<b>BA6</b>	0,607	0,537	0,111	0,254	0,359	0,107	–	0,102	0,636	0,625	0,095	0,458		
<b>BA7</b>	0,022	0,052	0,000	0,104	0,023	0,101	0,060	–	0,146	0,119	0,197	0,021		
<b>BA8-AF</b>	0,080	0,107	0,209	0,243	0,198	0,174	0,130	0,091	–	0,679	0,279	0,726		
<b>BA8-FR</b>	0,119	0,180	0,309	0,209	0,165	0,122	0,161	0,056	0,474	–	0,109	0,360		
<b>BA9</b>	0,202	0,057	0,042	0,182	0,189	0,157	0,083	0,032	0,219	0,089	–	0,051		
<b>BA10</b>	0,241	0,374	0,492	0,398	0,413	0,107	0,273	0,024	0,196	0,333	0,041	–		
<b>Bray-Curtis similarity index</b>														

Die Biogasanlage 1 wurde nach 12 Wochen erneut beprobt. Beide 16S rDNA Klonbibliotheken wiesen einen hohen Ähnlichkeitswert (CJ-Index = 0,890) auf (**Tabelle 6**). In der zweiten Beprobung konnte neben der Gattung *Methanoculleus* auch ein geringer Prozentsatz der Gattung *Methanosarcina* detektiert werden (**Tabelle 3**), wodurch die geringe Abweichung im CJ-Index vom theoretisch zu erwartenden Wert 1,0 (= vollständige Übereinstimmung) zu erklären ist. Außer in einem geringen Temperaturunterschied des Reaktors von 4,3°C, der Raumbelastung und der Substratverweilzeit zwischen den beiden Probenahmen, konnten keine Unterschiede in den Prozessparametern und den Ergebnissen der chemischen Analyse festgestellt werden.

Von allen untersuchten Anlagen wiesen die Biogasanlagen 2 und 7 die niedrigste Ähnlichkeit in der Archaea-Diversität auf. Wie aus den paarweisen *similarity indices* von 0,000 ersichtlich, waren praktisch keinerlei Gemeinsamkeiten nachweisbar (**Tabelle 6**). Die Ursache hierfür ist unklar. Biogasanlage 2 wurde mit Rindergülle, Rinderjauche, Wasser, Maissilage und Roggenkörnern bestückt. Dagegen wurden in BA7 nur Silomais, Getreidekörner und Wasser als Substrate verwendet. Nichtsdestotrotz zeigten beide Anlagen sehr ähnliche CH<sub>4</sub>-Produktivitätswerte. Hierzu ist außerdem zu bemerken, dass BA7 generell nur geringe Diversitätsähnlichkeiten mit den restlichen Biogasanlagen aufwies (**Tabelle 6**). Zudem wurde die Biogasanlage 7 mit der höchsten durchschnittlichen Reaktortemperatur (44,7°C) von allen Biogasanlagen betrieben.

Die höchste Ähnlichkeit (0,914 CJ-Index) in der archaellen Diversität dagegen zeigten die Anlagen BA2 und BA10. BA2 und BA10 verwerteten ähnliche Substrate. BA10 nutzte Rindergülle, Rindermist, Maissilage, Grassilage und Getreidekörner. Neben der hohen

Ähnlichkeit bei den Substraten und in der Diversität bestanden auch Gemeinsamkeiten in der Reaktortemperatur und in der Raumbelastung der Reaktoren. Ferner wurden in den Reaktorproben fast identische Gesamt-Ammoniumgehalte gemessen (siehe Einzeldarstellung im Anhang). Diese Übereinstimmungen lassen vermuten, dass ähnliche Substratkompositionen eine analoge Zusammensetzung der Archaea-Population bewirken. Bei Betrachtung der Analyseergebnisse der restlichen Biogasanlagen scheint dies aber nicht generell der Fall zu sein. Abgesehen von den oben aufgeführten Gemeinsamkeiten der beiden Biogasanlagen, zeigten diese in der Methan-Produktivität Divergenzen, die auf die unterschiedliche Substratverweildauer der beiden Biogasanlagen zurückzuführen ist. BA2 besaß eine höhere  $\text{CH}_4$ -Produktivität ( $1,24 \text{ Nm}_{\text{CH}_4}^3 \text{ m}_{\text{AV}}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) bei längerer Verweilzeit (41 Tage) als BA10 ( $0,95 \text{ Nm}_{\text{CH}_4}^3 \text{ m}_{\text{AV}}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) mit kurzer Verweilzeit (26 Tage).

Die Biogasanlagen 1 und 3 wiesen ebenfalls Parallelen in ihrer Substratzusammensetzung auf (**Tabelle 1**). Bei diesen Anlagen konnte jedoch nur eine geringe Diversitätsähnlichkeit (0,214 CJ-Index) ermittelt werden. Bei Betrachtung der Prozessparameter fielen ebenfalls Unterschiede auf: So wurde in der BA3 ein Vielfaches an Maissilage und eine weitaus geringere Menge an Getreidekörnern eingesetzt als in der BA1. Auch unterschieden sich die beiden Anlagen in der Substratverweildauer (BA1 = 61 Tage; BA3 = 28 Tage) und in der durchschnittlichen Raumbelastung der Reaktoren (BA1 =  $3,9 \text{ kg}_{\text{OTS}} (\text{m}^3_{\text{AV}} \text{ d})^{-1}$ ; BA3 =  $5,8 \text{ kg}_{\text{OTS}} (\text{m}^3_{\text{AV}} \text{ d})^{-1}$ ). Die höhere Methan-Produktivität ( $1,50 \text{ Nm}^3_{\text{CH}_4} \text{ t}_{\text{OTS}}^{-1}$ ) der BA3 bei kürzerer Verweildauer der Substrate war durch die höhere Raumbelastung des Reaktors bedingt. Ferner variierte der Gesamt-Ammoniumgehalt (Summe aus  $\text{NH}_4^+$ - und  $\text{NH}_3$ -Stickstoff) mit  $4,2 \text{ kg t}^{-1}$  (BA1) bzw.  $2,4 \text{ kg t}^{-1}$  (BA3) gravierend (siehe Einzeldarstellung im Anhang). In BA3 mit dem geringeren Gesamt-Ammoniumgehalt konnte die acetoklastische Gattung *Methanosaeta* nachgewiesen werden (13% aller Archaea Klone). Dagegen wurden in der Biogasanlage 1 an acetoklastischen Methanogenen nur Vertreter der Gattung *Methanosarcina* detektiert und dieses mit geringeren Anteilen (6-9% aller Archaea Klone, **Tabelle 3**). Aus der Literatur ist bekannt, dass das Wachstum von Mikroorganismen der Gattung *Methanosaeta* bei hohen Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen gehemmt wird. Dagegen können *Methanosarcina* und hydrogenotrophe Methanogene auch bei einem höheren Gesamt-Ammoniumgehalt gedeihen (WHITMAN *et al.* 2001, CASTRO *et al.* 2004, KARAKASHEV *et al.* 2005, CONRAD & KLOSE 2006).

In dem Anaerobfilter (AF) und dem Feststoffreaktor (FR) der Biogasanlage 8 konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Populationszusammensetzung der Archaea und den Gesamt-Ammoniumgehalten des Reaktormaterials nachgewiesen werden. Der AF-Reaktor wies einen Gesamt-Ammoniumgehalt von  $1,1 \text{ kg t}^{-1}$  auf, während im FR-Reaktor nur  $0,4 \text{ kg t}^{-1} \text{ NH}_4^+$  nachgewiesen wurde. In beiden Reaktoren konnte nur eine geringe Anzahl an *Methanosaeta* verwandten OTUs detektiert werden. Während im FR-Reaktor ein hoher Anteil an *Methanosarcina* OTUs (25% aller Archaea Klone) aufwies, fanden sich



im AF-Reaktor mit dem wesentlich höheren Gesamt-Ammoniumgehalt nur 9% *Methanosarcina*.

Als weiteres Beispiel, dass die Substratzusammensetzung unmittelbar keinen Einfluss auf die methanogene Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen ausübt, wird im Vergleich von BA3 und BA4 deutlich. So zeigten diese beiden Anlagen eine verhältnismäßig hohe Ähnlichkeit in der Archaea-Diversität (CJ-Index = 0,734), obwohl sie mit unterschiedlichen Substratkombinationen betrieben wurden (**Tabelle 1**). Bei BA3 handelt es sich um eine Biogasanlage, die Schweinegülle, Maissilage und Weizenkörner als Substrate nutzte. Für den Betrieb der BA4 wurden indessen Rindergülle und Maissilage eingesetzt (siehe Einzeldarstellung im Anhang). Beide Anlagen unterschieden sich ferner in der Verweilzeit der Substrate und Raumbelastung. Die CH<sub>4</sub>-Produktivität der beiden Anlagen zeigte ebenfalls starke Divergenzen (BA3 = 1,50 Nm<sup>3</sup><sub>CH<sub>4</sub></sub> t<sub>ots</sub><sup>-1</sup>; BA4 = 0,40 Nm<sup>3</sup><sub>CH<sub>4</sub></sub> t<sub>ots</sub><sup>-1</sup>). Jedoch zeigten beide Anlagen Übereinstimmungen in der chemischen Zusammensetzung der Reaktorinhalte (z.B. Gesamt-Ammoniumgehalt, Daten nicht abgebildet).

#### *A-4 Anlage von mcrA Klon-Banken*

Aufgrund des hohen Anteils an Bacteria-DNA, die mit dem 16S rDNA Primerset amplifiziert wird, sollte ergänzend ein alternativer, Archaea-spezifischer Genabschnitt für die Analyse der Archaea-Diversität verwendet werden. Das Gen der Untereinheit A der Methyl-Coenzym M-Reduktase (*mcrA*) ist hierfür besonders geeignet, da dieses Enzym spezifisch für methanbildende Archaea ist. Die von LUTON *et al.* (2002) bzw. von LUEDERS *et al.* (2001) entwickelten Primer wurden bereits mehrfach erfolgreich zur Bestimmung der Archaea in Umweltproben eingesetzt. In **Tabelle 7** werden die Vor- und Nachteile der beiden *mcrA*-Primer und des in Versuchsteil A-3 verwendeten 16S rDNA-Primersets dargestellt.

Tabelle 7: Vor- (+) und Nachteile (-) der verwendeten Primersets.

16S rDNA Primer Set	mcrA1 Primer Set	mcrA3 Primer Set
modifiziert nach GIOVANNONI <i>et al.</i> [1990] und FEMANDEZ <i>et al.</i> [1999]	LUTON <i>et al.</i> [2002]	LUEEDERS <i>et al.</i> [2001]
5'-YGAYTAAGCCATGCRAGT-3' (Arche 2f)	5'-GGTGTGTMGGATTACACARTAYGCWACAGC-3' (ML 1)	5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3' (ME 1)
5'-TGCTCCCCCGCCAAATCCCT-3' (Uni 5r)	5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGT-3' (ML 2)	5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3' (ME 2)
PCR-Amplifikat ca. 860bp (+)	PCR-Amplifikat ca. 490bp (□)	PCR-Amplifikat ca. 760bp (+)
PCR-Protokoll und späterer RFLP-Verdau nicht aufwendig (+)	PCR-Protokoll und späterer RFLP-Verdau sehr aufwendig (□)	PCR-Protokoll und späterer RFLP-Verdau nicht aufwendig (+)
Amplifiziert Organismen der Euryarchaeota-Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarinales, Methanobacteriales und Methanococcales (+)	Amplifiziert Organismen der Euryarchaeota-Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarinales, Methanobacteriales und Methanococcales (+)	Amplifiziert Organismen der Euryarchaeota-Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarinales, Methanobacteriales und Methanococcales(+)
Diskriminiert einzelne Gattungen der Ordnungen Methanosarcinales und Methanomicrobiales (□)	Zu langer Vorwärtsprimer kann zu „mismatches“ führen (□)	Diskriminiert die Gattung <i>Methanosaeeta</i> der Ordnung Methanosarcinales (□)
Amplifiziert auch Bacteria (□)	Amplifiziert auch Isoenzym (mrt) der MCR (verfälscht Ergebnisse) (□)	

Zur Erstellung der *mcrA* Klonbibliotheken aus den Reaktorproben wurde das *mcrA3*-Primerset (ME1/ME2) nach LUEDERS *et al.* (2001) ausgewählt. Mittels dieser Primer wird ein ca. 760 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, wogegen vom *mcrA1*-Primerset (LUTON *et al.* 2002) nur ein ca. 490 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wird. Je länger das PCR-Produkt ist, desto höher ist jedoch der phylogenetische Informationsgehalt. Durch die zusätzliche Amplifizierung des Isoenzym (*mrt*) der Methyl-Coenzym M-Reduktase, welches u.a. von Organismen der Ordnung Methanobacteriales synthetisiert wird, kann es zu einer massiven Verfälschung der Analyseergebnisse kommen. Die Diskriminierung der Gattung *Methanosaeta* durch das *mcrA3*-Primerset kann dagegen durch die parallele Analyse der 16S rDNA kompensiert werden.

Insgesamt wurden elf *mcrA3*- und zwei *mcrA1* Klonbibliotheken erstellt. Der Umfang der Klonbibliotheken wurde abweichend von der ursprünglichen Versuchsplanung auf 102 bis 112 Klone vergrößert um eine bessere statistische Absicherung der Analyse der Archaea-Diversität zu erreichen. Von diesen wurden 1304 *mcrA* Klone mittels genetischem *fingerprinting* (PCR-RFLP) analysiert (**Tabelle 9**). 1158 *mcrA3* Sequenzen erwiesen sich archaellen Ursprungs (**Tabelle 9**).

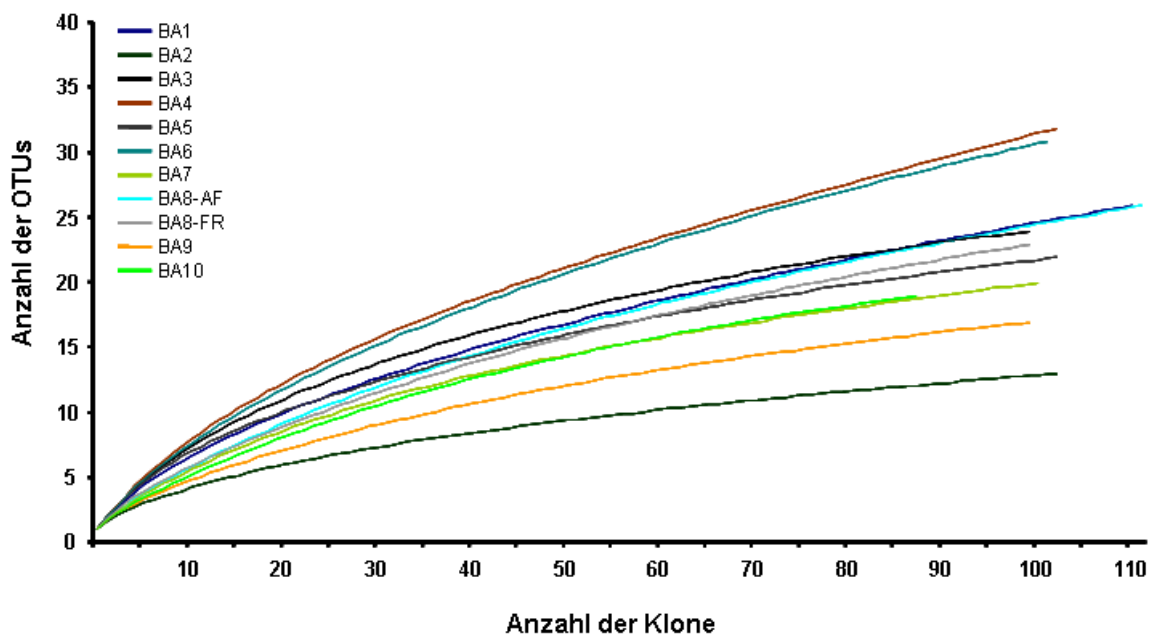


**Tabelle 9:** Im Rahmen dieses Projektes entwickelte *mcrA* Klonbibliotheken.

Biogasanlage	Anzahl Klone <i>mcrA3</i>	Anzahl unbrauchbarer Sequenzen	Anzahl Klone <i>mcrA1</i>	Anzahl unbrauchbarer Sequenzen
BA1	112	3	122	2
BA1a	-	-	-	-
BA2	109	5	-	-
BA3	103	2	-	-
BA4	104	1	108	-
BA5	105	2	-	-
BA6	103	3	-	-
BA7	102	5	-	-
BA8-AF	103	-	-	-
BA8-FR	103	2	-	-
BA9	111	10	-	-
BA10	103	3	-	-
	1158	36	230	2

Die im Rahmen dieses Projektes ermittelten *mcrA3* und *mcrA1* Nukleotidsequenzen wurden bei der NCBI GenBank registriert und unter folgenden Akzessionsnummern veröffentlicht: EU636837-EU636863 -EU636894, FJ226609-FJ226751.

Die Analyse der *mcrA3*-Sequenz bestätigte im Allgemeinen die Befunde der 16S rDNA Analyse. Grundsätzlich wurde jedoch mittels der *mcrA3*-Analyse (**Tabelle 8**) eine höhere OTU-Diversität detektiert als mit der Analyse der 16S rDNA (**Tabelle 3**). Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass das *mcrA*-Gen eine höhere Variation innerhalb einer Organismengruppe aufweist, wodurch das *mcrA3* Primerset mehr Varianten der einzelnen Spezies detektiert.



**Bild 2:** Rarefaction-Analyse der *mcrA3* Klonbibliotheken.

Die Anzahl der Klone wurde gegen die Anzahl der ermittelten OTU aufgetragen und interpoliert.

Im Gegensatz zur 16S rDNA Analyse wurden mit der *mcrA3*-Analyse durchschnittlich mehr Archaea-OTUs detektiert. Dieses wurde insbesondere für die Ordnung Methanomicrobiales gefunden, was sich u.a. auf die Bewertung der Stichprobengröße zur Analyse der Klonbibliotheken auswirkte. Sowohl die Rarefaction-Analyse (**Bild 2**) als auch die Auswertung des Chao I Indexes (**Tabelle 10**) zeigten, dass der Umfang der Klonbibliotheken zu gering war um eindeutig statistisch abgesichert zu sein. Die am häufigsten auftretenden Arten sollten jedoch durch den gewählten Ansatz detektiert worden sein.

Die große Variation der detektierten OTUs wurde ebenfalls durch die Werte für den Shannon-Index (**Tabelle 10**) widerspiegelt. Wie schon in der Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken wurden auch hier Vertreter der Ordnung Methanomicrobiales in allen Biogasanlagen als dominante Gruppe detektiert (mit Ausnahme der BA7). Dieses wird auch durch die niedrigen *Evenness*-Werte untermauert (**Tabelle 10**).

Im Gegensatz zur 16S rDNA Analyse beschränkten sich die in den Biogasanlagen vorherrschenden Archaea-Gruppen nicht nur auf die Gattung *Methanoculleus*. Ebenfalls häufig wurden Vertreter der Gattungen *Methanospirillum* (in BA2 und BA10) und *Methanocorpusculum* (in BA9) gefunden. Als einzige Ausnahme wurde bei der Biogasanlage 7 *Methanothermobacter* aus der Ordnung der Methanobacteriales als dominante Gattung ermittelt (**Tabelle 8**).

