

Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (TUM-SWW)

Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer Versuchsfermenteranlage zur Bearbeitung von Fragestellungen im Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen



BMBF-FKZ: 0330151

TUM-SWW: Forschungsbericht (2002-2005)



Projektpartner:

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik Freising-Weihenstephan



FKZ 0330151

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium für Bildung und Forschung



Projektträger Jülich Forschungszentrum Jülich GmbH

Zuwendungsempfän	Förderkennzeichen:						
Technische Univ	0330151						
Lehrstuhl für Siedlu	ngswasserwirtschaft						
Vorhabensbezeichnung:							
Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer							
Versuchsfermentera	Versuchsfermenteranlage zur Bearbeitung von Fragestellung im						
Bereich Inp	Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei						
landwirtschaftlichen Biogasanlagen							
Laufzeit: 01.07.2002 bis 30.06.2005							
Berichtszeitraum: 01.07.2002 bis 30.06.2005							

Auftraggeber:	Bundesministerium für Bildung und
	Forschung (BMBF)
Projektabwicklung:	Projektträger Jülich (PTJ)
Projektleiter:	Prof. Dr. Peter Wilderer
Projektbearbeiter:	Dr. Hocine Arab
Endbericht:	Juni 2005

## **INHALTSVERZEICHNIS**

I KUR	ZE DARSTELLUNG	7
I.1 Au	fgabenstellung	7
I.2 Vo	rraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	7
I.3 Pla	nung und Ablauf des Vorhabens	8
I.3.1	Vorgehensweise	8
I.3.2	Zeitplan	9
I.4 Wi	ssenschaftlicher Stand	11
<b>I.4.1</b>	Ausgangslage	11
<b>I.4.2</b>	Mikrobiologische Grundlagen der Vergärung	12
I.4.2.	1 Vorgeschichte der Vergärung	13
I.4.2.	2 Physiologische Eigenschaften der Gärbakterien	13
I.4.2.	3 Mikrobiologische Defizite	15
I.5 Zu	sammenarbeit mit anderen Stellen	15
II. EII	NGEHENDE DARSTELLUNG	16
II.1 Da	rstellung der erzielten Ergebnissen	16
II.1.1	Versuchsaufbauten	16
А-	Aufbau und Betrieb einer Anaeroben-Kammer	16
В-	Aufbau einer Gasstation	17
C-	Konstruktion von Anaeroben-Reaktoren	17
II.1.2	Aufbau der mikrobiologischen Methoden	19
А-	Herstellung von Anaeroben-Flüssigmedien	20
В-	Kultivierung von Referenz Bakterienstämmen	20
II.1.3	Molekularbiologische Untersuchungen	23
А-	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)	23
В-	Mikroskopische Analyse mit Hilfe des CLSM	27
C-	Untersuchungen zur Extraktion von Nukleinsäuren (DNA/RNA)	29
D-	Amplifizierung der 16S rDNA aus der Fermenter	31
Е-	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)	33

F-	Klonierung, Sequenzierung und phylogenetische Einordnung der 16S	
	rDNA/RNA Klone	34
G-	Kultivierungsversuche mit der Multi-probable-number (MPN) Metho	de
		35
H-	Bestimmung der Gesamtzellzahl	41
I-	Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen	42
II.1.4	Ergebnisse und Diskussion für Meilenstein 1 (In Situ Hybridisierung):	44
II.1.4	4.1 Probenahme	44
II.1.4	4.2 Proben Beschreibung	46
<b>II.1.</b> 4	4.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen	46
<b>II.1.</b> 4	1.4 In Situ Analyse bei der Herstellung von Standardbiozönose	47
II.	1.4.4.1 Entwicklung der Methanogenen bei der Herstellung der	
Sta	andardbiozönose (SB1)	52
<b>II.1.</b> 4	4.5 Entwicklung der Biozönose in den verschiedenen Fermentern währer	ıd
der Ü	Jbertragbarkeitsversuche	53
II.	1.4.5.1 Entwicklung der Methanogenen während der	
Üł	oertragbarkeitsversuche in den Batchfermentern	55
II.	1.4.5.2 Übertragbarkeitsversuche und Entwicklung der Biozönose:	
Ve	ergleich zwischen den 3500L, 36L und 2L Batchfermentern	57
<b>II.1.</b> 4	1.6 Analyse der Biozönose bei der Übertragbarkeitsversuche zum	
Prax	isfermenter	60
<b>II.1.</b> 4	4.7 Ergebnisse und Diskussion (Meilenstein 2): Substrate Co-Vergärung	66
II.	1.4.7.1 Entwicklung der Biozönose in den 3500L Durchflussfermentern	66
II.	1.4.7.2 Entwicklung der Biozönose in den 36L Durchflussfermentern	74
II.	1.4.7.3 Analyse der Biozönose in den 36L Batchfermentern	80
II.	1.4.7.4 Entwicklung der Biozönose in den 2L Batchfermentern	84
<b>II.1.</b> 4	1.8 Vergleich zwischen den chemischen Analysen und den mikrobiologisc	hen
Erge	bnissen bei der Co-Vergärung von verschiedenen Substraten	86
<b>II.1.</b> 4	1.9 Ergebnisse und Diskussion der PCR-DGGE Analysen	93
II.	1.4.9.1 Vergleich der DGGE-Profilen mit 16S rDNA	93
II.	1.4.9.2 Vergleich der DGGE-Profilen von 16S rRNA	96
<b>II.1.</b> 4	4.10 Phylogenetische Analyse der PCR-DGGE Sequenzen	98
II.	1.4.10.1 Analyse der Archaea Klone	98
II.	1.4.10.2 Analyse der <i>Bacteria</i> Klone	105

II.1.4.11 Kultivierungsversuche mit der Multi-probable-number (MPN)						
Methode	113					
II.1.5 Literaturverzeichnis	115					
II.2 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans	127					
II.3 Bekannte Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens	128					
II. 4 Erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse	129					

#### I Kurze Darstellung

#### I.1 Aufgabenstellung

Ziel des Forschungsprojekts ist die Analyse der mikrobiologischen Vorgänge in landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Inputmaterialien und technischen Verfahrenskenngrößen, sowie die Untersuchung der Gärreste.

Aus der Erkenntnis heraus, dass das zumeist aus Laborversuchen stammende Datenmaterial für die Planung und den Betrieb von Praxisbiogasanlagen nicht zu optimalen Ergebnissen führt, ergibt sich die Formulierung des Meilenstein 1. Dieser umfasst die mikrobiologische Analyse von drei deutlich unterschiedlich großen Versuchsanlagen, um Übertragbarkeitseffekte zu untersuchen und zu validieren. Darunter sind jene Erscheinungen zu verstehen, die dafür verantwortlich sind, dass eine direkte Übertragbarkeit von Werten aus Labor- und Technikumsversuchen nicht zwangsläufig zu entsprechend optimal arbeitenden Praxisanlagen führt.

Die aus Meilenstein 1 gewonnenen Erkenntnisse dienten als Basisdaten für die Aufgabe des Meilensteins 2. Diese Aufgabe besteht in der Untersuchung der Struktur, Zusammensetzung und Aktivität der Biozönose bei der Vergärung von ausgewählten verschiedenartigen Co-Substraten, die jeweils parallel in den drei unterschiedlichen Versuchsfermenteranlagen durchzuführen waren. Dazu wurden 3 Substrate mit unterschiedlichem Schwerpunkt hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzung selektiert:

- Maissilage: cellulose- und stärkebetont
- Grassilage: cellulose- und etwas proteinbetont
- Rapsöl: fettbetont

Mit Hilfe der mikrobiologischen, molekularbiologischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen soll der "Blackbox-Prozess" der Vergärung von Bioabfällen und Nachwachsenden Rohstoffen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen analysiert werden.