**Tabelle 10:** Diversitätsanalyse und statistische Auswertung für die *mcrA3* Klonbibliotheken.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
<b>Archaea OTUs</b>	26	13	24	31	22	29	17	26	23	17	20
<b>Shannon Index</b>	2,42	1,43	2,62	2,84	2,49	2,70	1,84	2,12	2,14	1,69	1,97
<b>Evenness</b>	0,43	0,32	0,57	0,55	0,55	0,51	0,36	0,32	0,37	0,32	0,36
<b>Chao-I</b>	44 (31/91)	16 (13/35)	29 (25/45)	86 (46/234)	29 (24/54)	58 (37/131)	31 (20/84)	41 (30/80)	36 (26/74)	17 (17/17)	21 (19/34)
<b>Coverage [%]</b>	77	88	91	83	91	84	92	88	88	83	92

Werte in Klammern repräsentieren die Werte bei Annahme eines 95% Konfidenzintervalls

**Tabelle 11:** Ähnlichkeits-Indices des paarweisen Vergleichs der Archaea-Diversität in den *mcrA3* Klonbibliotheken.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10	Chao-Jaccard similarity index
<b>BA1</b>	–	0,035	0,01	0,078	0,019	0,246	0,000	0,373	0,216	0,03	0,017	
<b>BA2</b>	0,038	–	0,161	0,009	0,009	0,28	0,009	0,094	0,195	0,031	0,645	
<b>BA3</b>	0,01	0,147	–	0,235	0,424	0,194	0,2	0,098	0,098	0,103	0,201	
<b>BA4</b>	0,085	0,01	0,236	–	0,306	0,056	0,158	0,035	0,044	0,064	0,061	
<b>BA5</b>	0,038	0,01	0,365	0,252	–	0,117	0,279	0,063	0,055	0,187	0,022	
<b>BA6</b>	0,202	0,039	0,09	0,059	0,089	–	0,115	0,099	0,303	0,008	0,01	
<b>BA7</b>	0,000	0,01	0,172	0,199	0,239	0,081	–	0,008	0,034	0,062	0,03	
<b>BA8-AF</b>	0,045	0,101	0,141	0,028	0,028	0,019	0,009	–	0,609	0,126	0,112	
<b>BA8-FR</b>	0,019	0,195	0,09	0,059	0,069	0,06	0,06	0,57	–	0,035	0,166	
<b>BA9</b>	0,038	0,02	0,05	0,059	0,129	0,01	0,091	0,038	0,04	–	0,034	
<b>BA10</b>	0,029	0,65	0,211	0,05	0,03	0,01	0,03	0,094	0,19	0,04	–	

**Bray-Curtis similarity index**

Die statistische Analyse mittels der Indices nach Chao-Jaccard und Bray-Curtis wurde ebenfalls durch die bei Verwendung des *mcrA3* Primers ermittelte höhere Archaea-Diversität im Vergleich zur 16S rDNA Analyse beeinflusst. Generell wurden geringere Ähnlichkeiten zwischen den Anlagen gefunden. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes konnte jedoch festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieselben Tendenzen aufwiesen wie in der 16S rDNA Analyse. In der *mcrA3* Analyse zeigten die Biogasanlagen 2 und 7 (CJ = 0,009) sowie die Anlagen BA1 und BA3 (CJ = 0,010) kaum Ähnlichkeiten in ihrer Archaea-Diversität, wie auch schon bei der 16S rDNA Analyse.

Ebenfalls analog zur 16S rDNA Analyse konnte der höchste CJ-Index (0,625) bei dem Diversitäts-Vergleich von BA2 und BA10 ermittelt werden. Die hohe Ähnlichkeit der Ar-

chaea-Lebensgemeinschaften in BA3 und BA4 (CJ = 0,235) sowie der BA8-AF und BA8-FR (CJ = 0,609) konnte mit der *mcrA3* Analyse somit bestätigt werden (**Tabelle 11**).

Zusätzlich konnten weitere Unterschiede zwischen der Analyse der 16S rDNA und der Analyse der *mcrA3* Sequenz festgestellt werden:

- (1) Mittels *mcrA3*-Analyse wurden niemals Vertreter der acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* detektiert, obwohl deren Anwesenheit durch die 16S rDNA Analyse nachgewiesen wurde (**Tabelle 8**).
- (2) In den *mcrA3* Klonbibliotheken von BA5, BA6, BA9 und der mehrstufigen Biogasanlage BA8 wurde eine hohe Anzahl an OTUs aus der Familie Methanosarcinaceae detektiert (**Tabelle 8**). Hierdurch konnten die in der 16S rDNA Analyse nachgewiesenen prozentualen Verteilungen innerhalb der Klonbibliotheken dieser Anlagen nicht bestätigt werden (**Tabelle 3**). Die hohe Anzahl an Methanosarcinaceae-OTUs der o.g. *mcrA3* Klonbibliotheken bedingte eine andere prozentuale Verteilung der *mcrA3* Klone für die hydrogenotrophen und acetoklastischen Methanogenen (**Tabelle 12**) wie bei der Analyse 16S rDNA Klonbibliotheken erhalten.
- (3) Die *mcrA3*-Analyse bei BA7 ergab einen sehr hohen Anteil (56%) an Klonen, die der Gattung *Methanothermobacter* (Familie Methanobacteriaceae) zugeordnet werden konnte. Diese OTUs wurden außerdem nur noch in BA10 (1% aller Archaea-Klone) detektiert. Somit besitzt BA7 im Vergleich zu allen anderen in dieser Studie untersuchten Praxis-Biogasanlagen eine einzigartige Archaea-Population.

Die Organismen der hydrogenotrophen Gattung *Methanothermobacter* bevorzugen lt. Literatur zum Wachstum den thermophilen Temperaturbereich (55-65°C). Die Biogasanlage 7 wurde in Kooperation mit dem Verbundprojekt „Energiepflanzenanbau zur Biogasgewinnung“ (BMELV/FNR, 22002305) beprobt. Im Rahmen dieses Projektes wurde diese Anlage mit wechselnden Substraten betrieben. Maissilage wurde daher nur in einem begrenzten Zeitraum (fünf Wochen) in dieser Anlage zur Biogasgewinnung eingesetzt. Die Probennahme erfolgte am Ende dieser Messperiode. Da die Anlage vor dem Einsatz von Maissilage unter mesophilen Bedingungen kurzfristig im thermophilen Temperaturbereich gefahren wurde, kann der Zeitraum von fünf Wochen für eine Umstellung der methanogenen Diversität auf die wechselnden Lebensbedingungen zu kurz gewesen sein. Methanbildende Mikroorganismen haben eine sehr lange Reproduktionszeit (bis zu 15 Tagen). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierte Diversität der BA7 die Mikroflora einer thermophilen Fermentation widerspiegelt.

Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass die methanogenen Archaea durchaus von den Prozessbedingungen und der Reaktorkonstruktion beeinflusst werden. Hierbei könnten Veränderungen in der Reaktorfahrweise einen unter Umständen längerfristi-



gen Einfluss auf die Reaktor-Mikrobiologie und damit auf die Leistungsfähigkeit haben.

In der Analyse der 16S rDNA Klonbibliothek der BA7 wurden nur 1% der Klone der Ordnung Methanobacteriales zugewiesen. Diese Diskrepanz in der Diversität ermittelt durch 16S rDNA und *mcrA* Analyse kann einerseits mit dem unterschiedlichen Primerbindungsverhalten der verwendeten Primersets begründet sein. Andererseits wäre auch eine erhöhte Variation in dem *mcrA*-Gen innerhalb der Gattung *Methanothermobacter* denkbar, was wiederum zu einem Anstieg der Anzahl der OTUs führen würde.

Hydrogenotrophe Methanbildner wurden außer in den Biogasanlagen BA8 (38 bis 42%) und BA10 (26%) in allen Biogasanlagen als dominante Gruppe nachgewiesen. Somit bestätigte die Analyse der *mcrA3* Klonbibliotheken im Allgemeinen die Ergebnisse der 16S rDNA Analysen. In den Anlagen BA8 (58 bis 62%) und BA10 (63%) waren dagegen acetoklastische Methanogene der Gattung *Methanosarcina* vorherrschend (**Tabelle 12**).

**Tabelle 12:** Prozentuale Verteilung der *mcrA3* Klone für hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
hydrogenotroph	94%	100%	92%	100%	96%	95%	100%	38%	42%	83%	26%
acetoclastisch*	6%	n.d.	n.d.	n.d.	4%	5%	n.d.	62%	58%	17%	63%
CA-11-Cluster, Arch-I-Cluster und unbekannte Euryarchaeota	n.d.	n.d.	8%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11%

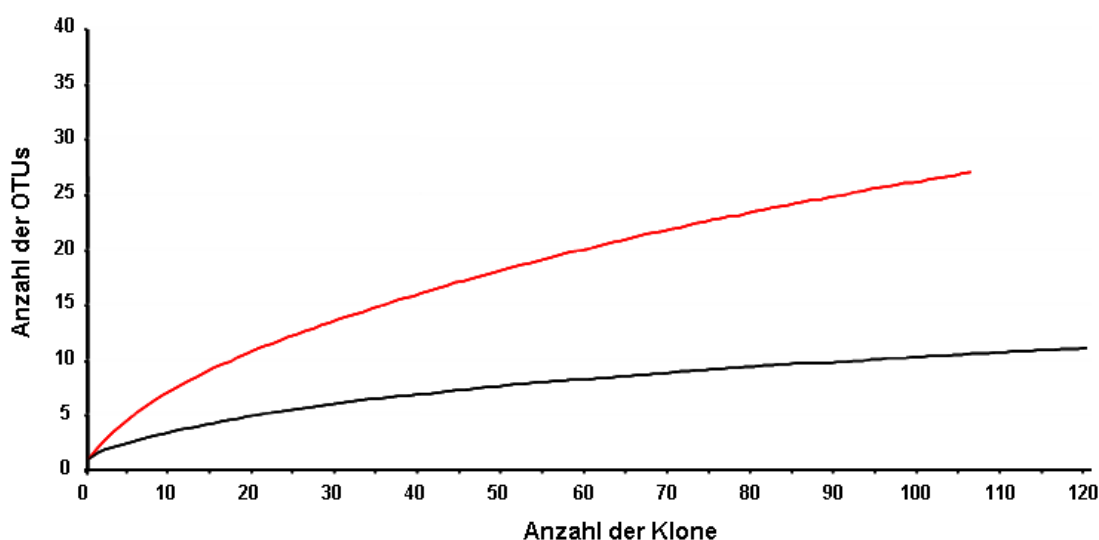
\* *Methanosarcina* sp. wurde als acetoklastische Gattung gewertet

Neben den *mcrA3* Klonbibliotheken wurde für die Biogasanlagen 1 und 4 jeweils eine *mcrA1* Klonbibliothek erstellt. Diese umfassten 122 (BA1) bzw. 108 (BA4) Klone (**Tabelle 9**), die zu 9 (BA1) bzw. 27 (BA4) OTUs zusammengefasst werden konnten (**Tabelle 8**). Die phylogenetische Zuordnung der Klone zeigte, dass auch in diesen Klonbibliotheken die Ordnung der Methanomicrobiales dominierte: in BA1 mit 91% und in BA4 mit 79% aller *mcrA1* Klone. Wie schon in dem Vergleich der drei Primersets erläutert (**Tabelle 7**) werden mit dem *mcrA1* Primersets beide acetoklastischen Gattungen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* amplifiziert (**Tabelle 8**).

In der Biogasanlage BA-1 wurde die Gattung *Methanosarcina* mit 9% aller *mcrA1* Klone detektiert. Die *mcrA1* basierte Analyse bestätigt somit die Ergebnisse der *mcrA3* Auswertung.

Die Gattung *Methanosaeta* wurde in der BA4 mit 3% aller *mcrA1* Klone nachgewiesen. Wie schon zuvor beschrieben wird diese Gattung zwar von dem *mcrA3* Primerset diskriminiert, konnte aber mittels der 16S rDNA Analyse ebenfalls in dieser Biogasanlage nachgewiesen werden.

Die Rarefaction-Analyse zeigte für die *mcrA1* Klonbibliothek der BA4 eine nicht konvergierende Kurve, so dass die tatsächliche Artenzahl (OTU-Anzahl) mit dem Chao I Index abgeschätzt wurde. Für BA1 wurde ebenfalls der Chao I Index berechnet, obwohl die Rarefaction-Kurve einen nahezu asymptotischen Verlauf aufwies (**Bild 3**). Die Auswertung des Chao I Indexes zeigte, dass die unteren Konfidenzintervalle nur knapp über der tatsächlichen OTU-Anzahl lagen (**Tabelle 13**). Somit war auch in diesen beiden *mcrA1* Klonbibliotheken der Probenumfang statistisch gesichert. Auch die Werte für die Coverage mit 91% (BA1) und 88% (BA4) zeigten, dass mit dem *mcrA1* Primerset die Mehrheit der OTUs in diesen Biogasanlagen detektiert wurde (**Tabelle 13**).



**Bild 3:** Rarefaction-Analyse der *mcrA1* Klonbibliotheken.

Die Anzahl der Klone wurde gegen die Anzahl der ermittelten OTU aufgetragen und interpoliert. — = Rarefaction-Kurve für BA4; — = Rarefaction-Kurve für BA1.

Die Werte für den Shannon Diversitätsindex und der *Evenness* der *mcrA1* Klonbibliothek von BA4 (**Tabelle 13**) lagen nur geringfügig unterhalb derer für die entsprechenden *mcrA3* Klonbibliotheken (**Tabelle 10**). Deutlichere Unterschiede ergaben sich dagegen für beide Parameter im Falle der *mcrA1* Klonbibliothek von BA1 (**Tabelle 13**), was durch die zusätzliche Detektion der Gattung *Methanobrevibacter* (2% aller *mcrA3* Klone) in der *mcrA3* Klonbibliothek dieser Biogasanlage zu erklären ist.

**Tabelle 13:** Diversitätsanalyse und statistische Auswertung für die *mcrA1* Klonbibliotheken.

	BA1	BA4
<b>Archaea OTUs</b>	9	27
<b>Shannon Index</b>	1,10	2,62
<b>Evenness</b>	0,27	0,51
<b>Chao-I</b>	13 (11/23)	38 (30/68)
<b>Coverage</b>	91%	88%

Werte in Klammern repräsentieren die Werte bei Annahme eines 95% Konfidenzintervalls

### Zusammenfassung Versuchsteil A

Im Rahmen dieser Studie wurden zehn unterschiedliche Praxis-Biogasanlagen molekular-genetisch auf die Zusammensetzung ihrer methanbildenden Mikroflora hin analysiert. Hierzu wurde ein Standard-Protokoll zur Extraktion der genomischen DNA aus Reaktorproben etabliert (NETTMANN *et al.* 2008). Für die Analyse wurden drei Primersets für zwei unterschiedliche Genregionen eingesetzt: ein 16S rDNA Primerset (modifiziert nach GIOVANNONI *et al.* 1990 und FERNANDEZ *et al.* 1999), ein *mcrA1* Primerset (LUTON *et al.* 2002) und ein *mcrA3* Primerset (LUEDERS *et al.* 2001). Das 16S rDNA und das *mcrA3* Primerset wurden für alle 10 Biogasanlagen eingesetzt, während das *mcrA1* Primerset nur für die Biogasanlagen BA1 und BA4 verwendet wurde. Mit Hilfe der genannten Primersets wurden 25 16S rDNA und *mcrA* Bibliotheken erstellt. Aus diesen wurden 1020 16S rDNA Klone (68 OTUs), 1158 *mcrA3* Klone (155 OTUs) und 230 *mcrA1* Klone (36 OTUs) mittels genetischem *fingerprinting* (ADRDA, PCR-RFLP) analysiert.

Die phylogenetische Zuordnung der nachgewiesenen OTUs zeigte, dass mit allen drei Primersets alle Ordnungen der methanogenen Archaea, mit Ausnahme der Methanococcales, detektiert wurden. Jedoch zeigten die verschiedenen Primersets geringe Abweichungen bezüglich des Nachweises der Methanogenen auf der Gattungsebene. In allen Biogasanlagen mit Ausnahme der Anlagen BA10 und BA8 sind hydrogenotrophe Archaea die dominierenden Methanbildner.

Mit Hilfe von paarweisen Diversitätsanalysen zwischen den zehn Biogasanlagen auf Grundlage der Bray-Curtis- und Chao-Jaccard-Indices wurden Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in der Archaea-Diversität berechnet. Diese Ergebnisse wurden mit den Prozessparametern in Relation gesetzt. Auf Basis dieser Analysen konnte keine Substratabhängigkeit der Ausprägung der methanogenen Lebensgemeinschaften festgestellt werden. Ferner scheinen weder die Verweilzeit der Substrate in dem Reaktor noch die Raumbelastung der Reaktoren die Zusammensetzung der Archaea-Lebensgemeinschaft zu beeinflussen. Dagegen scheint die in dem Reaktor vorliegende Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentration die Struktur der Archaea-Population zu beeinflussen.

## **Teil B: Entwicklung eines kulturunabhängigen quantitativen Nachweisverfahrens für methanbildende Mikroorganismen basierend auf 16S rDNA und mcrA Sequenz**

Im Rahmen dieses Teilprojektes war folgender Arbeitsplan projektiert: (B1) Entwicklung eines semi-quantitativen Nachweissystems beruhend auf einer konventionellen PCR, (B2) Entwicklung eines quantitativen *real-time*-PCR-Protokolls (Q-PCR) und (B3) Anwendung des Assays an Labor- und Praxisanlagen ('Praxistest'). Der ursprüngliche Arbeitsplan wurde allerdings zwischenzeitlich wie folgt modifiziert: Aufgrund der Arbeiten von Yu *et al.* (2005, 2006) sollten die in diesen Arbeiten publizierten Methoden vorrangig vor der Entwicklung eigener Methoden etabliert werden mit dem Ziel (1) eine Möglichkeit zur Kalibrierung der im Rahmen dieses Projektes entwickelten PCR-Assays zu besitzen sowie (2) eine Quantifizierung der via *fingerprint* Analytik ermittelten Archaea-Gruppen zu erreichen.

### *B-1 Entwicklung eines semi-quantitativen Nachweissystems mittels konventioneller PCR*

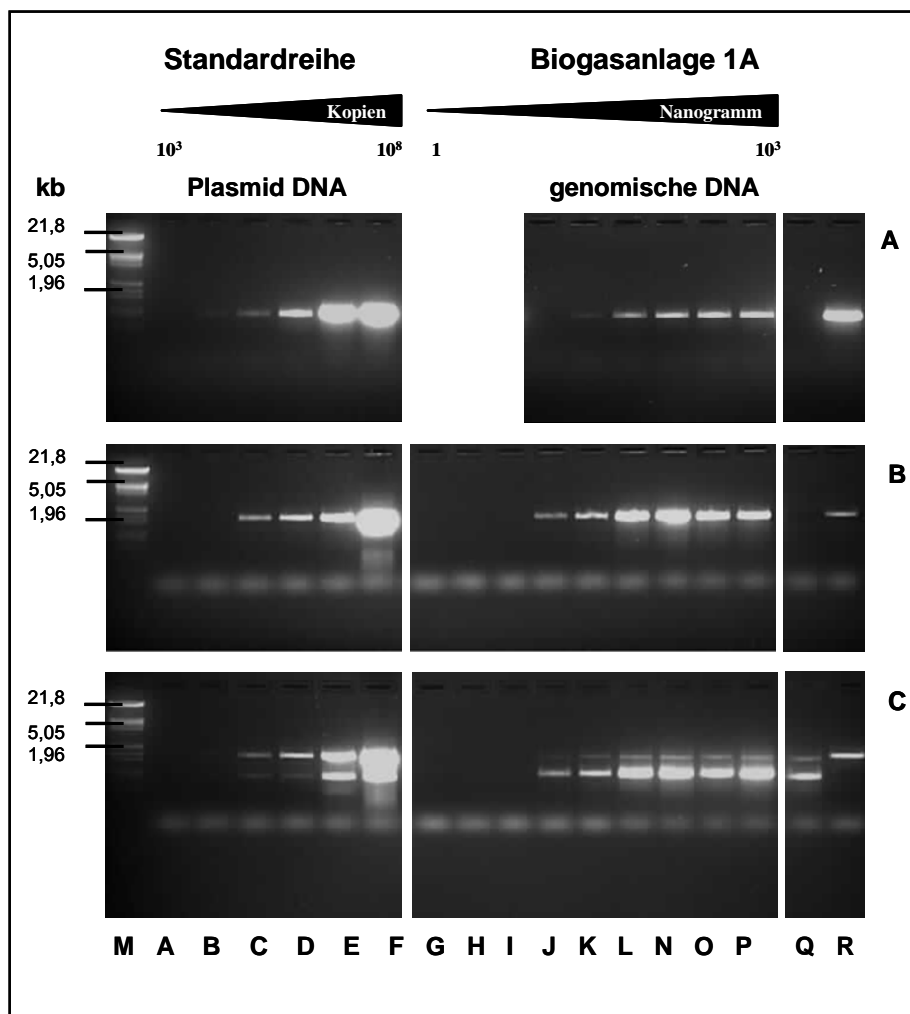
Beruhend auf der klassischen PCR mit anschließender Amplifikatauftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese sollte unter Verwendung der von LUTON *et al.* (2002) publizierten 16S rDNA Primer ein semi-quantitatives Nachweissystem entwickelt werden. Ziel dieser Untersuchungen sollte eine Multiplex-PCR sein, in der sowohl die 16S rDNA Primer der Domäne Bacteria als auch die 16S rDNA Primer der Domäne Archaea eingesetzt werden. Anhand der Intensität der Bandenstärke im Agarosegel kann dann eine ungefähre Abschätzung der Anzahl an 16S rDNA Kopien, die sich z.B. in einem Nanogramm eingesetzter genomischer DNA einer Umweltprobe befinden, erfolgen. Die Entwicklung dieses semi-quantitativen Ansatzes macht es möglich, dass mit geringem zeitlichem Aufwand schnell eine Aussage über die ungefähre Relation von Bacteria und Archaea 16S rDNA Kopien getroffen werden kann.