### I.2 Vorraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt lag im Zeitraum der Erstellung und Genehmigung des Antrages aufgrund seiner verfahrensoptimierenden Ausrichtung bezüglich der Untersuchung von

7

landwirtschaftlichen Produktionsprozessen zur umweltfreundlichen Energieerzeugung im Kernbereich des vom PTJ im Auftrag des BMBF gestellten Themas "Agrartechnik – Integrierter Umweltschutz in der Landwirtschaft" des Förderprogramms "Forschung für die Umwelt". Der Aktualitätsbezug ist auch weiterhin gegeben, da die Energiegewinnung mittels alternativer, dezentraler, umweltfreundlicher (CO<sub>2</sub>-neutraler) Methoden in der Landwirtschaft zwischenzeitlich weiter an Bedeutung gewonnen hat. Dies gilt ganz besonders für die landwirtschaftliche Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen (NawaRos), die seit der neuen Novellierung des EEG im Jahre 2004 deutlich stärker gefördert wird. Daraus resultiert auch ein deutlicher Anstieg des Anlagenneubaus, der geeignetes Planungsdatenmaterial nötiger macht denn je.

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

#### I.3.1 Vorgehensweise

Für die Untersuchung der Biozönose im Gärungsprozess wurden die Versuche in zwei Phasen aufgeteilt:

- Versuche mit verschiedenen Fermentergrößen sollen die Ursachen der so genannten "Übertragbarkeitseffekte" erforschen. Um Ursachen auf mikrobiologischer Ebene festzustellen, werden zur Identifizierung und Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Versuchsfermentern neben physikalisch-chemischen Untersuchungen (u.a. Gas-Chromatographie) folgende Methoden verwendet:
  - Auf Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierende Techniken
  - Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)
  - In Situ- und Dot Blot Hybridisierung
  - konfokale Laser-Scanning- und Epifluoreszenzmikroskopie von Reaktorproben mit fluoreszenzmarkierten Mikroorganismen
  - Klassische Mikrobiologie auf Grundlage von Kultivierung
- 2. Die erfassten Daten aus der ersten Phase werden als Grundlagen für die Konzeption, Erstellung und Optimierung einer Versuchsfermenteranlage verwendet. Dabei werden die in der ersten Phase genannten Methoden eingesetzt. Wesentliche Ziele sind, limitierende Faktoren, z.B. in Form und Art der Input-/Outputmaterialien zu

überwinden und praktikable Kombinationsmöglichkeiten von Co-Fermentaten mit Gülle zu erforschen und zu evaluieren.

Mit Hilfe der mikrobiologischen, molekularbiologischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen soll der "Blackbox-Prozess" der Vergärung von Bioabfällen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen analysiert werden.

#### I.3.2 Zeitplan

Aufbau der verschiedenen Versuchsanlagen sowie Ablauf der Versuche wurden zeitlich wie folgt durchgeführt. Die Darstellung umfasst nur die Aufgaben, die von dem Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft der TU München durchgeführt wurden.

Zeitplan des Anlagenaufbaus und der durchgeführten Versuche

Monat	Juli - Sept. 2002	Okt Dez. 2002	Jan März 2003	April - Juni 2003	Juli – Sept. 2003	Okt. – Dez. 2003	Jan März 2004	April - Juni 2004	Juli – Sept. 2004	Okt. – Dez. 2004	Jan März 2005	April - Juni 2005
Quartale	Ι	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Wissenschaftliches Begleitprogramm und Literaturrecherchen												
Mikrobiologische Voruntersuchungen												
Methodenaufbau und -test der mikrobiologischen Analytik												
Mikrobiologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit (Meilenstein 1: 2L, 36L und 3500L)												
Mikrobiologische Versuch: Durchfluss Praxissubstrat in 36L, 3500L & Praxisfermenter												
Mikrobiologische Untersuchungen zur Substrat (Meilenstein 2: 2L, 36L und 3500L)												
Datenverarbeitung und Auswertung												
Zwischenbericht												
Endbericht												

#### I.4 Wissenschaftlicher Stand

Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde, insbesondere Angaben bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden, sowie Angabe der Fachliteratur und der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste.

#### I.4.1 Ausgangslage

Im Bereich der Validierung unterschiedlicher Inputmaterialien in landwirtschaftlichen Biogasanlagen sind in jüngerer Zeit nur wenig systematische Arbeiten durchgeführt worden. So wurden Gaserträge verschiedener Substrate zumeist mit Hilfe von kleinsten Laborfermentern ermittelt (SCHOFIELD, 2000).