**Tabelle 14:** Versuchsaufbau zur Etablierung eines semi-quantitativen Nachweisverfahrens für Organismen der Domänen Archaea und Bacteria mittels einem konventionellen Multiplex-PCR-Ansatz.

Versuchs- ansatz	Zielgen	Spezifität	Referenz	eingesetzte Kopienzahl	Biogas- anlage	DNA- Menge [pg]
A	16S rDNA	Bacteria	Standardreihe (Bac)	$10^1$ - $10^8$	-	-
B	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^1$ - $10^8$	-	-
C	16S rDNA	Bacteria	Standardreihe (Bac)	$10^1$ - $10^8$	-	-
D	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^1$ - $10^8$	-	-
	16S rDNA	Bacteria				
E	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^1$ - $10^8$	-	-
	16S rDNA	Bacteria				
F	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^6$ - $10^8$	-	-
	16S rDNA	Bacteria				
G	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^1$ - $10^8$	-	-
	16S rDNA	Bacteria				
H	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^3$ - $10^8$	BA1A	10-1000
	16S rDNA	Bacteria				
I	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^3$ - $10^8$	BA1A	10-1000
	16S rDNA	Bacteria				
J	16S rDNA	Archaea	Standardreihe (Arch)	$10^3$ - $10^8$	BA1A	10-1000
	16S rDNA	Bacteria				

Um eine gute Abschätzung der Bandenintensität der Proben zu gewährleisten, fanden zunächst Untersuchungen zum Erstellen einer geeigneten Standardkurve statt, anhand welcher dann die Abschätzung der 16S rDNA Kopien in der Umweltprobe erfolgen sollte. Hierzu wurde ein 16S rDNA Fragment für einen Vertreter der Domäne Bacteria (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* DSM 30168) als auch der Domäne der Archaea (*Methanosarcina barkeri* DSM 800) in einen pGEM-T Plasmidvektor kloniert. Nach anschließender Linearisierung und DNA-Gehaltsbestimmung der isolierten Plasmide konnten genaue Kopienzahlen des gewünschten Fragmentes ermittelt werden. Eine Übersicht über die erfolgten Versuche wird in der **Tabelle 14** gegeben.

Sowohl im Versuchsansatz (A) als auch (B) konnte ein deutlicher Gradient in der Zunahme der Intensität der Bandenstärke von  $10^4$  bis  $10^8$  Kopien je PCR-Ansatz beobachtet werden. In den PCR-Ansätzen, in denen weniger als 1000 Kopien des 16S rDNA-Fragmentes je PCR-Ansatz als DNA-Template zum Einsatz kamen, wurde keine Produktbildung beobachtet.



**Bild 4:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente.

(A) Primerpaar 16S rDNA-fw (Arch) / 16S rDNA-rev (Arch).

A - F = Standardreihe (Arch) (vgl. **Tabelle 14**); J - P = genomische DNA aus BA1A; Q = Negativkontrolle; R = Positivkontrolle (gDNA von *Methanosarcina barkeri*).

(B) Primerpaar 16S rDNA-fw (Bac) / 16S rDNA-rev (Bac).

A - F = Standardreihe (Bac) (vgl. **Tabelle 14**); G - P = genomische DNA aus BA1A; Q = Negativkontrolle; R = Positivkontrolle (gDNA von *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*).

(C) Multiplexansatz mit beiden Primerpaaren 16S rDNA (Bac) und 16S rDNA (Arch).

A - F = Standardreihe (Arch und Bac); G-Q = genomische DNA aus BA1A; Q = Positivkontrolle (gDNA von *Methanosarcina barkeri*); R = Positivkontrolle (gDNA von *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*).

Die zu erwartenden Fragmentgrößen lagen für das Primerpaar 16S rDNA (Arch) bei ca. 800 bp und beim Primerpaar 16S rDNA (Bac) bei ca. 1200 bp. M bezeichnet den Marker III ( $\lambda$ /Ecol/HindIII), der als Größenstandard aufgetragen wurde. Arch = Archaea; Bac = Bacteria.

Ein ähnliches Ergebnis wurde mit den Ansätzen (C) und (D) erhalten, bei welchen beide 16S rDNA Primerkombinationen (Archaea und Bacteria) in einem PCR-Ansatz vereinigt wurden. In einem ersten Multiplexansatz wurde neben dem Standardplasmid zusätzlich zu jedem PCR-Ansatz  $10^6$  Kopien des Plasmids mit dem 16S rDNA Fragment von *Methanosarcina* gegeben um den Einfluss zweier parallel ablaufender PCR-Reaktionen in

einem Ansatz zu untersuchen (Ansatz E, **Tabelle 14**). Dabei zeigte sich in der Fragmentintensität der Standardreihe kein Unterschied zu den bereits vorangegangenen Versuchen. Allerdings wurde das 16S rDNA Fragment von *Methanosarcina* nicht in allen PCR-Ansätzen gleich stark amplifiziert wie eigentlich erwartet. In den Standardansätzen, bei welchen  $10^7$  bzw.  $10^8$  Kopien des 16S rDNA Plasmids von *Pectobacterium* als DNA-Template eingesetzt wurden, konnte eine verringerte Amplifikation des 16S rDNA Fragmentes von *Methanosarcina* beobachtet werden.

Grundsätzlich scheinen sich also die beiden parallel ablaufenden PCR-Reaktionen gegenseitig zu beeinflussen. Hieraus wiederum lässt sich folgern, dass der gewählte Ansatz zur Entwicklung eines semi-quantitativen Nachweisverfahrens ungeeignet ist.

Als Bestätigung dieses Ergebnisses können die Resultate der Versuchsansätze (H) bis (J) gewertet werden. Im Versuchsansatz (H) wurde neben der Standardreihe auch eine DNA-Probe aus der Biogasanlage 1A in Form einer Verdünnungsreihe von 1000 pg bis 10 pg eingesetzt (**Bild 4A**). Hierbei zeigte sich wieder eine gute Abstufung der erhaltenen PCR-Produkt-Intensität innerhalb der Standardreihe. Auch bei der Reaktorprobe erfolgte die Produktbildung entsprechend der eingesetzten Menge der DNA.

In diesem Versuch erwies es sich als schwierig die Bandenintensitäten der Standardreihe mit denen der Reaktorprobe in Beziehung zu setzen. Ähnliches wurde im Versuchsansatz (I) beobachtet.

In einem Multiplexansatz, bei welchem beide 16S rDNA Primersets (Bacteria und Archaea) mit den Plasmiden der 16S rDNA von *Pectobacterium* und *Methanosarcina* in der Standardreihe sowie mit der Template-DNA der Biogasanlage 1A in Reaktion gebracht wurden (**Bild 4C**), konnte beobachtet werden, dass sich die Standardreihen der eingesetzten Plasmide wie erwartet verhalten. Sowohl die Fragmentintensität des 16S rDNA Amplifikats für die Domäne Archaea als auch die des Amplifikats für die Domäne Bacteria nehmen mit steigendem Plasmidkonzentrationseinsatz zu.

Dieses Ergebnis wurde im Falle der Verwendung von DNA aus Biogasanlagen jedoch nicht erhalten. Vergleicht man die Bandenintensitäten der 16S rDNA Fragmente von Bacteria zu Archaea untereinander, so wurde in allen Verdünnungsansätzen ein stärkeres Signal des 16S rDNA Fragmentes der Archaea beobachtet (**Bild 4C**). Im Falle der Biogasanlagen-DNA wurde die Amplifikation des 16S rDNA Genes der Bacteria diskriminiert. Hieraus resultiert immer eine Fehleinschätzung der Anzahl der vorhandenen 16S rDNA Kopien für die Gruppe der Bacteria. Eine Auswertung bezüglich der Relation von 16S rDNA Kopien von Archaea zu Bacteria konnte mit diesem Ansatz somit nicht erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen folgern, dass der Ansatz mit Hilfe einer konventionellen PCR eine schnelle Aufklärung über die Verteilung von Archaea und Bacteria in Praxisbiogasanlagen zu erlangen nicht umsetzbar war.

### *B-2 Entwicklung eines quantitativen real-time-PCR-Protokolls*

In Projektteil A-2 wurde bereits eine Optimierung des Protokolls zur DNA-Isolierung durchgeführt. Diese Optimierung wurde primär unter dem Aspekt der Gewinnung von DNA zur Entwicklung von Klonbibliotheken durchgeführt. Um aber den Analysen-Ablauf weiter zu verbessern und qualitativ möglichst hochwertige DNA-Präparationen für die Q-PCR-Analysen bereitstellen zu können, wurde eine erneute Versuchsreihe zur Optimierung der Gewinnung von mikrobieller DNA aus Biogasanlagen durchgeführt.

**Tabelle 15:** Verwendete Protokolle zur DNA-Isolierung.

SDS = Natriumlaurylsulfat. CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid.

Methode	Lyse der Zellen	CTAB Behandlung	Proteinase K Behandlung	RNAse Behandlung	Aufreinigungssäulchen MicroSpin S-400 HR
A	mechanisch (FastPrep)	Standardprotokoll FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals)			-
B	mechanisch (FastPrep)	modifiziertes Kitprotokoll FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals)*			-
C	mechanisch (FastPrep)	+	+	+	-
D	chemisch (SDS)	+	+	-	+
E	chemisch (SDS)	+	+	+	-
F	enzymatisch (Lysozym)	+	+	+	-
G	enzymatisch (Lysozym)	+	+	-	+
H	mechanisch/enzymatisch (Schockgefrieren/Lysozym)	+	+	+	-
I	mechanisch/enzymatisch (Schockgefrieren/Lysozym)	+	+	-	+

\* Das Protokoll des Herstellers wurde entsprechend der Empfehlungen von LEBUHN, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Abteilung Umwelttechnik in der Landnutzung, modifiziert.

Um den Einfluss der gewählten DNA-Isolierungsmethode auf die quantitative Erfassung von methanogenen Archaea mittels Q-PCR näher bestimmen zu können, wurden neun verschiedene Variationen von Protokollen zur DNA-Isolierung untersucht. Dabei wurden die Verfahren für den Zellaufschluss (mechanisch, chemisch, enzymatisch), der Einsatz



von Detergentien zur Reinigung der DNA (CTAB, Proteinase K) sowie die abschließenden Aufreinigungsschritte der DNA-Suspension (RNase-Verdau, Einsatz von Aufreinigungssäulchen) variiert (**Tabelle 15**).

**Tabelle 16:** Menge und Reinheit der aus den Optimierungsversuchen (vgl. **Tabelle 15**) erhaltenen DNA-Präparationen.

Die Bestimmung der DNA-Gehalte erfolgte fluorospektrometrisch. Die Bestimmung einer Protein- bzw. Kohlenhydratverunreinigung erfolgte photometrisch anhand der Absorption bei  $\lambda = 230$  nm, 260 nm und 280 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei bzw. vier Einzelmessungen.

Visuelle Bewertung der Reinheit: +++ = sehr deutliches Fluoreszenzsignal, ++ = deutliches Fluoreszenzsignal, + = teilweise gestörtes Fluoreszenzsignal;  $A_{260}/A_{280}$  = Absorptionsverhältnis zum Nachweis einer Proteinverunreinigung;  $A_{230}/A_{260}$  = Absorptionsverhältnis zum Nachweis einer Kohlenhydratverunreinigung; n.d. = nicht bestimmt.

Methode	Visuelle Bewertung der Reinheit	DNA-Gehalt [ng ml <sup>-1</sup> ]	$A_{260}/A_{280}$ [Idealwert: 1,8]	$A_{230}/A_{260}$ [Idealwert: 0,45]
A	++	41838 ± 1997	1,769 ± 0,141	6,299 ± 1,850
B	++	33217 ± 3760	2,189 ± 0,371	2,541 ± 1,085
C	+++	18761 ± 3871	1,756 ± 0,114	4,193 ± 1,700
D	+++	20107 ± 23829	n.d.	n.d.
E	++	259717 ± 18279	n.d.	n.d.
F	+	12454 ± 499	1,508 ± 0,153	0,651 ± 0,301
G	++	7143 ± 327	1,685 ± 0,036	0,586 ± 0,059
H	++	11804 ± 1729	1,629 ± 0,095	0,461 ± 0,145
I	+++	7807 ± 695	1,570 ± 0,112	0,606 ± 0,072

Für die Bewertung der Ausbeute und der Qualität der isolierten DNA wurden verschiedene Parameter betrachtet (**Tabelle 16**). Die höchsten Ausbeuten bezogen auf den DNA-Gehalt wurden mit SDS- bzw. FastPrep-basierten DNA-Isolierungsmethoden erreicht. Allerdings zeigten sich beim chemischen Aufschluss der Zellen (SDS) deutliche Konzentrationsunterschiede bei wiederholten Präparationen (Methode D: DNA-Gehaltsausbeuten zwischen 4001 ng ml<sup>-1</sup> und 47481 ng ml<sup>-1</sup>), wohingegen beim mechanischen Zellaufschluss (FastPrep) verhältnismäßig konstante DNA-Konzentrationen bei parallel aufgearbeiteten Proben erzielt werden konnten (Methode A: niedrigste DNA-Gehaltsausbeute: 40080 ng ml<sup>-1</sup>, höchste DNA-Gehaltsausbeute: 44148 ng ml<sup>-1</sup>). Eine Fragmentierung der DNA beim mechanischen Aufschluss der Zellen konnte im Unterschied zu früheren Experimenten nicht festgestellt werden (vgl. Kapitel A2, Optimierung der Protokolle zur Isolierung von mikrobieller DNA aus Biogasreaktoren). Alle DNA-Isolierungsprotokolle, die zur

Anwendung kamen, lieferten im Unterschied zu den früheren Arbeiten hochmolekulare, nicht-fragmentierte DNA.

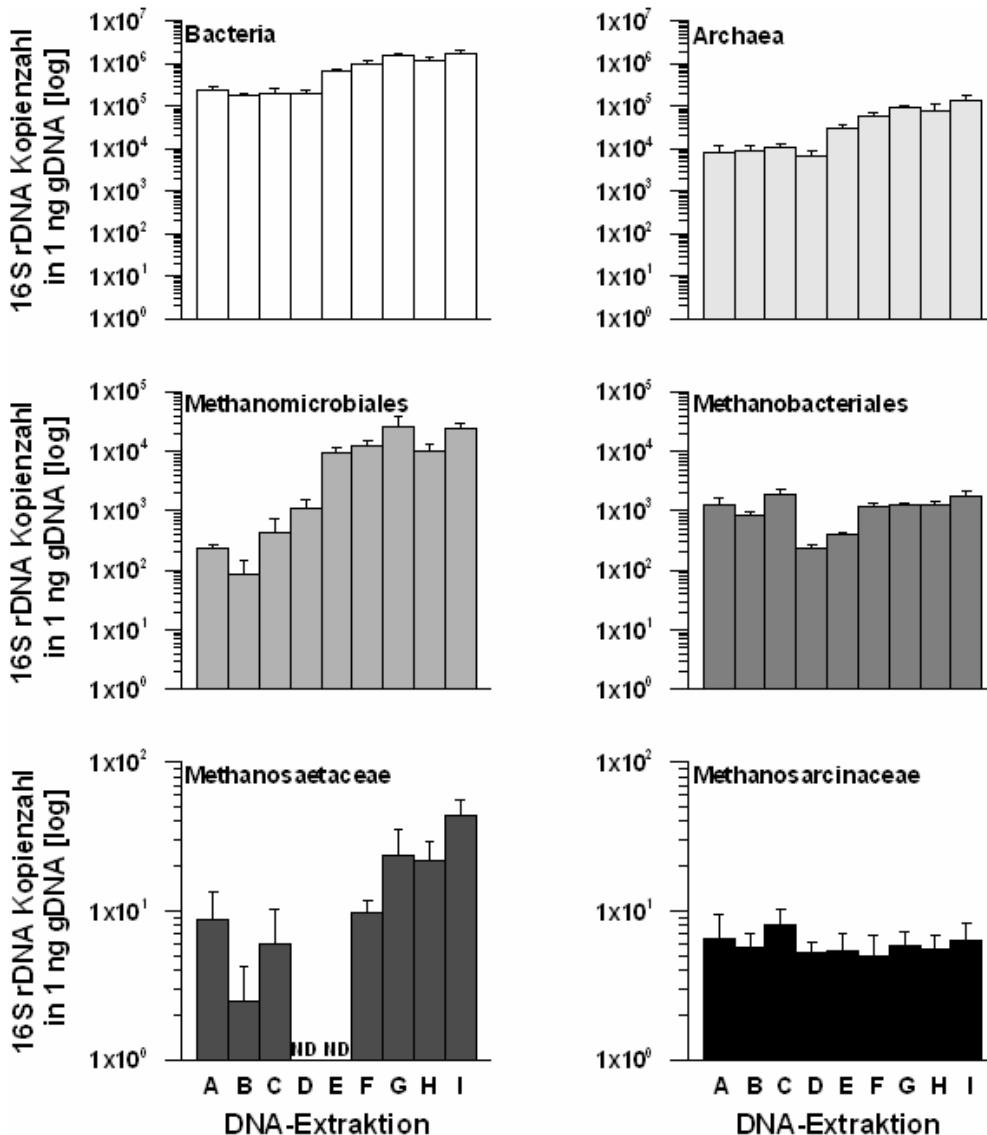
Um genauere Aussagen über die Qualität der DNA treffen zu können (Reinheitsgrad der DNA), wurden Absorptionsspektren der DNA-Proben im UV-Bereich aufgenommen ( $\lambda = 200\text{-}300\text{ nm}$ ). Mit Hilfe der Quotientenbildung aus den ermittelten Absorptionswerten von  $A_{260}$  und  $A_{280}$  können Rückschlüsse auf die Protein- bzw. RNA-Verunreinigungen der isolierten DNA gezogen werden. Werte die im Bereich zwischen 1,7 und 1,9 liegen, werden als wenig verunreinigte DNA angesehen. Der Idealwert des Quotienten liegt bei 1,8. Sowohl mit der mechanischen als auch mit der enzymatischen Zellyse konnten optimale Verhältniswerte ermittelt werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass alle angewandten DNA-Isolierungsmethoden Protein und RNA-Strukturen, die während der Zellyse freigesetzt werden, optimal eliminieren.