<u>Abb.1</u>: Mittlere Gasertragspotentiale verschiedener ausgewählter Substrate mit der jeweiligen Schwankungsbreite gemäß der ausgewerteten Literaturstellen. (Zahl an der Basis der Säulen: Anzahl der konsultierten Literaturstellen) [Boxer (1999); Baserga (1998); Braun (1992); Buschner (1994); Edelmann (1991); Graf (1999); Kuhn (1995); Linke und Schelle (1999); Reinhold und Noack (1956); Schuchart (1983); Stadlbauer (1982); Weiland (1989); Wellinger (1997) gemäß (SCHATTNER et al.; 2001).

Hinzu kommt, dass in vielen Veröffentlichungen der Versuchsaufbau, die Bezugsgrößen sowie die Methoden, nach denen die angegebenen Gasertragswerte berechnet wurden, fehlen oder mangelhaft dargestellt werden (Abb. 1). So fehlen oft Angaben, ob es sich bei den Gasertragsmengen um wasserfreies und auf Normbedingungen umgerechnetes Gas handelt, oder ob diese Umrechnung nicht stattgefunden hat (Abb. 1). Auch wird häufig nicht näher darauf eingegangen, auf welche Art der Trockensubstanz die Gaserträge bezogen wurden oder gar versuchsspezifische Absolutwerte sind. Außerdem führen Art der verwendeten Fermenter und Versuchsdurchführung sowie Messmethoden **Z**11 unterschiedlichen Ergebnissen und müssten von daher immer angegeben werden, da sonst eine direkte Vergleichbarkeit der Werte aus unterschiedlichen Quellen streng genommen nicht möglich ist.

Dieser Sachverhalt wird auch durch die aktuelle "Handreiche Biogasgewinnung und -nutzung" (AUTORENKOLLEKTIV; HRSG. FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V., 2004) durch nachstehendes Zitat (Seite 190-191) bestätigt:

Somit ist die planerische Verwertbarkeit der Literaturdaten zweifelhaft, was auch während der Projektlaufzeit immer wieder in Veröffentlichungen bestätigt wurde und die Bedeutung des Themas belegt (BECKER UND HAMS, 2002; FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V., 2004).

Bezüglich der zur Bearbeitung des Projektes konstruierten Versuchsanlagen ist hervorzuheben, dass es sich in allen Fällen um Kombinationen aus am Markt zu erwerbenden Materialien oder Bauteilen und selbst entwickelter Aggregate gehandelt hat.

Im Rahmen dieses Projektes wurden keine Bauteile im Hause hergestellt, deren Funktion, Funktionsweise, Bauweise oder Aussehen wissentlich irgendwelchen Schutzrechten unterliegen. Urheberrechtlich geschützte Elemente für den Aufbau der Versuchsanlagen wurden vom jeweiligen Hersteller oder über dessen Handelspartner erworben.

#### I.4.2 Mikrobiologische Grundlagen der Vergärung

Ziel der Vergärung ist die Verwertung von organischen Reststoffen und nachwachsenden Rohstoffen und dabei die Produktion von Biogas, das hauptsächlich aus Methan (CH<sub>4</sub> bis zu 70%) und Kohlendioxide (CO<sub>2</sub> bis zu 30%) besteht. Diese Vergärung erfolgte in

<sup>&</sup>quot;Leider gibt es für viele Substrate keine Literaturangaben zu Gasausbeuten und Methangehalten, auf die man zurückgreifen könnte, oder die angegebenen Werte weisen so große Spannen auf, dass fast jedes gewünschte Ergebnis einer Wirtschaftlichkeitsberechnung möglich und begründbar ist [...]. Häufig sind die angegebenen Gasausbeuten nicht auf Normbedingungen korrigiert.[...]. Man ist deshalb fast gezwungen, Gärtests durchführen zu lassen, die allerdings nicht unbedingt auf Praxisanlagen übertragbar sind."

mehreren Stufen, die Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und die Methanogenese (Abb. 2). Dabei kommen verschiedene Gruppen von Mikroorganismen zum Einsatz. Die Aktivität der Mikroorganismen, die sich an den Abbau der organischen Materie beteiligen, ist von großer Bedeutung und sehr entscheidend, um einen effizienten Abbau der organischen Komplexe im Reaktor zu gewährleisten (Mladenovska et al., 2003).

#### I.4.2.1 Vorgeschichte der Vergärung

Bereits im 17. und 18. Jahrhundert wurde das Biogas, oder die brennbare Luft genannt, entdeckt. Die Experimente von Alessandro Volta mit dem "Teufel Gas" haben breite wissenschaftliche Begeisterung gefunden. 200 Jahre später wurde eine Organisation gegründet (Foundation for Study of the biological formation of methane; Paoloni, 1976), um biogenes Gas zu untersuchen (Wolfe R. S., 1993). Der erste Hinweis, dass Methan bei mikrobiologischen Prozessen gebildet wird, kam 1868 von Bechamp, ein Student von Louis Pasteur. Bechamp machte Untersuchungen mit Zucker und Stärke in Abwesenheit von Sauerstoff und stellte fest, dass diese Substrate vergoren wurden.

1950 begannen gezielte Untersuchungen zur Konversion von Methylgruppen zum Methan in Barker's Labor (Barker, 1956).

Wichtig bei diesen Vergärungsversuchen ist die Abhängigkeit der verschiedenen Bakteriengruppen von einander; so verwenden beispielsweise die Methanogenen den Wasserstoff, Essigsäure oder Kohlendioxide von anderen Gruppen, um das Methan zu produzieren.

Die Produktion von Methan bei der Vergärung ist ohne Methanogenen nicht möglich. Die Methanogenese ist die entscheidende Phase in der Vergärung für die Methanproduktion und darüber hinaus auch in dem C-Zyklus auf der Erde.

#### I.4.2.2 Physiologische Eigenschaften der Gärbakterien

Die Vergärung an sich ist ein sehr empfindlicher Prozess. Eine Störung an einer Etappe der Vergärung führt zum Erliegen des Vergärungsprozesses. So können z.B. die Methanogenen schon bei niedrigen Konzentrationen von Sauerstoff (weniger als 100 ppm), Ammoniak (Shihwu et al., 2003) oder Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) gehemmt werden und beeinträchtigen dadurch die Qualität des produzierten Biogases. Die Methanogenen, bekannt als strikt anaerob, brauchen für deren Wachstum ein sehr negatives Redox-Potential (- 300mV; Hungate, 1967). Außerdem spielen andere Parameter wie pH-Bereich (6,5-7,5), Temperaturoptimum (mesophil oder thermophil), Salinität (Optimum zwischen

1,5-3M Na<sup>+</sup>), Spurenelemente (Nickel, Kobalt, Molybdän, Eisen, Selen, Wolfram etc...) oder Schlammalter und Struktur der Biozönose eine wichtige Rolle bei der Vergärung. Als geschwindigkeitsbestimmende Faktoren der Vergärung gelten die Hydrolyse von organischen Substraten (Stärke, Proteine, Cellulose, Fette) und die heterotrophe Produktion von Methan aus Essigsäuren (ATV, 1994).

Weiterhin ist für den stabilen Prozessablauf ein ausgewogenes C/N-Verhältnis des eingesetzten Substrates wichtig. Ist dieses Verhältnis zu hoch (viel C und wenig N), kann der vorhandene Kohlenstoff von der Biozönose nicht vollständig umgesetzt werden und es wird mögliches Methanpotenzial nicht genutzt. Im umgekehrten Fall kann es durch Stickstoffüberschuss zur Bildung von Ammoniak (NH<sub>3</sub>) kommen, das schon in geringen Konzentrationen die Bakterien in ihrem Wachstum hemmt und sogar zum völligen Zusammenbruch der gesamten Bakterienpopulation führen kann ("Handreiche Biogas-Gewinnung und -Nutzung" (AUTORENKOLLEKTIV; HRSG. FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. 2004).



<u>Abb. 2</u>: Vergärungsprozess und deren Bakteriengruppen.