Eine weitere wichtige Größe, die aus der Absorptionsmessung herangezogen werden kann, ist die Bildung des Quotienten aus den ermittelten Absorptionswerten von  $A_{230}$  und  $A_{260}$ . Dieser ist ein Maß für die Kohlenhydratverunreinigung und hat seinen Idealwert bei 0,45. Größere Abweichungen vom Optimalwert konnten vor allem in den DNA-Proben, die mit dem FastPrep-System isoliert wurden, beobachtet werden. Dieses kann u.U. auf bestimmte Inhaltsstoffe in den Puffern des verwendeten Kits wie z.B. Guanidiniumchlorid (chaotrophes Denaturierungsmittel für Proteine) zurückzuführen sein.

Nachdem die Ausbeute und die Qualität der DNA überprüft wurden, schlossen sich die Untersuchungen zur quantitativen Verteilung der methanogenen Archaea in einem Labor-Fermenter an. Dazu kam ein von Yu *et al.* (2005) modifiziertes Q-PCR Assay Protokoll (vgl. Teil B-3), basierend auf der 16S rDNA-Ebene, zum Einsatz. Ermittelt wurden dabei die 16S rDNA Kopienzahlen, welche in einem Nanogramm genomischer DNA detektiert werden konnten.

Vergleicht man die ermittelten 16S rDNA Kopienzahlen der Domäne Bacteria in allen DNA-Isolierungsmethoden miteinander, so kann festgestellt werden, dass in den mit der FastPrep-Methode isolierten DNA-Proben grundsätzlich ein geringerer Anteil an 16S rDNA Kopien (ca. 50000 Kopien je Nanogramm genomischer DNA) vorhanden war als bei allen anderen DNA-Extraktionsprotokollen (ca. 1 Mio. Kopien je Nanogramm genomischer DNA) (vgl. **Bild 5**). Diese verminderte Ausbeute an 16S rDNA Kopien im FastPrep-System könnte darauf zurückzuführen sein, dass beim mechanischen Aufschluss der Zellen durch Keramik- und Silikakugeln ein größerer Teil an Pflanzenzellen aufgeschlossen wird und sich somit das Verhältnis von Pflanzen-DNA zu Bakterien-DNA zugunsten der Pflanzen-DNA verschiebt. Somit befänden sich in einem definierten Anteil an DNA, welches in der Q-PCR eingesetzt wird, mehr Pflanzen-DNA-Fragmente, was zum Absinken der 16S rDNA Kopien der Domäne Bacteria führt. Ein ähnliches Ergebnis

ergab die Analyse mit dem Archaea-spezifischen Primerset. Auch hier lagen die Werte der ermittelten 16S rDNA-Kopien in den DNA-Isolierungsmethoden A, B, C leicht unter den Werten der anderen DNA-Isolierungstechniken.



**Bild 5:** Ergebnisse der Q-PCR.

Die verwendeten Primer bzw. Sonden waren entsprechend Yu *et al.* (2005). Als DNA-Template wurden die DNA-Präparationen der Optimierungsversuche eingesetzt (vgl. **Tabelle 15**). Die logarithmierte Y-Achse gibt die ermittelte 16S rDNA Kopienzahl, welche in einem Nanogramm genomischer DNA enthalten ist, wieder. Säulen kennzeichnen Mittelwerte, Fehlerbalken eine Standardabweichung für drei bzw. vier Messwerte. ND = nicht detektiert.

Ein anderes Bild zeigten die Ergebnisse der spezifischen, methanogenen 16S rDNA-Primersets. So konnten für die Primersets spezifisch für Methanobacteriales und Methanosarcinaceae in allen Ansätzen gleiche 16S rDNA-Kopienzahlen ermittelt werden. Auch mit dem Primerset, welches zum Nachweis der Individuen der Familie Methanosarcinaceae

dient, konnten in den DNA-Isolierungsansätzen A-C und F-I ähnliche 16S rDNA Kopienzahlwerte erreicht werden. Interessanterweise scheinen die Methoden der SDS-basierten DNA-Isolierung (Methode D und E) einen Aufschluss der Zellen der Familie Methanosaetaceae zu verhindern, da genau mit diesen Ansätzen keine 16S rDNA Kopien detektiert werden konnten.

Auffälligerweise erzeugten die DNA-Präparationen der verschiedenen Isolierungsprotokolle in dem Q-PCR-Assay spezifisch für Methanomicrobiales je nach Isolierungsprotokoll wechselnde Mengen von 16S rDNA Kopien (**Bild 5**). So lagen die mit dem FastPrep ermittelten Kopienzahlen um zwei Zehnerpotenzen niedriger als die detektierten 16S rDNA Kopien, die mit den Methoden D, E, F, G, H, I (SDS- bzw. Lysozym-basierter Zellaufschluss) ermittelt wurden. Mögliche Ursachen für diese Unterschiede könnten (1) ein schlechterer Aufschluss der Zellen der Methanomicrobiales mit dem FastPrep-System oder (2) eine durch Inhibitoren erzielte Verzögerung bzw. Behinderung der *real-time* PCR sein (z.B. durch Blockieren einer Primerangriffsstelle des Methanomicrobiales Primersets).

Durch die geringe Anzahl an detektierten 16S rDNA Kopien der Ordnung der Methanomicrobiales verschob sich das Verhältnis von den ermittelten Kopienzahlen an hydrognotrophen Methanogenen (Methanobacteriales, Methanomicrobiales) zugunsten der Methanobacteriales (**Tabelle 17**). Mit den DNA-Isolierungsmethoden D-I konnte eine deutliche Dominanz der Gruppe der Methanomicrobiales bestimmt werden (82% - 96%, **Tabelle 17**).

**Tabelle 17:** Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Kopienzahl bei Verwendung unterschiedlicher Protokolle zur DNA-Isolierung.

Die Ermittlung der Kopienzahl erfolgte mittels Q-PCR (Yu *et al.* 2005).

Methode	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<b>Methanomicrobiales</b>	15%	9%	18%	82%	96%	91%	95%	88%	92%
<b>Methanobacteriales</b>	84%	90%	81%	18%	4%	8%	4%	11%	7%
<b>Methanosarcinaceae</b>	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
<b>Methanosaetaceae</b>	< 1%	< 1%	< 1%	-	-	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gewählte DNA-Isolierungsmethode einen großen Einfluss auf die quantitative Bestimmung von Organismengemeinschaften in Reaktorproben mittels der Q-PCR hatte. Es konnte ermittelt werden, dass die gewählte Methode das Aufschließen bestimmter Zellstrukturen begünstigt bzw. hemmt (vgl. **Bild 5**, Primerset Methanosaetaceae). Eine nach der DNA-Isolierung anschließende Aufreinigung der Probe mit Hilfe einer Sephacrylsäule bewirkte eine gesteigerte Rate der

PCR-Amplifikation, welche leicht erhöhte 16S rDNA Kopienzahlen bedingte (Methode F vs. G bzw. Methode H vs. I).

Die unter Versuchsteil A angewandte Präparationsmethode (entspricht der DNA-Isolierungsmethode F) kann als eine der besten Methoden zum Aufschluss der Zellen der methanogenen Archaea angesehen werden, da keine Individuengruppe durch diesen Zellaufschluss diskriminiert wurde.

Allerdings sind weitere Untersuchungen bezüglich der mechanischen Zellyse (FastPrep) ratsam, da diese Methode einen deutlich geringeren Zeitaufwand benötigt als die enzymatischen bzw. chemischen Aufschlussverfahren. So könnte zum Beispiel die Veränderung der Geschwindigkeit bzw. der Länge der Aufschlusszeit eine Verbesserung der Lyseeigenschaften bewirken. Es sind somit weitere Untersuchungen bezüglich der DNA-Isolierung notwendig, um ein schnelles und optimales Aufschlussverfahren zu etablieren. Neben der Q-PCR sollten weitere quantitative Analysen (z.B. Abgleich mit FISH-Analyse) zur Bestätigung der ermittelten gruppenspezifischen Anteile innerhalb der methanogenen Archaea dienen.

Mit Hilfe der Methode der quantitativen *real-time* Polymerasekettenreaktion (Q-PCR) ist es möglich eine Detektion und Quantifizierung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften durchzuführen ohne die beteiligten Mikroorganismen zuvor aus Umweltproben isolieren und kultivieren zu müssen. Basierend auf den Sequenzen des 16S rDNA und des *mcrA* Genes sollten im Rahmen dieses Projektes Assays entwickelt werden, die einen quantitativen Nachweis von methanogenen Archaea in Praxisbiogasanlagen ermöglichen.

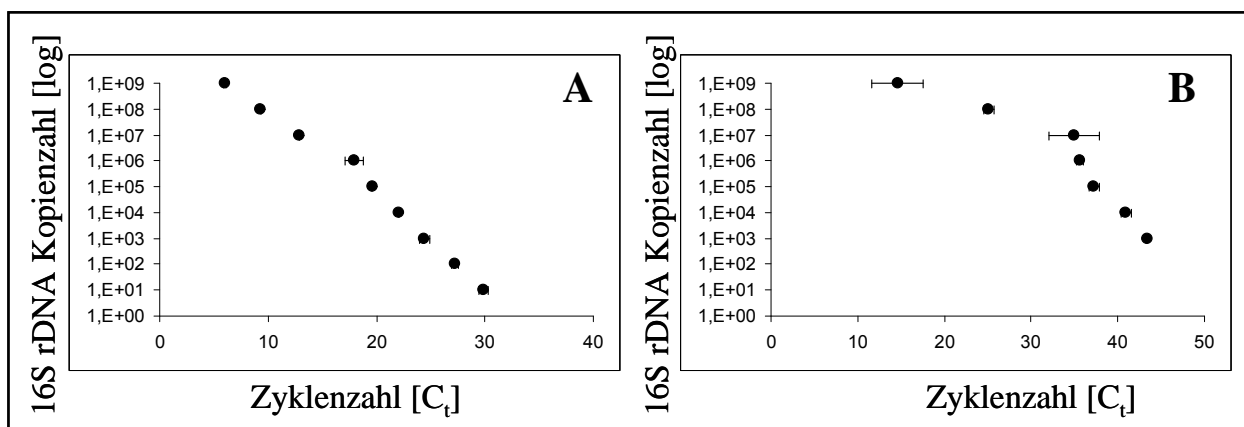
Für die Entwicklung eines solchen Nachweisverfahrens (vgl. Arbeitsplan B-2) ist die Verfügbarkeit eines Standards unerlässlich. Üblicherweise wird hierzu eine Verdünnungsreihe eines linearisierten Plasmids mit einem inserierten Fragment der Zielsequenz (hier 16S rDNA bzw. *mcrA* Sequenz einer Typspezies) verwendet. Grundlage der Entwicklung solcher Standards bildete genomische DNA für Typspezies der Archaea-Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta* und *Methanobacterium* (zur Verfügung gestellt durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ).

Mittels der ausgewählten Arten sind die häufigsten in Biogasanlagen vertretenen Gattungen in den Standards vertreten. Ebenfalls sind damit Standards für acetoklastische (*Methanosaeta*) und hydrogenotrophe (*Methanoculleus*) Methanbildner verfügbar.

Nach der Klonierung der 16S rDNA Region und der Erzeugung von linearisierten Plasmide für die Standardreihe wurde mit den von Yu *et al.* (2005, 2006) publizierten Protokollen eine *real-time* PCR mit einem Archaea-spezifischen 5'-Nuclease-Assay durchgeführt. Allerdings konnte mit diesem Protokoll keine definierte Standardreihe, welche zur Analyse

der Quantität von Praxis-Biogasanlagen-Proben notwendig wäre, gebildet werden (**Bild 6B**).

Als Alternative zu dem originalen Protokoll wurde in einem zweiten Versuchsansatz ein *real-time* PCR-Protokoll angewandt, welches vom Hersteller (Applied Biosystems, Darmstadt) empfohlen wurde. Damit war es möglich einen linearen Verlauf der Standardreihe zu erzielen (**Bild 6A**). Dieses Protokoll wurde auch für alle weiteren Assays beibehalten.



**Bild 6:** Standardkurven für die quantitative Erfassung der 16S rDNA Kopienzahl für Organismen der Domäne Archaea mit Hilfe des erstellten Q-PCR Protokolls.

(A) Optimierte Reaktionsbedingungen.

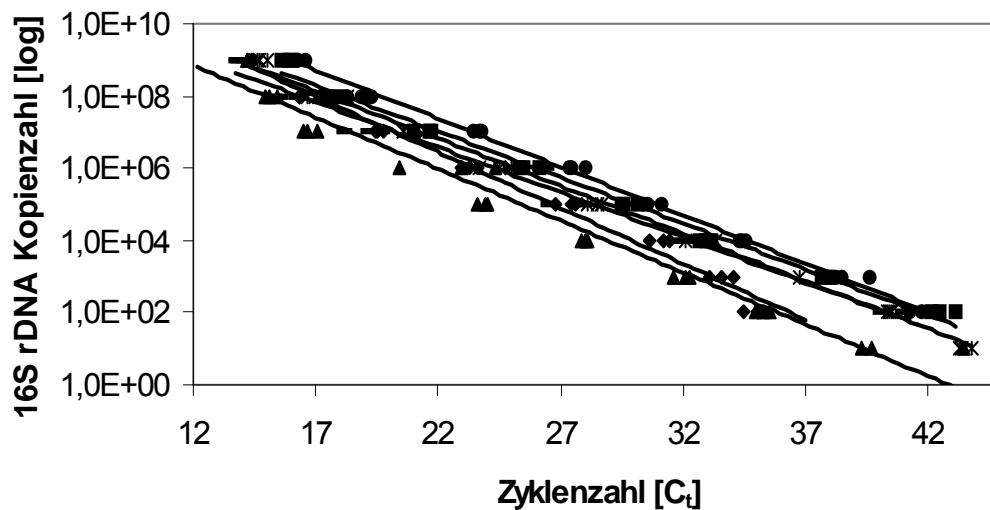
(B) Reaktionsbedingungen nach YU *et al.* (2005, 2006).

Die verwendeten Primer bzw. Sonden waren entsprechend YU *et al.* (2005). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen.

**Tabelle 18:** Protokolle zur Optimierung der Q-PCR für das (16S rDNA Assay).

ARC = Archaea, BAC = Bacteria, MBT = Methanobacteriales, MMB = Methanomicrobiales, Msc = Methanosarcinaceae, Mst = Methanosaetaceae.

Set-Name	Annealingschritt	Elongationsschritt	Zyklenzahl
ARC	-	60°C; 60 s	45
BAC	57°C; 30 s	60°C; 60 s	50
MBT	54°C; 30 s	60°C; 60 s	45
MMB	-	60°C; 60 s	45
Msc	50°C; 30 s	60°C; 60 s	45
Mst	50°C; 30 s	60°C; 60 s	50



**Bild 7:** Standardkurven für die quantitative Erfassung der 16S rDNA Kopienzahl für Organismen der Domänen Archaea (■) und Bacteria (◆), der Ordnungen Methanomicrobiales (●) und Methanobacteriales (▲) sowie der Familien Methanosarcinaceae (—) und Methanosaetaceae (\*).

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen.

Für die Einschätzung des optimalen Verlaufs einer Standardkurve werden der Wert der Steigung (*slope*) und der Wert des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) dieser herangezogen. Bei einer optimal entwickelten Standardkurve liegen die Werte für die Steigung zwischen -3,9 und -3,0; das Bestimmtheitsmaß sollte einen Wert von 0,95 nicht unterschreiten (ZHAN & FANG 2006).

In **Bild 7** sind alle Standardkurven, welche mit den optimierten PCR-Programmen (**Tabelle 18**) erzielt wurden, dargestellt. **Tabelle 19** zeigt die dazugehörigen Steigungs- und Bestimmtheitsmaßwerte.

Mit den optimierten Bedingungen für die *real-time* PCR konnten nun anwendungsbezogene Arbeiten anhand des 16S rDNA Assays durchgeführt werden (s. Versuchsteil B-3).

**Tabelle 19:** Steigungs- und Bestimmtheitsmaßangaben der Standardkurven (16S rDNA-Assay)

Die verwendeten Q-PCR-Assays bzw. Primersets wurden wie folgt benannt: ARC= Archaea, BAC= Bacteria, MBT= Methanobacteriales, MMB= Methanomicrobiales, Msc= Methanosarcinaceae, Mst= Methanosaeta-ceae.

*Slope* = Steigung der Standardkurve;  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß der Standardkurve; *intercept* = Zyklenzahl die notwendig ist, um eine 16S rDNA Kopie in der Probe nachweisen zu können.

Set-Name	Slope	Intercept	$R^2$
ARC	-3,89	49,34	0,991
BAC	-3,26	42,78	0,986
MBT	-3,38	42,28	0,968
MMB	-3,72	42,42	0,995
Msc	-3,93	47,9	0,983
Mst	-3,77	47,77	0,993

Das *mcrA* Gen ist im Gegensatz zum 16S rDNA Gen ein stoffwechselreguliertes Gen. Dies bedeutet, dass sich die Expression des *mcrA* Genes jeweils nach den Ausgangsbedingungen für die Methanogenese richtet. Herrscht z.B. ein Mangel an Substraten für die Methanogenese (Acetat, Wasserstoff bzw. Kohlendioxid), wirkt sich dieses direkt auf die Bildung des MCR-Proteinkomplexes aus. Ein konstitutiv exprimiertes Gen reagiert auf solche Veränderungen mit nur geringfügigen Veränderungen in der Expressionsintensität.

Durch eine relative Q-PCR unter Verwendung von mRNA (bzw. cDNA) könnte mit Hilfe eines *mcrA*-Assays die eigentliche Aktivität des Methanogeneseprozesses näher betrachtet werden.



Tabelle 20: Entwickelte gruppenspezifische Primersets zur Detektion des *mcrA* Gens.

Primernamen	Primersequenz (5' - 3')	Wobbele Anzahl	Fragmentlänge [bp]	Literatur
<b>Universal <i>mcrA</i> Primer</b>				
ME1	GCMAT GCARA THGGW ATGTC	4	778	Lüders et al. [2001]
ME2	TCATK GCRTA GTTDG GRTAG T	4		Lüders et al. [2001]
<b>Primer Set Methanomicrobiales</b>				
MicrfwV1	ACNAT GATGG ANGAC CACTT NG	3	191	diese Studie
MicrevV1	CCNCA CTGGT CCTGN AG	2		diese Studie
<b>Primer Set Methanobacteriales</b>				
MbaœrevV2	GTCGT AACCR TAGAA WCCNA	3	373	diese Studie
MbacfwV2	TACAT GTCWG GTGGT GTNG	2		diese Studie
<b>Primer Set Methanosarcinales</b>				
SarcSaetfwV2	CACTT CGGNG GNTCC CAGAG	2	165	diese Studie
SarcSaetrevV2	CTGCA GGTCG AANCC GAAGA A	1		diese Studie
<b>Primer Set Methanosarcinaceae</b>				
MBARK-FW	CTACC AGGGC GACGA AGGT	0	79	diese Studie
MBARK-REV	CTGGT GACCR ACGTT CATTG C	1		diese Studie
<b>Primer Set Methanosetaeaceae</b>				
SaetfV1	AGCTA CATGT CCGGN GGNGT	2	77	diese Studie
SaetrevV1	GAGAA GTCNT CCAGG ACNTC GTT	2		diese Studie

Für die Entwicklung eines geeigneten *mcrA-real-time* PCR Assays wurden zunächst gruppenspezifische Primerkombinationen mit Hilfe des Programms Primer Designer V2.2 entwickelt (**Tabelle 20**). Da die *mcrA*-Sequenzen im Gegensatz zu den 16S rDNA Sequenzen kaum konservierte Bereiche im Gen aufweisen, konnten hierfür keine gruppenspezifischen TaqMan-Sonden entwickelt werden.

Stattdessen wurde ein *real-time* PCR Assay entwickelt, welches auf der Grundlage des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green I beruht. Dieser ist universell einsetzbar und lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein. Durch das Anlagern des Farbstoffes kommt es im Verlauf der PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg, welcher dann gemessen werden kann.