Die mikrobielle Gemeinschaft in Biogasanlagen wurde bisher meistens mit den klassischen mikrobiologischen Kultivierungsmethoden untersucht und charakterisiert. In den letzten Jahren aber kommen immer häufiger kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden zur Anwendung. Diese neuen Methoden werden zurzeit speziell für die Anwendung in der Biogastechnologie optimiert. Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR; DeLong E., 1992) von 16S rDNA/rRNA Sequenzen (Woese C., 1987), die Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA/rRNA (Woese C., 1987; Amann et al., 1995), die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung Technik (FISH; Amann R., 1995; Alm et al., 1996; Joux et al., 2000; Harmsen et al., 1996; Davenport et al., 2000; Pernthaler et al., 2002; Crocetti et al., 2005; Raskin et al., 1994; Amann et al., 2000) sowie die Denaturierende und Temperatur Gradient Gel Elektrophorese (DGGE/TGGE; Muyzer et al., 1998a; Muyzer et al., 1998b; Muyzer G., 1999; Sigler et al., 2004) werden heutzutage häufig in der Biogastechnologie angewendet, um die Struktur und Aktivität der Mikroorganismen näher zu untersuchen.

#### I.4.2.3 Mikrobiologische Defizite

Im Bereich der Anaeroben-Technologie gibt es immer noch ein großes Defizit an Daten über Struktur, Zusammensetzung und Aktivität der mikrobiellen Biozönose in Abhängigkeit z.B. von Inputmaterialien, Gärbedingungen, Fermentergrößen und –typen (Rabaey et al., 2005; Maukonen et al., 2003; Angelidaki et al., 2000). Auch aktuelle Daten über Prozessoptimierung und Steuerungskonzepte für Landwirtschaftliche Biogasanlagen sind kaum bekannt (Yadvika et al., 2004; Weiland P., 2003; McKendry P., 2002a; McKendry P., 2002b; McKendry P., 2002c).

Deshalb sollen im Rahmen dieses Projektes zuerst Untersuchungen zu den so genannten "Übertragbarkeitseffekten" durchgeführt werden. Dabei werden neben den klassischen Kultivierungsmethoden auch die molekularbiologischen Techniken angesetzt.

Die dabei ermittelten Ergebnisse dienen als Basisdaten zur Bearbeitung von Fragen im Bereich der Inputmaterialien. Bei der Vergärung ist die Biozönose einer der wichtigsten Parameter. Struktur und Zustand der Biozönose spielen eine entscheidende Rolle beim Gasertrag und der Gasqualität und damit in der wirtschaftlichen Rentabilität einer Biogasanlage.

#### I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik in Freising-Weihenstephan durchgeführt. Der Projektpartner hat dabei die Konstruktion, Betrieb und physikalisch-chemischen Analysen und Untersuchungen durchgeführt und wird die Ergebnisse in einem eigenen Abschlussbericht präsentieren. Zusammenführende Ergebnisse werden in einem gemeinsamen Kapitel dargestellt.

## II. Eingehende Darstellung

### II.1 Darstellung der erzielten Ergebnissen

#### II.1.1 Versuchsaufbauten

#### A- Aufbau und Betrieb einer Anaeroben-Kammer

Es wurde für die Arbeit unter anaeroben Bedingungen, für die Herstellung von anaeroben Medien und für die Animpfung und Ausplattierung von Anreicherungen, eine schon bestehende Anaeroben-Kammer (Fa. Coy Laboratory Prod. Inc., Michigan) vervollständigt, Gasleitungen gelegt und die komplette Anlage in Betrieb genommen (Abb. 3).



<u>Abb.</u> <u>3</u>: Anaeroben-Kammer am Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft, TU München.

In der Anaeroben-Kammer befinden sich zwei Palladium-Katalysatoren, die kontinuierlich anaerobe Bedingungen gewährleisten und regelmäßig durch Inkubation bei 160°C für 2-4 Stunden regeneriert werden. Die Anaeroben-Kammer wird regelmäßig und bei Bedarf mit dem Gas-Leck-Detektor auf Löcher und undichte Stellen geprüft, um die Kammer aus Sauerstoffdichtigkeit hin zu überwachen.