Für die Ableitung gruppenspezifischer Primer wurden bereits bekannte Nukleotidsequenzen der *mcrA*-Fragmente der NCBI-GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] entnommen (**Tabelle 21, 22**). Ähnlich wie die gruppenspezifischen Primersets des von YU *et al.* (2005) entwickelten 16S rDNA Assays sollten auch auf *mcrA*-Ebene für die Ordnungen der Methanobacteriales, Methanosarcinales und Methanomicrobiales sowie für die Familien der Methanosarcinaceae und die der Methanosaetaceae Primersets entwickelt werden. Zudem sollte der von LUEDERS *et al.* (2001) entwickelte Universal-*mcrA*-Primer auf das *real-time* PCR System übertragen werden (vgl. Darstellung der Ergebnisse für Versuchsteil A-4).

**Tabelle 21:** *mcrA*-Sequenzen, welche für die Entwicklung der gruppenspezifischen Primersets verwendet wurden.

Alle Sequenzdaten wurden der NCBI GenBank [[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)] entnommen. Forts. in **Tabelle 22.**

<b>Art</b>	<b>Stammbezeichnung</b>	<b>verwendete Referenzsequenzen (NCBI)</b>
<i>Methanobacterium</i>		
<i>formicum</i>	DSM 1312, DSM 1535	AF414051, EF465108
<i>bryantii</i>	DSM 863	AF313806
<i>arrhusense</i>	H2-LR	AY386125
<i>thermaggregans</i>	DSM 3266	AY289750
<i>ivanovii</i>	DSM 2611	EF465107
<i>beijingense</i>	DSM 15999	EF465106
<i>Methanobrevibacter</i>		
<i>ruminantium</i>	DSM 1093	AF414046
<i>arboriphilus</i>	DSM 1125, DSM 7056	AF414035, AB300777
<i>oralis</i>	DSM 7256	DQ251045
<i>smithii</i>	DSM 861	DQ251046
<i>Methanosphaera</i>		
<i>stadtmanae</i>	DSM 3091	NC007681
<i>Methanothermobacter</i>		
<i>thermautotrophicus</i>	delta H	NC000916
<i>thermophilus</i>	DSM 6529	AY289752
<i>thermoflexus</i>	DSM 7268	AY303950
<i>wolfeii</i>	DSM 2970	AY289748
<i>Methanothermus</i>		
<i>sociabilis</i>	DSM 3496	AY289747
<i>Methanococcus</i>		
<i>maripaludis</i>	S2c	NC005791
<i>aelicus</i>	DSM 4304	AY354034
<i>voltae</i>	ps	MVMCR1
<i>Methanothermococcus</i>		
<i>thermolithotrophicus</i>	DSM 2095, JCM 10549	AF414048, AB353226
<i>okinawensis</i>	DSM 14208, IH-1	AY354033, AB353229
<i>Methanocaldococcus</i>		
<i>jannaschii</i>	DSM 2661	NC000909
<i>infernus</i>	DSM 11812, SL48, SL47	AY354035, AY354032, AY354031
<i>Methanotorris</i>		
<i>igneus</i>	DSM 5666, JCM 11834	AF414039, AB353228
<i>formicicus</i>	Mc-S-70	AB353227
<i>Methanomicrobium</i>		
<i>mobile</i>	DSM 1539	AF414044

**Tabelle 22:** *mcrA*-Sequenzen, welche für die Entwicklung der gruppenspezifischen Primersets verwendet wurden.

Alle Sequenzdaten wurden der NCBI GenBank [[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)] entnommen. Forts. von **Tabelle 21**.

Art	Stammbezeichnung	verwendete Referenzsequenzen (NCBI)
<i>Methanoculleus</i>		
<i>bourgensis</i>	DSM 3045, DSM 6216, DSM 2772	AF414036, AB300786, AB300785
<i>thermophilus</i>	DSM 2624, DSM 2373	AF313804, AB300783
<i>marisnigri</i>	JR-1	NC009051
<i>palmolei</i>	DSM 4273	AB300784
<i>chikugoensis</i>	DSM 13459	AB300779
<i>Methanofollis</i>		
<i>liminatans</i>	DSM 4140	AF414041
<i>Methanogenium</i>		
<i>organophilum</i>	DSM 3596	AB353222
<i>Methanocorpusculum</i>		
<i>parvum</i>	DSM 3823	AF414045
<i>aggregans</i>	DSM 3027	AF414034
<i>bavaricum</i>	DSM 4179	AF414049
<i>labreanum</i>	Z	NC008942
<i>Methanospirillum</i>		
<i>hungatei</i>	JF1, DSM 864	AF313805, AF414038
<i>Methanosarcina</i>		
<i>acetivorans</i>	C2A,	NC002097
<i>mazei</i>	Go1, DSM 2053, DSM 4556, DSM 9195	NC003901, AF414043, AB300782, AB300778
<i>barkeri</i>	fusaro	NC007355
<i>lacustris</i>	MM	AY260438
<i>thermophila</i>	DSM 1825	AB353225
<i>Methanococcoides</i>		
<i>burtonii</i>	DSM 6242	NC007955
<i>alaskense</i>	DSM 17273	AB353221
<i>Methanohalophilus</i>		
<i>mahii</i>	DSM 5219	AB353223
<i>Methanomethylovorans</i>		
<i>thermophila</i>	L2FAW	AY672820
<i>hollandica</i>	ZB	AY260437
<i>Methanosalsum</i>		
<i>zhilinae</i>	DSM 4017	AB353224
<i>Methanosaeta</i>		
<i>concilii</i>	DSM 3671, VeAc9	AF414037, AF313803
<i>harundinacea</i>	8Ac, 6Ac	AY970348
<i>thermophila</i>	PT	NC008553
<i>Methanopyrus</i>		
<i>kandleri</i>	AV19, DSM 6324	NC003551, AF414042

Die Q-PCR-Assays mit den entwickelten Primersets wurden zuerst mit linearisierten Plasmiden (pGEM-T Vektor + spezifisches *mcrA*-Fragment) der Arten *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosaeta concilii* und *Methanobacterium formicicum* durchgeführt. In **Tabelle 24** sind die ermittelten Werte zur Einschätzung der Standardkurve (Bestimmtheitsmaß, *slope* und *intercept*) für die optimierten Q-PCR-Reaktionsbedingungen (**Tabelle 23**) dargestellt.

Es zeigte sich, dass alle gruppenspezifischen Primersets nur mit solchen Plasmid-Templates in Reaktion traten, welche die entsprechenden *mcrA*-Fragmente beinhalteten. Alle entwickelten Primersets erwiesen sich als spezifisch für die jeweiligen Zielgene.

So amplifizierte z.B. das Primerset Mst<sub>*mcrA*</sub> ein Produkt nur mit dem Plasmid, in welches das *mcrA*-Fragment von *Methanosaeta concilii* kloniert wurde. Mit den drei weiteren Plasmiden (mit *mcrA*-Fragment von *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina barkeri* und *Methanobacterium formicicum*) konnte keine Produktbildung während der Q-PCR beobachtet werden. Es traten also keine Kreuzamplifikationen des Mst<sub>*mcrA*</sub>-Primersets mit den unspezifischen linearisierten Plasmiden auf.

**Tabelle 23:** Optimierte Protokolle für die *mcrA*-Q-PCR-Assays.

Die eingesetzten Primersets wurden wie folgt benannt: Uni = Universal *mcrA* Primerset (LUEDERS *et al.* 2001), MSL = Methanosarcinales-Set, MBT = Methanobacteriales-Set, MMB = Methanomicrobiales-Set, Msc = Methanosarcinaceae-Set, Mst = Methanosaetaceae-Set.

Set-Name	Annealingschritt	Elongationsschritt	Zyklenzahl
Uni ( <i>mcrA</i> )	53°C, 30 s	60°C; 60 s	50
MSL ( <i>mcrA</i> )	56°C, 30 s	60°C; 60 s	45
MBT ( <i>mcrA</i> )	53°C, 30 s	60°C; 60 s	45
MMB ( <i>mcrA</i> )	55°C, 30 s	60°C; 60 s	45
Msc ( <i>mcrA</i> )	-	60°C; 60 s	45
Mst ( <i>mcrA</i> )	-	60°C; 60 s	45

**Tabelle 24:** Steigungs- und Bestimmtheitsmaß für die Standardkurven (*mcrA* Assay).

Die eingesetzten Primersets wurden wie folgt benannt: Uni = Universal *mcrA* Primerset (LUEDERS *et al.* 2001), MSL = Methanosarcinales-Set, MBT = Methanobacteriales-Set, MMB = Methanomicrobiales-Set, Msc = Methanosarcinaceae-Set, Mst = Methanosaetaceae-Set.

*Slope* = Steigung der Standardkurve;  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß der Standardkurve; *intercept* = Zyklenzahl die notwendig ist, um eine 16S rDNA Kopie in der Probe nachweisen zu können.

Set-Name	Slope	Intercept	$R^2$
Uni ( <i>mcrA</i> )	-3,31 bis -3,91	43,37 bis 52,85	0,972 bis 0,979
MSL ( <i>mcrA</i> )	-3,52	40,05 bis 41,68	0,970 bis 0,988
MBT ( <i>mcrA</i> )	-3,72	47,11	0,979
MMB ( <i>mcrA</i> )	-3,89	46,14	0,985
Msc ( <i>mcrA</i> )	-3,22	41,68	0,978
Mst ( <i>mcrA</i> )	-3,78	42,82	0,983

Um allerdings eine bessere Absicherung des *mcrA* Assays zu erreichen, müssen weitere methanogene Archaea-Arten auf die spezifischen Primersets getestet werden. Zur Zeit werden am ATB hierzu weitere Standards unter Verwendung der *mcrA*-Sequenzen von *Methanococcus vannielii*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanothermobacter thermotrophicus*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina mazei*, *Methanofollis liminatans* und *Methanosaeta thermophila* entwickelt.

### B-3 Anwendung des 16S rDNA Assays an Labor- und Praxisanlagen ('Praxistest')

Nachdem das Protokoll für die einzelnen, gruppenspezifischen Primersets von Yu *et al.* (2005) für die verwendete *real-time* PCR-Plattform optimiert wurde (vgl. Kap. II.1.B-2), erfolgte nun die Anwendung der 16S rDNA Assays für Proben aus ausgewählten Labor- und Praxisanlagen.

Zunächst wurden die Q-PCR-Assays zur Analyse der in Kap. II.1.A-1 vorgestellten Praxis-Biogasanlagen verwendet. In dieser Analyse wurde für jede Biogasanlage gruppenspezifisch die 16S rDNA Kopienanzahl ermittelt, welche in einem Nanogramm genomischer DNA vorhanden war. Die prozentualen Werte bezogen auf die ermittelte Summe aller 16S rDNA Kopien sind in **Tabelle 25** dargestellt.

Hierbei zeigte sich, dass in allen Praxis-Biogasanlagen, mit Ausnahme der Biogasanlage 10, die Kopienzahl für Vertreter der Methanomicrobiales am höchsten war. Methanobacteriales waren nur in BA7 in nennenswertem Umfang vertreten. Methanosarcinaceae wurden in allen Biogasanlagen nur vereinzelt detektiert. Vertreter der Methanosaetaceae

konnten in sechs der Biogasanlagen nachgewiesen werden, wobei die höchsten Anteile in BA2 und BA10 gefunden wurden. Diese Ergebnisse bestätigen das Bild der PCR-RFLP *fingerprint* Analyse, in welcher *Methanoculleus*, der zur Ordnung der Methanomicrobiales zählt, als dominante Art in allen Praxisbiogasanlagen detektiert werden konnte (vgl. Kap. II.1.A-3).

**Tabelle 25:** Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Kopienzahl für die Ordnungen Methanomicrobiales und Methanobacteriales bzw. für die Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae. Die Bestimmung erfolgte auf Basis von 1 ng genomischer DNA.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
<b>Methano- microbiales</b>	99%	61%	84%	85%	99%	85%	83%	97%	97%	97%	24%
<b>Methano- bacteriales</b>	< 1%	2%	1%	3%	< 1%	3%	17%	< 1%	< 1%	2%	3%
<b>Methano- sarcinaceae</b>	< 1%	< 1%	< 1%	-	-	-	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
<b>Methano- saetaceae</b>	-	36%	14%	12%	-	12%	-	2%	2%	-	73%

Neben der Analyse der gruppenspezifischen Primersets der Methanogenen wurde weiterhin eine Analyse der Gesamtkopienzahl des 16S rDNA Gens für Archaea bzw. Bacteria durchgeführt. In **Tabelle 26** ist das prozentuale Verhältnis der Anzahl detektierter 16S rDNA-Kopien der Domäne Archaea zur Domäne Bacteria dargestellt. Dabei wurden Werte zwischen 2,6% (Biogasanlage BA7) und 32,7% (Biogasanlage BA8-FR) erreicht. Im Durchschnitt wurde ein Verhältnis Archaea 16S rDNA zu Bacteria 16S rDNA von 1:10 gefunden. Interessanterweise konnte in der einzigen untersuchten zweistufigen Biogasanlage die höchste Archaea-Anreicherung gegenüber den Bacteria ermittelt werden. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass in diesem System die Archaea besser angereichert werden als bei einer normalen einstufigen Reaktorfahrweise. Um diese These zu verifizieren müssten allerdings weitere Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt werden.

**Tabelle 26:** Prozentuales Verhältnis der ermittelten Werte für die 16S rDNA-Kopienzahl für Vertreter der Domäne Archaea in Relation zu der Kopienzahl für Vertreter der Domäne Bacteria. ARC = Anzahl 16S rDNA-Kopien für Archaea; BAC = Anzahl 16S rDNA-Kopien für Bacteria.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
<b>ARC/BAC</b>	10,1%	7,9%	10,5%	5,5%	3,2%	5,5%	2,6%	27,5%	32,7%	7,2%	7,8%

Vertreter der Familie Methanosaetaceae bilden Methan ausschließlich über das Stoffwechselfausgangsprodukt Acetat, wohingegen die Familie der Methanosarcinaceae sowohl hydrogenotrophe als auch acetoklastische Methanbildner aufweist. Zudem wurde für *Methanosarcina* die Abhängigkeit der Methanogenese (hydrogenotroph vs. acetoklastisch) von der apparenten Acetatkonzentration nachgewiesen. Zur Vereinfachung wurden aber alle 16S rDNA Kopienzahlen für die Familien Methanosaetaceae und Methanosarcinaceae zusammengefasst und als acetoklastische Methanbildner gewertet (**Tabelle 27**). Alle ermittelten Werte für die 16S rDNA Kopien der Ordnungen Methanomicrobiales und Methanobacteriales wurden als Wert für die Gruppe der hydrogenotrophen Methanbildner zusammengefasst. Die resultierende prozentuale Verteilung ist in **Tabelle 27** dargestellt.

**Tabelle 27:** Prozentuale Verteilung der 16S rDNA-Kopienzahl auf hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene.

Die Bestimmung erfolgte auf Basis von 1 ng genomischer DNA. *Methanosarcina* wurde als acetoklastischer Methanbildner gewertet.

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8- AF	BA8- FR	BA9	BA10
hydrogenotroph	99%	63%	86%	88%	100%	88%	99%	98%	98%	99%	27%
acetoklastisch	< 1%	37%	14%	12%	-	12%	< 1%	2%	2%	< 1%	73%

Grundsätzlich fällt auf, dass in allen Biogasanlagen mit Ausnahme von BA2 und BA10 hydrogenotrophe Methanogene die Mehrheit unter den methanogenen Archaea stellen. 86% bis 100% aller detektierten 16S rDNA Kopien waren dieser Gruppe zuzuordnen. Eine Dominanz der Acetat-verwertenden Archaea konnte nur in Biogasanlage 10 (73% der 16S rDNA Kopien) nachgewiesen werden.

Werden die ermittelten 16S rDNA Kopien in ihrer Gesamtheit in allen Praxisbiogasanlagen miteinander verglichen, so kann eine Abhängigkeit der Zusammensetzung der methanogenen Archaea vom eingesetzten Wirtschaftssubstrat und dem Anteil bzw. der Zusammensetzung an nachwachsenden Rohstoffen nicht beobachtet werden, da in allen Praxisbiogasanlagen, mit Ausnahme der Biogasanlage 10, die Gruppe der hydrogenotrophen Methanbildner vorherrschend ist. Die Gründe für den hohen Anteil an methanogenen Acetatverwertern in Biogasanlage 10 müssen daher in den Eigenschaften der Prozessparameter gesucht werden. Ein Faktor könnte die verhältnismäßig geringe Gesamt-Ammoniumkonzentration von  $1,7 \text{ kg t}^{-1}$  bei einem pH Wert von 7,4 sein, welche zu einer optimalen Entwicklung von Mikroorganismen der Gattung *Methanosaeta* beiträgt (vgl. Kap. II.1.A-3).

Neben der quantitativen Analyse der zehn Praxisbiogasanlagen wurde das 16S rDNA Assay ebenfalls zur versuchsbegleitenden Analyse von Biogasfermentationen im Labormaß-



stab angewandt. Die Ergebnisse wurden u.a. zur Anfertigung einer Diplomarbeit zum Thema „Charakterisierung der Populationsstruktur der methanogenen Archaea während einer Biogas-Fermentation mittels gruppenspezifischer *real-time* PCR“ genutzt. Weitere Analysen wurden im Rahmen des FNR-Projektes 22018306 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im entsprechenden Abschlußbericht ausführlich dargestellt.

### Teil C: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erlaubt die Detektion und quantitative Analyse von Mikroorganismen direkt in einer Umweltprobe, also *in situ*. Die rRNA ist ein geeignetes Zielmolekül zur Detektion von Mikroorganismen, da sie (1) ubiquitär vorhanden ist, (2) sowohl konservierte als auch variable Sequenzregionen besitzt und (3) in hoher Kopienzahl vorliegt. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in ihrer jetzigen Form wurde erstmals von DELONG *et al.* (1989) vorgestellt. Hierbei werden fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden eingesetzt, welche in die Zelle eingeschleust werden und unter bestimmten Bedingungen mit der 16S rRNA hybridisieren (AMANN *et al.* 1995). Je nach Konservierungsgrad der FISH-Sonden können verschiedene phylogenetische Gruppen gezielt detektiert werden (z.B. Domänen, Familien, Gattungen oder auch Spezies). Mittlerweile stehen Hunderte von rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden für die *in situ* Analyse von Mikroorganismen zur Verfügung. Eine der wichtigsten Plattformen für die Suche nach geeigneten Sonden ist probeBase [<http://www.microbial-ecology.net/probebase>], die auch Informationen über die Hybridisierungsbedingungen bietet (LOY *et al.* 2003).

Unter idealen Bedingungen können positive FISH Signale von Mikroorganismen in einer Umweltprobe zur Identifikation und Quantifizierung der Organismen in einem System genutzt werden. Das Fehlen von FISH Signalen bedeutet jedoch nicht, dass der Zielorganismus nicht in der Umweltprobe vorhanden ist. Es gibt vielmehr verschiedene Einschränkungen der Methode, die zu beachten sind (HUGENHOLTZ *et al.* 2001, AMANN *et al.* 2001, PERNTHALER *et al.* 2002, KARAKASHEV *et al.* 2005):

- (1) In der Umweltprobe muss eine Zellzahl von über  $10^3$ - $10^4$  Zellen pro Milliliter Probe vorliegen.
- (2) Die Zellwand der Mikroorganismen muss permeable für die FISH-Sonden sein. Dies kann durch eine Fixierung mit Formaldehyd bzw. Paraformaldehyd für Gram-negative oder durch Ethanol für Gram-positive Mikroorganismen unterstützt werden.
- (3) Die rRNA-Konzentration in den Zellen muss ausreichend sein. Schon einige tausend rRNA-Moleküle reichen für ein positives FISH Signal aus. Mikroorganismen mit einer geringen physiologischen Aktivität besitzen jedoch meist eine für die FISH nicht ausreichende rRNA-Konzentration.