#### **B-** Aufbau einer Gasstation

Eine Gasstation wurde zur Herstellung der Anaeroben-Flüssigmedien und –Lösungen sowie für den Austausch der Gasphase hergestellt (Abb. 4). Die Gasflaschen wurden in Sicherheitsschränken untergebracht. Die Gasstation und die Sicherheitsschränke sind mit einem Abluftsystem gekoppelt.



<u>Abb. 4</u>: Gasstation zur Herstellung der Anaeroben-Medien und Gasaustausch.

## C- Konstruktion von Anaeroben-Reaktoren

Es wurden für die Isolierung und Ausplattierung der anaeroben Bakterien 3 kleine Spezial-Reaktoren angefertigt (Abb. 5). Die Reaktoren sind gasdicht und für einen Überdruck bis 2-3 Bar geeignet. An dem Reaktordeckel sind ein spezielles hitzebeständiges Thermometer, eine Andockstelle zum Umgasen, sowie eine Stelle für die Gasprobenahme aufgebracht.



<u>Abb. 5</u>: Anaeroben-Reaktoren zur Isolierung und Ausplattierung von anaeroben Mikroorganismen.

#### II.1.2 Aufbau der mikrobiologischen Methoden

Ein schematisches Protokoll zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften ist in Abbildung 6 dargestellt. Es umfasst die verschiedenen Experimenttypen und Schritte, die ausgeführt werden sollen, um die Struktur und Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen (DeLong E., 2002; Zhou et al, 2002; Bernard et al., 2001; Dabert et al., 2002; Dahllöf I., 2002; Torsvik et al., 2000; Torsvik et al., 1998; Sekiguchi et al., 2001; Amann et al., 200; Muyzer G., 1999; Wagner et al., 1993).





Für den Test und die Optimierung der mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden wurden Fermenterproben aus der mesophilen Biogasanlage vom Hof Pellmeyer (Eggertshof, bei Freising) verwendet, da diese Anlage ähnliche Gärbedingungen wie die geplante Pilotanlage aufweist. Zusätzlich wird im Rahmen unserer Übertragbarkeitsversuche ein Fermenter (900 m<sup>3</sup>) der Pellmeyer Biogasanlage mit untersucht.

## A- Herstellung von Anaeroben-Flüssigmedien

Für die Anreicherung und Isolierung von anaeroben Bakterien aus den Fermenteranlagen sowie für die Kultivierung der Kulturstämme wurden verschiedene anaerobe Flüssigmedien nach Balch et al. (1979) hergestellt (Abb. 7). Die Herstellung der Medien erfolgte nach den Protokollen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).



<u>Abb. 7</u>: Anaeroben-Flüssigmedien mit entsprechenden Gasphasen für Anreicherung, Isolierung und Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen.

#### B- Kultivierung von Referenz Bakterienstämmen

Bestimmte Bakterien-Stämme werden als positive Kontrollen für die physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen benötigt. Diese Bakterien wurden als für die Substratvergärung verantwortlich beschrieben und kommen in Habitaten wie Biogasanlagen, Klärschlamm oder Pansen vor.

Folgende Bakterien-Stämme von der DSMZ wurden bisher in den geeigneten Medien kultiviert (Tab. 1):

Hydrolytische Bakterien								
Bakterien-Stämme	Habitat	Eigenschaften						
Ruminococcus albus	Rinderpansen	Cellulose-Abbau, 37°C,						
		anaerob						
Lachnospira multipara	Rinderpansen	Protein-Abbau,, 37°C, anaerob						
Bacteroides cellulosolvens	Kommunaler	Cellulose-Abbau, 30°C,						
	Abwasser-Schlamm	anaerob						
Acidogene Bakterien								
Bakterien-Stämme	Habitat	Eigenschaften						
Flavobacterium succinicans	Aquarium	Glucose-Fermentation, 25-						
		30°C, fakultativ						
Bifidobacterium ruminantium	Rinderpansen	Glucose-Fermentation, 37°C,						
		anaerob						
Delftia acidovorans	Abwasser Kläranlage	Protein-Abbau, 30°C, anaerob						
Selenomonas ruminantium	Rinderpansen	Zucker-Fermentation, 37°C,						
subsp. lactilytica		anaerob						
Butyrivibrio fibrisolvens	Rinderpansen	Zucker-Fermentation, 37°C,						
		anaerob						
Schwartzia succinivorans	Rinderpansen	Succinat-Abbau, 37°C, anaerob						
Acetogene Bakterien								
Bakterien-Stämme	Habitat	Eigenschaften						
Acetobacterium dehalogenans	Reaktor-Schlamm	Medium 787, 25°C, anaerob						
Acetobacterium wieringae	Reaktor-Schlamm	Medium 135, 30°C, anaerob						
Syntrophobacter fumaroxidans	Methanogene-Granulat-	Medium 684, 37°C, anaerob						
	Schlamm							
Syntrophomonas wolfei subsp.	Reaktor-Schlamm	Medium 213, 35°C, anaerob						
wolfei								