Im Rahmen dieses Projektes wurden folgende Arbeiten ausgeführt:

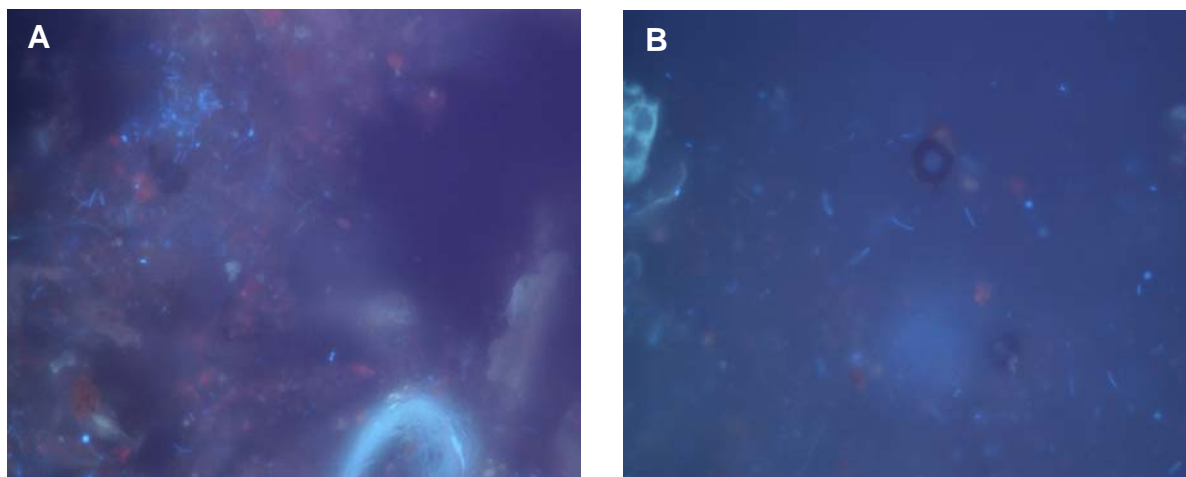
*Probenfixierung:* Die Proben der zehn ausgewählten Biogasanlagen wurden in Formaldehyd fixiert, um die Permeabilität der Zellen für die FISH-Sonden zu erhöhen. Hierzu wur-

den 500 µl je frische bzw. kurzfristig in Ethanol (1:1 mit 96% Ethanol vermischt) bei -20°C gelagerte Reaktorprobe zunächst in 1x PBS Puffer (pH 7,3) gewaschen und bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Fixierung in 3,7% Formaldehyd für mindestens 4 Stunden bei 4°C. Nach der Fixierung wurden mehrere Waschschrte mit 1x PBS Puffer (pH 7,3) durchgeführt. Für die Lagerung bei -20°C wurden die Proben in 1x PBS-Ethanol (im Verhältnis 1:1) aufgenommen.

*Optimierung der Protokolle für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH):* Obwohl FISH schon erfolgreich für die quantitative Analyse von verschiedensten Umweltproben eingesetzt wurde, ist sie nicht für jede Art von Probe geeignet. Besonders bei Proben, die abiotische, autofluoreszierende oder Sonden absorbierende Materialien enthalten, kann die fluoreszenz-basierende Detektion problematisch sein (HUGENHOLTZ *et al.* 2002, AMANN *et al.* 2001, PERNTHALER *et al.* 2002, KARAKASHEV *et al.* 2005). Die Proben aus Biogasreaktoren enthalten einen hohen Anteil an Pflanzenfasern, der eine sehr starke Autofluoreszenz bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hervorruft. Ein weiteres Problem bei der Quantifizierung methanogener Archaea mittels FISH, stellt die Bildung von Zellaggregaten dar. Durch die Produktion von extrazellulären polymersichen Substanzen (EPS) sind Mikroorganismen befähigt untereinander bzw. an Substanzen wie Pflanzenfasern oder Bodenpartikeln fest anzuhafte (BÖCKELMANN *et al.* 2003, VEIGA *et al.* 1997). Die EPS setzten sich aus extrazellulären Polysacchariden, wie u.a. Galactose, Glucose und Mannose aber auch aus Polypeptiden zusammen (VEIGA *et al.* 1997). Durch diese Adhäsion der Mikroorganismen wird die Quantifizierung mittels FISH erheblich erschwert. Einige Gattungen der methanogenen Archaea bilden mehr oder weniger große Zellaggregate aus. Ein Beispiel hierfür ist die Gattung *Methanosarcina*, welche Aggregate mit einem Durchmesser bis zu 1000 µm bilden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Versuche zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz und zur Trennung der Mikroorganismen untereinander und von den Pflanzenfasern durchgeführt:

(1) *Trennung der Mikroorganismen von Pflanzenfasern mittels Zentrifugation:* Hierzu wurden analog zur Probenaufbereitung für die DNA-Extraktion 15 ml gepoolte Reaktorprobe bei 200 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3500 x g für 45 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 15 ml 1x PBS Puffer (pH 7,3) resuspendiert. Dieser Waschschrte wurde mehrmals durchgeführt. Anschließend erfolgte dann die Fixierung wie oben beschrieben.

Bei der mikroskopischen Kontrolle (Optiphot-2, Nikon) mittels Autofluoreszenznachweis ( $\lambda = 420$  nm) der einzelnen Schritte dieser Aufreinigungsmethode zeigte sich, dass ein sehr hoher Anteil der Mikroorganismen an den Pflanzenfasern, die im ersten Zentrifugalschrte aus der Probe entfernt wurden, haften geblieben waren (**Bild 8**).



**Bild 8:** Mikroskopische Kontrolle der Aufreinigungsschritte für die FISH bei Verwendung des Protokolls 1 mittels Autofluoreszenz.

(A) Resuspendiertes Pellet nach Zentrifugation bei 200x g.

(B) Überstand nach der Zentrifugation und mehreren Waschschritten.

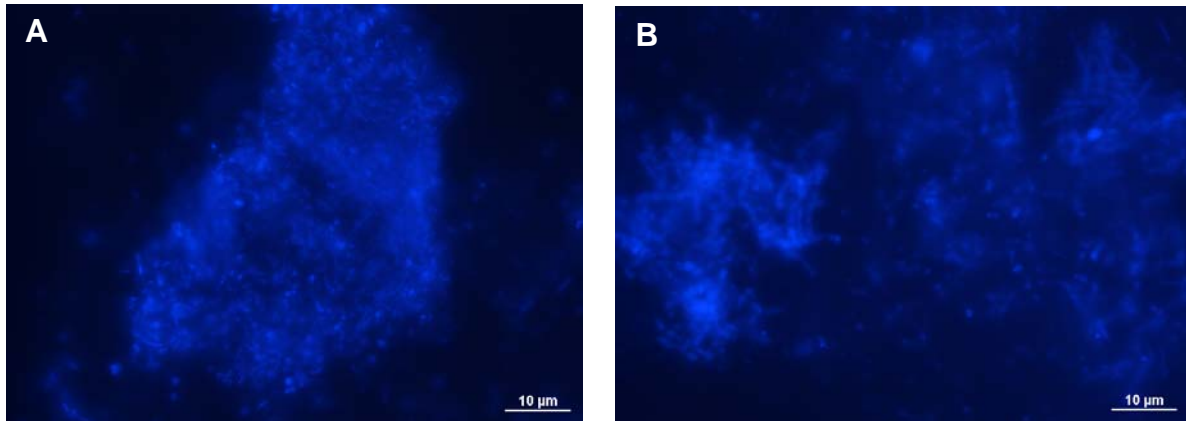
Die Vergrößerung war jeweils 400x.

- (2) *Trennung der Mikroorganismen von Pflanzenfasern mittels Ultraschall:* Für die Ablösung der Mikroorganismen von den Pflanzenfasern wurde eine Methode modifiziert nach PIKE *et al.* (1972) verwendet. Mittels Ultraschall sollten die Mikroorganismen von den Pflanzenfasern abgetrennt werden. Für diese Versuchreihe wurden 100 µl fixierte Proben mit 500 µl 1x PBS Puffer (pH 7,3) vermischt und bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1000 µl 1x PBS Puffer (pH 7,3) aufgenommen. Für die Durchführung wurde eine Sonifizierung (Sonoplus GW2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) von 10 s mit der Pulsstufe 1 bei verschiedenen Intensitäten (84%, 50% und 30%) gewählt.

Die mikroskopische Kontrolle zeigte, dass nach der Sonifizierung ebenso viele Mikroorganismen weiterhin an den Pflanzenfasern hafteten, wie es bei Proben ohne Ultraschallbehandlung der Fall war (**Bild 9**).

- (3) *Enzymatischer Abbau der Pflanzenfasern:* Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der FISH war der enzymatische Abbau der Pflanzenfasern. Zunächst wurden 100 µl fixiertes Reaktormaterial mit 500 µl 1x PBS (pH 7,3) vermischt und bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 1x PBS (pH 7,3) resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 50, 100 oder 500 U Enzymmix bestehend aus Cellulase, Xylanase, Pektinase und Laccase. Der Ansatz wurde für 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende zehnersekündige Sonifizierung wurde bei der Pulsstufe 1 mit Intensitäten von 84%, 50% oder 30% durchgeführt. Anschließend wurden 10 µl der jeweiligen Probe mit DAPI angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Behandlung mit Enzymen keinen bzw. nur schwachen Abbau der Pflanzenfasern bewirkte. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in

der Akkumulation von Zuckern in dem Ansatz, wodurch eine Produkthemmung der Enzyme stattfindet. Dieser Optimierungsansatz wurde daher nicht weiterverfolgt.



**Bild 9:** Mikroskopische Kontrolle der Optimierungsversuche für die FISH bei Verwendung des Protokolls 2.

(A) Probe (BA9) vor der Sonifizierung.

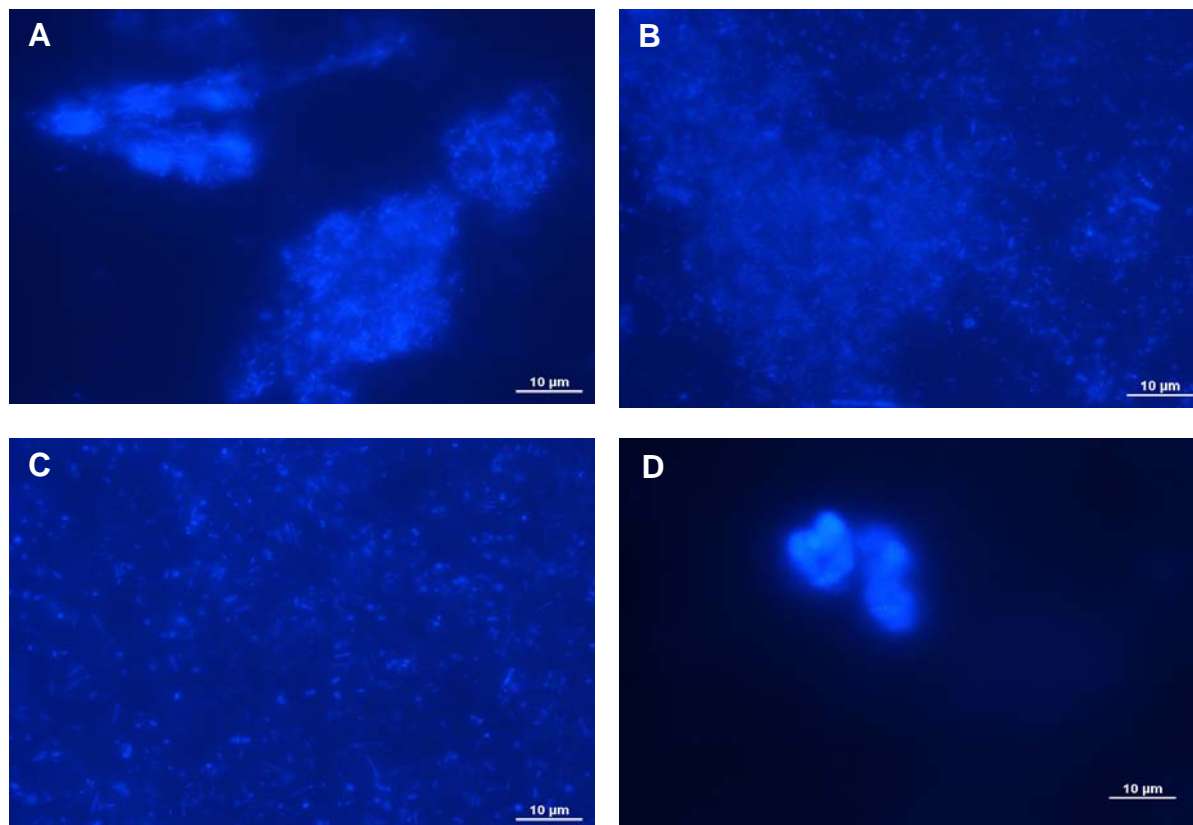
(B) Probe (BA9) nach der Sonifizierung (10 s, Pulsstufe 1, ca. 35W).

Beide Proben wurden mit DAPI angefärbt. Die Vergrößerung war jeweils 400x.

- (4) *Zerstörung der EPS mittels Enzymen und Ultraschall:* Durch eine Kombination von EPS-abbauenden Enzymen und einer nachfolgenden Behandlung mit Ultraschall sollte eine Ablösung der Mikroorganismen von Pflanzenfasern und die Auftrennung von Zellaggregaten bewirkt werden. In der Analyse von Bodenmikroorganismen wurde diese Methode bereits erfolgreich eingesetzt (BÖCKELMANN *et al.* 2003). Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen eines Enzymmixes bestehend aus  $\beta$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Glucosidase und Lipase bei verschiedenen Sonifizierungsintensitäten getestet. Folgendes optimierte Protokoll wurde umgesetzt: 100  $\mu$ l fixiertes Reaktormaterial wird mit 500  $\mu$ l 1x PBS (pH 7,3) vermischt und bei 15000  $\times g$  für 5 min zentrifugiert. Für die Enzymbehandlung wurden 30  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 2 U  $\beta$ -Galactosidase, 2 U  $\alpha$ -Glucosidase und 10 U Lipase zu dem Pellet pipettiert und mit 1x PBS Puffer (pH 5,7) auf 500  $\mu$ l aufgefüllt. Die Inkubation wurde bei 30°C und 1000 rpm für 60 min im Thermomixer (Comfort, Eppendorf) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 2 min auf Eis gestellt (Reaktionsstop). Vor der Sonifizierung wurde das Probenvolumen auf 1 ml mit 1x PBS (pH 5,7) erhöht. Die Proben wurden zweimal für 30 s bei der Pulsstufe 1 und 50% Leistung (ca. 35 W) auf Eis sonifiziert. Für jede Probe wurde eine Verdünnungsreihe (100x, 500x und 1000x Endverdünnung) hergestellt. Diese wurden mittels DAPI-Färbung unter dem Mikroskop auf ihre Eignung für die FISH überprüft.

Die Kombination von Enzym- und Ultraschallbehandlung zur Optimierung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erwies sich als sehr geeignet. Durch diesen Ansatz

wurde die Mehrheit der Mikroorganismen von den Pflanzenfasern gelöst. Ferner konnte bei vielen Aggregat bildenden Mikroorganismen eine Auftrennung bewirkt werden (**Bild 10**). Leider war es im Rahmen des Projektes aus Zeitgründen nicht möglich diese Methode soweit zu optimieren um auch Organismen wie *Methanosarcina* sp. erfolgreich von Pflanzenfasern ablösen und deren Zellaggregate in Einzelzellen auflösen zu können (**Bild 10D**).



**Bild 10:** Mikroskopische Kontrolle der Optimierungsversuche für die FISH bei Verwendung des Protokolls 4:

(A) Probe BA10 vor der Sonifizierung.

(B) Probe BA9 nach der Sonifizierung.

(C) Probe BA10 nach 60 min Inkubation mit Enzymmix (siehe Protokoll 4) und nach 2x 30 s Sonifizierung bei Pulsstufe 1 und 50% Leistung (ca. 35 W)

(D) Probe BA9 - Zellaggregat von *Methanosarcina* sp. nach 60 min Inkubation mit Enzymmix (siehe Protokoll 4) und nach 2x 30 s Sonifizierung bei Pulsstufe 1 und 50% Leistung (ca. 35 W).

Die Proben wurden mit DAPI angefärbt.

In **Tabelle 28** werden die verwendeten Oligonukleotidsonden für die FISH aufgeführt. Neben den Zielorganismen werden auch die Stringenzen und der jeweilige Literaturverweis angegeben. Die FISH-Sonden waren mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 am 5'-Ende mar-

kiert. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde der Nukleinsäurebindende Fluoreszenz-Farbstoff DAPI verwendet (**Tabelle 29**).

**Tabelle 28:** In dieser Studie verwendete FISH-Sonden.

Oligonukleotidsonde	probeBase Nr	Zielorganismus(men)	Stringenz (% Formamid)	Referenz
EUB338	pB-00159	Bacteria	-	AMANN <i>et al.</i> 1990
ARCH915	pB-00027	Archaea	-	STAHL <i>et al.</i> 1991
UNIV1389c	pB-00430	Archaea	-	LOY <i>et al.</i> 2002
MX825	pB-00232	<i>Methanosaeta</i> sp.	50%	RASKIN <i>et al.</i> 1994; CROCKETTI <i>et al.</i> 2006
MS821	pB-01145	<i>Methanosarcina</i> sp.	40%	RASKIN <i>et al.</i> 1994
MG1200	pB-00210	<i>Methanomicrobium</i> sp., <i>Methanoculleus</i> sp., <i>Methanogenium</i> sp., <i>Methanospirillum</i> sp., <i>Methanocorpusculum</i> sp., <i>Methanoplanus</i> sp.	20%	RASKIN <i>et al.</i> 1994
MB310	pB-00203	<i>Methanobacterium</i> sp., <i>Methanobrevibacter</i> sp., <i>Methanospaera</i> sp., <i>Methanothermobacter</i> sp. *	30%**	RASKIN <i>et al.</i> 1994
MC1109	pB-00206	Methanococcaceae	20%	RASKIN <i>et al.</i> 1994

\* Reinkulturen von *Methanothermobacter thermautotrophicus* konnten mit der Sonde MB310 erfolgreich markiert werden.

\*\* nach CROCKETTI *et al.* (2006)

**Tabelle 29:** In dieser Studie verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe und Filtersysteme.

Farbstoff	Kurzform	Anregung	Filter-system	Exciter	Emitter	Strahlen-teiler
4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	<b>DAPI</b>	365 nm	DAPI AMCA	D350/50	D460/50	400 dclp
1-(e-carboxypentynyl)-1'-ethyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-5,5'-disulfonat	<b>Cy3</b>	535-550 nm	HQ: Cy3	HQ545/30	HQ610/75	Q570 lp

Die Hybridisierungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Probenfixierung und -aufbereitung erfolgten nach Protokoll 4. Nach der Enzymbehandlung und der Sonifizierung wurde für jede Probe eine Verdünnungsreihe erstellt (100x, 500x und 1000x) um die optimale Verdünnung der Probe für die FISH festzustellen. Dazu wurden die verschiedenen Verdünnungen auf einen Objektträger aufgetragen, mit DAPI angefärbt und mikroskopisch kontrolliert. Mit der optimalen Verdünnung wurde dann die FISH durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurden teflonbeschichtete Objektträger mit 10 Kammern verwendet. Jede Kammer wurde mit 10 µl Gelatine/CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> beschichtet und im Hybridisierungssofen getrocknet. 10 µl Probe wurden in eine Kammer des Objektträgers aufgetragen, zur Dehydrierung jeweils für 3 min in 50%, 80% und 96% Ethanol getaucht und anschließend getrocknet. Es folgte die Präparation mit 10 µl Hybridisierungspuffer, der eine für die jeweilige FISH-Sonde spezifische Stringenz besaß (**Tabelle 28** und **30**). Jeweils 1 µl FISH-Sonde (50 ng µl<sup>-1</sup>) wurde zu der Hybridisierungspuffer gegeben. Anschließend wurde der Objektträger in eine Hybridisierungskammer bestehend aus einem verschließbaren 50 ml Reagenzröhrchen und einem in Hybridisierungspuffer getränktem Stück Zellstoff überführt. Die Hybridisierung erfolgte bei 46°C für zwei Stunden im Hybridisierungssofen. Nachfolgend wurden die Objektträger in dem jeweiligen Waschpuffer (**Tabelle 28** und **31**) für 15 min bei 48°C inkubiert und anschließend für ca. 3 s in eiskaltem Reinstwasser abgeschreckt und getrocknet. Bis zur mikroskopischen Quantifizierung der Mikroorganismen wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

**Tabelle 30:** Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers.

Die Stringenz ist in % Formamid angegeben und richtet sich nach der verwendeten Oligonukleotidsonde (s. **Tabelle 28**). Alle Angaben in µl.

	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%
<b>5 M NaCl</b>	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
<b>1 M Tris/HCl</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>Denhardt Reagenz [50x]</b>	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	599	549	499	449	399	349	299	249	199	149	99
<b>FA</b>	-	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
<b>10% SDS</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Tabelle 31:** Zusammensetzung des Waschpuffers.

Die Stringenz richtet sich nach den in **Tabelle 30** angegebenen % Formamid sowie nach der verwendeten Oligonukleotidsonde (s. **Tabelle 28**). Alle Angaben in µl.

	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%
<b>5 M NaCl</b>	9,00	6,30	4,50	3,18	2,15	1,49	1,02	0,70	0,46	0,30	0,18
<b>1 M Tris/HCl</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>0,5 M EDTA</b>	-	-	-	-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml	auf 50 ml

Erste FISH-Analysen mit sechs der Reaktorproben zeichneten sich durch eine starke Hintergrundfluoreszenz aus. Die Hintergrundfluoreszenz führt zur Abschwächung des eigentlichen Sonden-Signals und verhinderte so eine realistische Quantifizierung der methano-



genen Mikroflora in den Proben. Vor allem in der Trennung von Zellaggregaten der Gattung *Methanosarcina* und in der Verringerung der Hintergrundfluoreszenz besteht weiterhin ein großer Optimierungsbedarf für diese Methode. Zu dem gegenwärtigen Zeitpunkt werden weitere Arbeiten zur Optimierung der Methode sowie zur Analyse der methanogenen Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen umgesetzt.

## Zusammenfassung und Bewertung der Analyseergebnisse der methanogenen Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen

Im Rahmen dieses Projektes wurden die methanbildenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften von zehn ausgewählten Praxis-Biogasanlagen, welche auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen betrieben werden, unter Verwendung molekulargenetischer Verfahren analysiert.

Eine qualitative Analyse der Struktur der methanogenen Archaea-Biozönose erfolgte anhand der Erstellung von Klonbibliotheken für die 16S rDNA und *mcrA* Gene. Die Diversität der Sequenzen innerhalb der Klonbibliotheken wurde mittels PCR-RFLP-Screening und nachfolgender Bestimmung der Nukleotidsequenzen für individuelle PCR-RFLP-Muster analysiert.

Die quantitative Erfassung vorherrschender Gruppen methanogener Archaea erfolgte auf drei Wegen: (1) Die Auswertung der Häufigkeiten von Gensequenzen in den Klonbibliotheken ermittelt durch die Häufigkeit der entsprechenden PCR-RFLP-Muster, (2) die Durchführung von Q-PCR-Analysen auf Basis gruppenspezifischer Primer für das 16S rDNA Gen (Yu *et al.* 2005) bzw. für das *mcrA* Gen sowie (3) die Nutzung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden für gruppenspezifische Bereiche der 16S rDNA (FISH) zur mikroskopischen Quantifizierung.

Über Kooperationen mit weiteren, durch FNR/BMELV geförderten Projekten wurden wesentliche Prozessparameter zum Betrieb der Biogasanlagen ermittelt und in Relation zu der ermittelten Struktur der mikrobiellen Biozönosen gesetzt. Hierzu zählen chemische Analysen der Reaktorinhalte, die Erfassung der Verweilzeiten und Mengen der eingesetzten Substrate, die Bestimmung der Raumbelastungen sowie die Methanproduktivität der Reaktoren.

Die Ergebnisse aller Analysen zeigten, dass in nahezu allen untersuchten Biogasanlagen hydrogenotrophe Methanogene vorherrschend waren. Nahezu ausschließlich wurden Vertreter der Ordnungen Methanomicrobiales und Methanobacteriales gefunden, wobei in der überwiegenden Zahl der Anlagen Vertreter der Ordnung Methanomicrobiales dominierend waren.

Nennenswerte Anteile an acetoklastischen Methanbildnern insbesondere der Gattung *Methanosaeta* konnten für sechs der untersuchten zehn Anlagen nachgewiesen werden. Je nach verwendeter Methode wurden Anteile zwischen 1% bis 40% (Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken) und 2% bis 73% (Q-PCR-Assay) ermittelt.

Einen Zusammenhang zwischen der Archaea-Biozönose und der jeweils zur Biogasgewinnung eingesetzten Substrate konnte nicht festgestellt werden. Es wurden Übereinstimmungen in der Diversität zwischen Anlagen mit ähnlicher (z.B. zwischen BA2 und BA10) wie auch zwischen Anlagen mit unterschiedlicher Substratkonzentration und

-kombination (z.B. bei BA3 und BA4) festgestellt. Andererseits wurden größere Unterschiede in der Struktur der Archaea-Biozönose bei Anlagen mit ähnlicher Substratmischung (z.B. BA1 und BA3) gefunden.

Der Vergleich von Biogasanlagen, die mit unterschiedlichen Gülle-Arten (Schweine- oder Rindergülle) betrieben werden, ergab ebenfalls keinen Einfluss der Art der eingesetzten Gülle auf die Struktur der methanogenen Lebensgemeinschaft. Ebenso scheinen unterschiedliche Verweilzeiten der Substrate (diese Studie: 28 - 108 d) sowie die Raumbelastung der Reaktoren (diese Studie:  $2,1 - 5,8 \text{ Nm}_{\text{CH}_4}^3 \text{ m}_{\text{AV}}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) keinen Einfluss auf die methanogenen Archaea zu haben. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer Studie von KARAKASHEV *et al.* (2005), in welcher die methanogene Biozönose von verschiedenen Biogasanlagen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung analysiert wurden.

Dagegen scheinen bestimmte chemische Parameter wie die Ammonium/Ammoniak- und Acetatkonzentration die Struktur der Archaea-Population wesentlich stärker zu beeinflussen. Ein negativer Einfluss der Ammonium/Ammoniak Konzentration wurde zuvor bereits von ANGELIDAKI & AHRING (1993) in einer Studie über thermophile Biogasfermentationen beobachtet. Bestätigt wurde dieser Befund von KARAKASHEV *et al.* (2005), welche ebenfalls die Gesamt-Ammoniumkonzentration eines Reaktors sowie die VFA-(*volatile fatty acids*) als die höchsten auf die Diversität der methanogenen Lebensgemeinschaft Einfluss nehmenden Faktoren annahmen.

In dieser Studie wurden in den Praxis-Biogasanlagen vorrangig hydrogenotrophe Methanbildner nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Studie stehen damit im Kontrast zu der bisher in der Literatur vorherrschenden Meinung, dass das gebildete Methan zu ca. 70% aus Acetat und zu ca. 30% aus  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  als Ausgangssubstrate stammt (MACKIE & BRYANT 1981). Diese Werte wurden auf Basis von Isotopen für die Vergärung von Rinderabfällen im Rührkesselreaktor im Labormaßstab (Vol. 3 I) ermittelt. Bei Betrachtung der Energiebilanzen der Teilreaktionen zeigt sich aber, dass die hydrogenotrophe Methanogenese um ein Vielfaches energetisch effizienter ist als die acetoklastische (Review: HATTORI 2008).

Die Tatsache, dass in allen untersuchten Biogasanlagen die hydrogenotrophen Methanogenen dominieren, wirft die Frage auf, welche Mikroorganismen das gebildete Acetat in diesen Reaktoren abbauen. Eine mögliche Erklärung ist der Acetat-Abbau durch so genannte syntrophe acetat-oxidierende Bacteria.

Die acetoklastischen Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* besitzen eine geringe Wachstumsrate aber eine hohe Affinität zu Acetat, wie die entsprechenden  $K_M$  Werte zeigen (ZINDER 1990). Der  $K_M$ -Wert für den Umsatz von Acetat wird für *Methanosarcina barkeri* mit 3,0 mM angegeben, während *Methanosaeta* ssp.  $K_M$  Werte zwischen 0,39 und 1,2 mM aufweist (STAMS *et al.* 2003). So benötigt *Methanosarcina* eine minimale Acetatkonzentration von 0,2 bis 1,2 mM, *Methanosaeta* dagegen aber nur eine minimale Acetat-

Konzentration von 7 bis 70  $\mu\text{M}$  um die Methanogenese betreiben zu können (JETTEN *et al.* 1992, CONRAD 1999). Die Acetatkonzentration wirkt sich somit auf die Wachstumsrate der acetoklastischen Methanogenen aus.

Durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber erhöhten  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen können die syntrophen Acetatoxidierer eine Konkurrenz zu den acetoklastischen Methanogenen (*Methanosaeta* und *Methanosarcina*) in Biogasanlagen darstellen, da das Wachstum von Letzteren durch hohe Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen ebenfalls inhibiert wird (SPROTT & PATEL 1986).

Unter den oben genannten Bedingungen (geringe Acetat- und/oder hohe Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen) könnten die syntrophen Acetatoxidierer die acetoklastischen Methanogenen dominieren. Verschiedene Studien zeigten, dass bei hohen Gesamt-Ammoniumkonzentrationen in verschiedenen mesophilen und auch thermophilen Biogasreaktoren überwiegend hydrogenotrophe Methanogene nachzuweisen waren (SCHNÜRER *et al.* 1996, ANGENENT *et al.* 2002, KARAKASHEV *et al.* 2006).

Diese Zusammenhänge konnten auch in diesem Projekt bestätigt werden. In allen sechs Anlagen, in welchen *Methanosaeta* spp. nachgewiesen wurde, wurden Gesamt-Ammoniumgehalte zwischen 0,4 bis 2,3  $\text{kg t}^{-1}$  ermittelt. Die Biogasanlagen, in denen *Methanosarcina* dokumentiert wurde, wiesen dagegen im Allgemeinen höhere Gesamt-Ammoniumgehalte zwischen 2,1 und 4,2  $\text{kg t}^{-1}$  auf.

In nahezu allen untersuchten Biogasanlagen waren die hydrogenotrophen Methanogenen dominierend bzw. stellten einen sehr hohen Anteil innerhalb der methanogenen Lebensgemeinschaft. Dieses legt den Schluss nahe, dass das Wachstum der hydrogenotrophen Methanogenen im Gegensatz zu den acetoklastischen Methanogenen weniger durch hohe Gesamt-Ammoniumkonzentrationen inhibiert wird.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von KARAKASHEV *et al.* (2006). In dieser Studie konnte mittels Radioisotopen-Versuchen ebenfalls beobachtet werden, dass bei Abwesenheit von acetoklastischen Methanogenen wie *Methanosaeta* die nicht-methanogene Acetatoxidation anstieg. Laut SCHNÜRER *et al.* (1999) stellt die syntrophe Acetatoxidation den Hauptmechanismus für den Acetatabbau in Anwesenheit von Inhibitoren wie Ammonium bzw. Ammoniak und VFA dar.

Die Acetat-Oxidation stellt eine endotherme, also eine thermodynamisch extrem ungünstige Reaktion dar. Dieser Prozess kann nur ablaufen, wenn der Wasserstoffpartialdruck durch hydrogenotrophe Partner-Organismen ständig niedrig gehalten wird. Diese  $\text{H}_2$ -verbrauchenden Mikroorganismen können sowohl aus der Domäne Bacteria (z.B. Sulfat- oder Nitrat-reduzierende  $\text{H}_2$ -verbrauchende Bacteria) als auch aus der Domäne Archaea (hydrogenotrophe Methanogene) stammen. Welcher Mikroorganismus als synthropher Partner fungiert hängt von dem Acetatoxidierer ab.

Durch die syntrophe hydrogenotrophe Methanogenese wird  $H_2$  eliminiert und  $-135,6 \text{ kJ mol}^{-1}$  an Energie freigesetzt. Die Gesamtreaktion aus syntropher Acetat-Oxidation und hydrogenotropher Methanogenese wird somit exergon mit derselben Stöchiometrie und Energiebilanz ( $\Delta G^0 = -31,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) wie die acetoklastische Methanogenese. Die syntrophen Acetatoxidierer und die Partner-Methanogene müssen sich jedoch diese geringe Energie teilen. Dies könnte dazu führen, dass diese Syntrophen eine sehr geringe Wachstumsrate besitzen (HATTORI *et al.* 2008).

Bis heute wurden nur vier Spezies identifiziert, die in Syntrophie mit hydrogenotrophen Methanbildnern Acetat zu  $H_2$  und  $CO_2$  abbauen: (1) Der zum Phylum Firmicutes gehörige Stamm AOR (LEE & ZINDER 1988) (2) *Clostridium ultunense* Stamm B (Phylum Firmicutes) (SCHNÜRER *et al.* 1996), (3) *Thermacetogenium phaeum* Stamm PB (Phylum Firmicutes) (KAMAGATA & MIKAMI 1989) und (4) *Thermotoga lettingae* Stamm TMO (Phylum Thermotogae) (BALK *et al.* 2002). Die drei erstgenannten Mikroorganismen zählen zu den Acetogenen, die den reduktiven CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase (CODH/ACS) Stoffwechselweg zur Reduzierung von  $CO_2$  zu Acetat nutzen. Analysen der Enzymaktivität des Schlüsselenzyms CO-Dehydrogenase dieses Stoffwechselweges zeigten, dass diese Mikroorganismen in der Lage sind sowohl den reduktiven als auch den oxidativen CODH/ACS Stoffwechselweg für ihren Metabolismus zu verwenden (HATTORI *et al.* 2005, LEE & ZINDER 1988, SCHNÜRER *et al.* 1996). *Thermotoga lettingae* Stamm TMO besitzt keine CO-Dehydrogenase und muss folglich einen anderen Stoffwechselweg zur Acetat-Oxidation nutzen (LEE & ZINDER 1988). Dies könnte der oxidativen Citrat-Zyklus sein, von dem bekannt ist, dass er von syntrophen Acetatoxidierern genutzt wird, die mit nicht-methanogenen hydrogenotrophen Mikroorganismen kooperieren (GALUSHKO *et al.* 2000). Jedoch wurden über *Thermotoga lettingae* Stamm TMO bis heute noch keine konkreten biochemischen Studien über den acetatoxidierenden Stoffwechselweg publiziert. Die unterschiedlichen Gruppen deuten daraufhin, dass die syntrophen acetatoxidierenden Mikroorganismen zwei unterschiedliche biochemische Mechanismen zur Acetatoxidation verwenden. Daher könnten neben den Acetogenen auch andere Mikroorganismen eine wichtige Rolle in der syntrophen Acetatoxidation spielen (HATTORI *et al.* 2008).

DNA-Sequenzen, die mit den Mikroorganismen *Clostridium ultunense* Stamm B, *Thermacetogenium phaeum* Stamm PB oder *Thermotoga lettingae* Stamm TMO eng verwandt sind, konnten in verschiedenen Umweltproben wie in aktiviertem Abwasserschläm und thermo- bzw. mesophilen Fermentern unterschiedlicher Substratbestückung nachgewiesen werden (NCBI GenBank). Für den Stamm AOR liegen bis jetzt keine näher verwandten DNA-Sequenzen vor.

Da im Rahmen dieser Studie ausschließlich die Analyse der methanogenen Archaea und nicht der acido- und acetogenen Bacteria erfolgte, können keine Angaben über das mögliche Vorhandensein von Acetatoxidierern in den untersuchten Reaktoren gemacht werden.

---

Ferner sind bis heute noch keine Studien publiziert bei denen insbesondere die Frage untersucht wird unter welchen Umweltbedingungen die syntrophen Acetatoxidierer den thermodynamisch ungünstigeren Stoffwechselweg der Acetat-Oxidation einschlagen. Daher besteht weiterhin Forschungsbedarf zur Aufklärung der komplexen, syntrophen mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen sowie der durch diese umgesetzten Stoffwechselwege.

## Zitierte Literatur

- AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.-H. (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- AMANN R., FUCHS B.M., BEHRENS S. (2001):** The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 231-236.
- ANGELIDAKI I., AHRING B.K. (1993):** Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 560-564.
- ANGENENT L.T., SUNG S., RASKIN L. (2002):** Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36: 4648-4654.
- BALK M., WEIJMA J., STAMS A.J.M. (2002):** *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 52: 1361-1368.
- BÖCKELMANN U., SZEZYK U., GROHMANN E. (2003):** A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 55: 201-211.
- BRAY J.R., CURTIS J.T. (1957):** An ordination of the upland forest of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27: 325-349.
- CASTRO H., OGRAM A., REDDY K.R. (2004):** Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6559-6568.
- CHAO A. (1987):** Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783-791.
- CHAO A., CHAZDON R.L., COLWELL R.K., SHEN T. (2005):** A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol. Lett.* 8: 148-159.
- CONRAD R. (1999):** Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 193-202.
- CONRAD R., KLOSE M. (2006):** Dynamics of the methanogenic archaeal community in anoxic rice soil upon addition of straw. *Eur. J. Soil. Sci.* 57: 476-484.
- CROCETTI G., MURTO M., BJORNSSON L. (2006):** An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *J. Microbiol. Meth.* 65: 194-201.
- DELONG E.F., WICKHAM G.S., PACE N.R. (1989):** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- GALLERT C., WINTER J. (1997):** Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 405-410.
- GALUSHKO A.S., SCHINK B. (2000):** Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* 174: 314-321.
- GOOD I.J. (1953):** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237-264.
- HATTORI S. (2008):** Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes Environ.* 23: 118-127.
- HOLLAND S.M. (2003):** Analytical rarefaction 1.3.  
<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>.

- HUGENHOLTZ P., TYSON G.W., BLACKALL L.L. (2002):** Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* 179: 29-42.
- HUGHES J.B., HELLMANN J.J., RICKETTS T.H., BOHANNAN B.J.M. (2001):** Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399-4406.
- JETTEN M.S.M., STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B. (1992):** Methanogenesis from acetate: A comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngeni* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* 88: 181-197.
- KADAM P.C., BOONE D.R. (1996):** Influence of pH and ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4486-4492.
- KAMAGATA Y., MIKAMI E. (1989):** Diversity of acetotrophic methanogens in anaerobic digestion, p. 459-464. *In* T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyana, R. Y. Morita and A. Uccida (ed.), *Recent advances in microbial ecology*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- KARAKASHEV D., BATSTONE D.J., ANGELIDAKI I. (2005):** Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 331-338.
- KARAKASHEV D., BATSTONE D.J., TRABLY E., ANGELIDAKI I. (2006):** Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5138-5141.
- KLOCKE M., NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., SOUIDI K., MUMME J., LINKE B. (2008):** Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 190-205.
- LEE M.J., ZINDER S.H. (1988):** Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 124-129.
- LOY A., HORN M., WAGNER M. (2003):** probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 31: 514-516.
- MACKIE R.I., BRYANT M.P. (1981):** Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO<sub>2</sub> to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1363-1373.
- PERNTHALER A., PRESTON C.M., PERNTHALER J., DELONG E.F., AMANN R. (2002):** Comparison of fluorescently labelled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 661-667.
- PIKE E.B., CARRINGTON E.G., ASHBURNER P.A. (1972):** An evaluation of procedures for enumerating Bacteria in activated sludge. *J. Appl. Bact.* 35: 309-321.
- SCHNÜRER A., SCHINK B., SVENSSON B.H. (1996):** *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1145-1152.
- SCHNÜRER A., ZELLNER G., SVENSSON B.H. (1999):** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 249-261.
- SIEGRIST H., VOGT D., GRACIA-HERAS J.L., GUJER W. (2002):** Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1113-1123.
- SPROTT G.D., PATEL G.B. (1986):** Ammonium toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 358-363.
- STAMS A.J.M., OUDE ELFERINK S.J.W.H., WESTERMANN P. (2003):** Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 81: 31-56.



- VEIGA M.C., JAIN M.K., WU W.M., HOLLINGSWORTH R.I., ZEIKUS G. (1997):** Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 403-407.
- WHITMAN W.B., BOONE D.R., KOGA Y., KESWANI J. (2001):** Bergey's manual of systematic bacteriology (ed. Boone, D.R. and Castenholz, R.W.). The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria ed. Garrity, G. M. New York: Springer.
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005):** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 670-679.
- ZINDER S.H. (1990):** Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:125-138.

## II.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes wurden wesentliche Arbeiten zur Analyse der methanogenen Lebensgemeinschaften in Biogasanlagen auf Basis nachwachsender Rohstoffe durchgeführt. Insbesondere wurden erstmals umfangreiche Arbeiten zur Analyse der Archaea-Biodiversität mittels Klonbibliotheken und DNA-Sequenzierung vorgenommen. Die Q-PCR zur Quantifizierung bedeutender Gruppen methanogener Archaea in Relation zu den fermentativen Bacteria wurde etabliert und optimiert.

Diese Ergebnisse wurden bislang in 24 wissenschaftlichen Veröffentlichungen publiziert (s. II.4). 5 weitere Publikationen befinden sich derzeit in Vorbereitung. Weiterhin wurden 6 Studiensarbeiten (Praktika, Bachelor- und Diplomarbeiten) sowie 2 Dissertationen durchgeführt bzw. befinden sich derzeit in der Vorbereitung.

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

## II.3 Fortschritte anderer Stellen

Von YU *et al.* wurden seit Projektbeantragung mehrere Publikationen zur Entwicklung einer Q-PCR basierten Nachweisteknik für Methanbildner veröffentlicht. Diese Methodik beruht auf der Entwicklung von Primern und Sonden für die archaelle 16S rDNA. (Diese Strategie wurde in der Vorhabensbeschreibung unter III.1 Alternative Strategien beschrieben.)

- YU Y., LEE C., HWANG S. (2005): Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science and Technology* 52 (1-2): 85-91.
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005): Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6): 670-679.

Die publizierte Methode wurde im Rahmen dieses Projektes adaptiert und in Teilen optimiert und zur Analyse von Praxis-Reaktoren und Labor-Fermentern eingesetzt.

Auch auf der Grundlage des Stoffwechselgens *mcrA* fanden weit reichende Untersuchungen zur Etablierung eines Q-PCR Assays für methanogene Archaea statt. Eine Anwendung dieser neu publizierten Q-PCR Assays erfolgte in diesem Projekt nicht.

- DENMAN S.E., TOMKINS N.W., MCSWEENEY, C.S. (2007): Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 313-322.

- NUNOURA T., OIDA H., TOKI T., ASHI J., TAKAI K., HORIKOSHI K. (2006): Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 149-157.
- NUNOURA T., OIDA H., MIYAZAKI J., MIYASHITA A., IMACHI H., TAKAI K. (2008): Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 64 (2): 240-247.

## II.4 Veröffentlichungen

### II.4.1 Referierte Fachartikel

1. NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., LINKE B., KLOCKE M. (2008): Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6): 1835-1850.
2. 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 (3): 190-205.
3. SOUIDI K., MUMME J., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agrartechnische Forschung / Agricultural Engineering Research* 13 (6): 197-206.
4. KLOCKE M., MÄHNERT P., MUNDT K., SOUIDI K., LINKE B. (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology* 30 (2): 139-151.

### II.4.2 Beiträge zu Sammelwerken

1. NETTMANN E., MERZ P., MUNDT K., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2008): 16S rDNA and *mcrA* based analysis of the methanogenic Archaea in an agricultural biogas plant reveals a predomination of hydrogenotrophic methanogens. *In: European Society of Agricultural Engineers [Ed.]: Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Kreta, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008. Book of abstracts: P-106, Conference Proceedings CD: 1176428 (19 S.).*
2. KLOCKE M., MUNDT K., NETTMANN E., SOUIDI K., BERGMANN I., MUMME J., SCHÖNBERG M., LINKE B. (2008): Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. *In: European Society of Agricultural Engineers [Ed.]: Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 -*

Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Kreta, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008. Book of abstracts: P-144, Conference Proceedings CD: 1143216 (13 S.).

3. KLOCKE M., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., SOUIDI K., LINKE B. (2008): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. Biospektrum 2008S: 96.
4. BERGMANN I., NETTMANN E., HAUSDORF L., KLOCKE M. (2008): Detection and quantification of methanogenic Archaea in digestors of different substrate primary products and residues. Biospektrum 2008S: 88.
5. BERGMANN I., NETTMANN E., MUNDT K., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2008): 16S rDNA and *mcrA* based analyses of the methanogenic Archaea in agricultural biogas plants reveals a predomination of hydrogenotrophic methanogenes. Biospektrum 2008S: 94.
6. KLOCKE M., NETTMANN E., MUNDT K., SOUIDI K., BERGMANN I., LINKE B. (2007): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. Journal of Biotechnology 131 (2S): S123-S124.

#### II.4.3 Poster-Präsentationen auf Fachtagungen

1. NETTMANN E., MERZ P., MUNDT K., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2008): 16S rDNA and *mcrA* based analysis of the methanogenic Archaea in an agricultural biogas plant reveals a predomination of hydrogenotrophic methanogens. International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Hersonissos, Crete, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008.
2. KLOCKE M., MUNDT K., NETTMANN E., SOUIDI K., BERGMANN I., MUMME J., SCHÖNBERG M., LINKE B. (2008): Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Hersonissos, Crete, Griechenland, 23. - 25. Juni 2008.
3. KLOCKE M., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., SOUIDI K., LINKE B. (2008): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. VAAM-/GBM-Jahrestagung, Frankfurt am Main, 9. - 11. März 2008.
4. BERGMANN I., NETTMANN E., HAUSDORF L., KLOCKE M. (2008): Detection and quantification of methanogene Archaea in digestors of different substrate primary products and residues. VAAM-/GBM-Jahrestagung, Frankfurt am Main, 9. - 11. März 2008.
5. BERGMANN I., NETTMANN E., MUNDT K., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2008): 16S rDNA and *mcrA* based analyses of the methanogenic Archaea in agricultural biogas plants reveals a predomination of hydrogenotrophic methanogenes. VAAM-/GBM-Jahrestagung, Frankfurt am Main, 9. - 11. März 2008.

6. KLOCKE M., NETTMANN E., MUNDT K., SOUIDI K., BERGMANN I., LINKE B. (2007): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. 13<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Barcelona, Spanien, 16. - 19. September 2007.
7. KLOCKE M., MUMME J., MUNDT K., SOUIDI, K., NETTMANN, E., BERGMANN I., LINKE B. (2007): Methanbildende Archaea in zweistufigen Biogasreaktoren bei der Vergärung von Triticale-Silage. Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.
8. WINKLER M., KLOCKE M., MUNDT K., LINKE B. (2007): Vergärung von Roggen-GPS in einer zweistufigen Prozessführung mit Bioleaching. Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.
9. SOUIDI K., MUMME J., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2007): Analyse der mikrobiellen Diversität in Biogasreaktoren. Energiepflanzen im Aufwind - Fachtagung zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz, Potsdam, 12. - 13. Juni 2007.

#### **II.4.4 Vorträge auf Fachtagungen**

1. KLOCKE M. (2008): Diversity and abundance of methanogenic Archaea in biogas reactors. Solar Bio-Fuels 2008, Bielefeld, Germany, 12. - 14. August 2008.
2. KLOCKE M. (2006): Mikrobielle Lebensgemeinschaften in Biogasreaktoren: Neue Ansätze zur Analyse eines komplexen Ökosystems. New Energy Husum / International Biogas Workshop, Husum, Deutschland, 23. - 26. März 2006.

**Bildverzeichnis**

<b>Bild 1:</b> Rarefaction-Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken. ....	28
<b>Bild 2:</b> Rarefaction-Analyse der <i>mcrA3</i> Klonbibliotheken. ....	37
<b>Bild 3:</b> Rarefaction-Analyse der <i>mcrA1</i> Klonbibliotheken. ....	41
<b>Bild 4:</b> Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente. ....	45
<b>Bild 5:</b> Ergebnisse der Q-PCR. ....	50
<b>Bild 6:</b> Standardkurven für die quantitative Erfassung der 16S rDNA Kopienzahl für Organismen der Domäne Archaea mit Hilfe des erstellten Q-PCR Protokolls. ....	53
<b>Bild 7:</b> Standardkurven für die quantitative Erfassung der 16S rDNA Kopienzahl für Organismen der Domänen Archaea und Bacteria, der Ordnungen Methanomicrobiales und Methanobacteriales sowie der Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae. ....	54
<b>Bild 8:</b> Mikroskopische Kontrolle der Aufreinigungsschritte für die FISH bei Verwendung des Protokolls 1. ....	67
<b>Bild 9:</b> Mikroskopische Kontrolle der Optimierungsversuche für die FISH bei Verwendung des Protokolls 2. ....	68
<b>Bild 10:</b> Mikroskopische Kontrolle der Optimierungsversuche für die FISH bei Verwendung des Protokolls 4. ....	69

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die beprobten Biogasanlagen. ....	20
<b>Tabelle 2:</b> Im Rahmen dieses Projektes erstellte 16S rDNA Klonbibliotheken. ....	23
<b>Tabelle 3:</b> Ergebnisse der Analyse der 16S rDNA Klonbibliotheken. ....	26
<b>Tabelle 4:</b> Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Klone für hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene. ....	27
<b>Tabelle 5:</b> Statistische Auswertung der 16S rDNA Klonbibliotheken. ....	29
<b>Tabelle 6:</b> Ähnlichkeits-Indices der 16S rDNA Klonbibliotheken. ....	30
<b>Tabelle 7:</b> Vor- und Nachteile der verwendeten Primersets für die PCR. ....	33
<b>Tabelle 8:</b> Ergebnisse der Analyse der <i>mcrA</i> Klonbibliotheken. ....	35
<b>Tabelle 9:</b> Im Rahmen dieses Projektes entwickelte <i>mcrA</i> Klonbibliotheken. ....	36
<b>Tabelle 10:</b> Diversitätsanalyse und statistische Auswertung für die <i>mcrA3</i> Klonbibliotheken. ....	38
<b>Tabelle 11:</b> Ähnlichkeits-Indices des paarweisen Vergleichs der Archaea-Diversität in den <i>mcrA3</i> Klonbibliotheken. ....	38
<b>Tabelle 12:</b> Prozentuale Verteilung der <i>mcrA3</i> Klone für hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene. ....	40
<b>Tabelle 13:</b> Diversitätsanalyse und statistische Auswertung für die <i>mcrA1</i> Klonbibliotheken. ....	42

<b>Tabelle 14:</b> Versuchsaufbau zur Etablierung eines semi-quantitativen Nachweisverfahrens für Organismen der Domänen Archaea und Bacteria mittels einem konventionellen Multiplex-PCR-Ansatz. ....	44
<b>Tabelle 15:</b> Verwendete Protokolle zur DNA-Isolierung. ....	47
<b>Tabelle 16:</b> Menge und Reinheit der aus den Optimierungsversuchen erhaltenen DNA-Präparationen. ....	48
<b>Tabelle 17:</b> Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Kopienzahl bei Verwendung unterschiedlicher Protokolle zur DNA-Isolierung. ....	51
<b>Tabelle 18:</b> Protokolle zur Optimierung der Q-PCR (16S rDNA Assay). ....	53
<b>Tabelle 19:</b> Steigungs- und Bestimmtheitsmaßangaben der Standardkurven (16S rDNA Assay). ....	55
<b>Tabelle 20:</b> Entwickelte gruppenspezifische Primersets zur Detektion des <i>mcrA</i> Gens. ....	56
<b>Tabelle 21 und 22:</b> <i>mcrA</i> -Sequenzen, welche für die Entwicklung der gruppenspezifischen Primersets verwendet wurden. ....	58 - 59
<b>Tabelle 23:</b> Optimierte Protokolle für die <i>mcrA</i> Q-PCR-Assays. ....	60
<b>Tabelle 24:</b> Steigungs- und Bestimmtheitsmaß für die Standardkurven ( <i>mcrA</i> Assay). ....	61
<b>Tabelle 25:</b> Prozentuale Verteilung der 16S rDNA Kopienzahl für die Ordnungen Methanomicrobiales und Methanobacteriales bzw. für die Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae. ....	62
<b>Tabelle 26:</b> Prozentuales Verhältnis der ermittelten Werte für die 16S rDNA-Kopienzahl für Vertreter der Domäne Archaea in Relation zu der Kopienzahl für Vertreter der Domäne Bacteria. ....	62
<b>Tabelle 27:</b> Prozentuale Verteilung der 16S rDNA-Kopienzahl auf hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene. ....	63
<b>Tabelle 28:</b> In dieser Studie verwendete FISH-Sonden. ....	70
<b>Tabelle 29:</b> In dieser Studie verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe und Filtersysteme. ....	70
<b>Tabelle 30:</b> Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. ....	71
<b>Tabelle 31:</b> Zusammensetzung des Waschpuffers. ....	71

**In der Reihe  
Bornimer Agrartechnische Berichte**

sind bisher erschienen:

Heft 1	Technik und Verfahren der Landschaftspflege	1992
Heft 2	Beiträge zur Lagerung und Verarbeitung pflanzenbaulicher Produkte	1993
Heft 3	Technik und Verfahren in der Tierhaltung	1993
Heft 4	Technik und Verfahren der Landschaftspflege und für die Verwendung der anfallenden Materialien	1994
Heft 5	Verfahrenstechnik der Aufbereitung, Lagerung und Qualitätserhaltung pflanzlicher Produkte	1994
Heft 6	Biokonversion nachwachsender Rohstoffe und Verfahren für Reststoffbehandlung	1994
Heft 7	Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Landarbeit und Schlepperprüffeld in Bornim 1927 bis 1945	1995
Heft 8	Qualitätssicherung und Direktvermarktung	1996
Heft 9	Konservierende Bodenbearbeitung auf Sandböden	1996
Heft 10	Anwendung wärme- und strömungstechnischer Grundlagen in der Landwirtschaft	1996
Heft 11	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1996	1996
Heft 12	Aufbereitung und Verwertung organischer Reststoffe im ländlichen Raum	1996
Heft 13	Wege zur Verbesserung der Kartoffelqualität durch Verminderung der mechanischen Beanspruchung	1997
Heft 14	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1997	1997
Heft 15	Technische und ökonomische Aspekte der Nutztierhaltung in großen Beständen	1997
Heft 16	11. Arbeitswissenschaftliches Seminar	1997
Heft 17	Nachwachsende Rohstoffe im Land Brandenburg Stand Aktivitäten und Perspektiven einer zukunftsfähigen und umweltgerechten Entwicklung	1998
Heft 18	Qualität von Agrarprodukten	1998
Heft 19	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1998	1998
Heft 20	Beiträge zur teilflächenspezifischen Bewirtschaftung	1998
Heft 21	Landnutzung im Spiegel der Technikbewertung – Methoden Indikatoren, Fallbeispiele	1998



---

Heft 22	Kriterien der Nachhaltigkeit in der Verfahrensentwicklung für die Nutztierhaltung	1999
Heft 23	Situation und Trends in der Landtechnik / Erneuerbare Energien in der Landwirtschaft	1999
Heft 24	Institut für Landtechnik der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 1951 bis 1965	1999
Heft 25	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1999 / 2000	2000
Heft 26	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2001	2001
Heft 27	Approaching Agricultural technology and Economic Development of Central and Eastern Europe	2001
Heft 28	6 <sup>th</sup> International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering	2001
Heft 29	Measurement Systems for Animal Data and their Importance for Herd Management on Dairy Cow Farms	2002
Heft 30	Produktion, Verarbeitung und Anwendung von Naturfasern	2002
Heft 31	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2002	2002
Heft 32	Biogas und Energielandwirtschaft - Potenzial, Nutzung, Grünes Gas <sup>TM</sup> , Ökologie und Ökonomie	2003
Heft 33	Sozioökonomische Aspekte zu Perspektiven des Offenlandmanagements	2003
Heft 34	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2003	2003
Heft 35	Energieholzproduktion in der Landwirtschaft Potenzial, Anbau, Technologie, Ökologie und Ökonomie	2004
Heft 36	High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 2003	2004
Heft 37	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2004	2004
Heft 38	Die Landmaschinenprüfung in der DDR 1951-1991 und ihre Vorgeschichte	2004
Heft 39	Energieverlust und Schimmelpilzentwicklung bei der Lagerung von Feldholz-Hackgut	2005
Heft 40	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2005	2005
Heft 41	Demonstration der Langzeitwirkung bedarfsorientierter Fungizidbehandlung mit dem CROP-Meter	2005
Heft 42	Biochemicals and Energy from Sustainable Utilization of herbaceous Biomass (BESUB)	2005

Heft 43	Ozontes Waschwasser zur Qualitätssicherung leichtverderblicher Produkte - Entwicklung einer <i>Fuzzy-Logic</i> -Steuerung des Waschprozesses	2005
Heft 44	Messsystem zur Bewertung des Unkrautvorkommens	2005
Heft 45	Anwendung der Thermographie zur Optimierung der Belüftungssteuerung bei der Lagerhaltung landwirtschaftlicher Produkte	2005
Heft 46	Membranbioreaktor zur Aufbereitung von Schlachthofabwässern	
	Prozesssteuerung von Biogasanlagen mit Kofermentation	2005
Heft 47	Verschleißeinfluss auf das Förderverhalten von Drehkolbenpumpen	2005
Heft 48	Qualitätserhaltung und Qualitätssicherung von Bioobst und Biogemüse in der Nachernte	2005
Heft 49	Miniaturisiertes Datenerfassungs-System zum Implantieren in Früchte und zur Messung ihrer mechanischen Belastung durch Ernte- und Nachernteverfahren	2005
Heft 50	Prozesskontrolle der Qualität von frischem Obst und Gemüse mit Hilfe eines Multigas-Sensors	2005
Heft 51	Entwicklung eines Echtzeitsensors für die Stärkebestimmung bei Kartoffeln als funktionaler Bestandteil eines optoelektronischen Verleseautomaten	2005
Heft 52	Optimierte Steuerung von Getreide-Schachttrocknern	2005
Heft 53	Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung von Rizinusöl	2005
Heft 54	Non-Destructive Methods for Detecting Health-Promoting Compounds COST Action 924 Working Group Meeting	2005
Heft 55	4 <sup>th</sup> IFAC / CIGR Workshop Control Applications in Post - Harvest and Processing Technology (CAPPT 2006) 26th - 29th March 2006, Potsdam, GERMANY	2006
Heft 56	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2006	2006
Heft 57	Kontrolle der Frische in der Nacherntekette von Ökogemüse	2006
Heft 58	Entwicklung eines innovativen Dekontaminationsverfahrens als Technologieantwort auf zukünftiges Qualitätsmanagement im Nacherntebereich	2006
Heft 59	Experimental Studies and Mathematical Modelling of Solar Drying System for Production of High Quality Dried Tomato	2007

Heft 60	13. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft & 4. Workshop Precision Farming	2007
Heft 61	Energiepflanzen im Aufwind Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Erfahrungen zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz	2007
Heft 62	14. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft	2008
Heft 63	Experten-Workshop Lagerung von Holzhackschnitzeln	2008
Heft 64	Postharvest unlimited 2008	2008
Heft 65	Vom Agrarrohstoff zu neuen Produkten – 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 Nachweissystems	2009

Interessenten wenden sich an:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.  
Max-Eyth-Allee 100  
14469 Potsdam

Tel.: (0331) 5699-820  
Fax.: (0331) 5699-849  
E-Mail: [atb@atb-potsdam.de](mailto:atb@atb-potsdam.de)

Schutzgebühr: 13,- €