Sulfatreduzierer (SRB)								
Bakterien-Stämme	Habitat	Eigenschaften						
Desulfococcus multivorans	Reaktor-Schlamm	Medium 197, 35°C, anaerob						
Desulfobacterium	Mariner Schlamm	Medium 383, maxi 26°C,						
autotrophicum		anaerob						
Desulfomonile tiedjei	Reaktor-Schlamm	Medium 521, 37°C, anaerob						
Methanogenen								
Bakterien-Stämme	Habitat	Eigenschaften						
Methanosarcina barkeri	Reaktor-Schlamm	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> , Formiat,						
		Methanol, Methylamine und						
		Essigsäure als Substrat, 30-						
		40°C, anaerob						
Methanobacterium bryantii	Reaktor-Schlamm	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> und Formiat						
		als Substrat, 37-39 °C, anaerob						
Methanobrevibacter	Rinderpansen	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> und Formiat						
ruminantium		als Substrat 37-39°C, anaerob						
Methanomicrobium mobile	Rinderpansen	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> und Formiat						
		als Substrat, 40°C, anaerob						
Methanocorpusculum	Reaktor-Schlamm	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> und Formiat						
aggregans		als Substrat, 35-37 °C, anaerob						
Methanoseata conncilii	Reaktor-Schlamm	Verwendet Essigsäure als						
		Substrat, 35-40°C, anaerob						
Methanococcus vanielii	Marinsediment	Verwendet H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> und Formiat						
		als Substrate, 35-40°C, anaerob						

<u>**Tab. 1**</u>: Diese Bakterienstämme wurden als Kontrolle bei den verschiedenen Analysen verwendet.

### II.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen

## A- Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH Technik ist verglichen mit der DGGE eine schnelle und einfache Methode. Mit der FISH Methode können bestimmte Gruppen von Mikroorganismen mit Hilfe von fluoreszierenden Oligonukleotidsonden, die an der ribosomalen RNA binden, identifiziert werden (Amann et al, 1990, 1995 und 2000; Devereux et al., 1992; Raskin et al., 1994a und 1994b; Harmsen et al., 1996a und 1996b).

Hierbei wurden Fermenterproben sowie Kontrollstämme zuerst mit 100 % Ethanol oder mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert (Amann et al., 1995). Die Zellfixierung ermöglicht einen Schutz der ribosomalen RNA. Daran schließt durch die in Situ Hybridisierung der Zellen unter bestimmten Stringenz-Bedingungen eine entsprechende Oligonukleotidsonden an (Amann et al., 1995; Wagner et al., 1993).

Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops kann die in Situ Hybridisierung je nach Oligonukleotidsonde und Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen und anschließend mit einer speziellen Software analysiert werden (Leitch et al., 1994).

### 4% PFA (Paraformaldehydlösung) nach Amann et al. (1995)

- 30 ml  $H_2O$  bidest. bei 60 °C erwärmen.
- 2 g PFA zugeben.
- Lösen von PFA durch Zugabe von einem Tropfen 1M NaOH und schnell rühren. Nach 1-2 min die Lösung wird farblos.
- Zugabe von 16,6 ml 3xPBS.
- pH mit HCL auf 7,2 einstellen.
- Die PFA-Lösung mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 50 ml auffüllen.
- Die PFA-Lösung mit 0,2 μm Einwegfilter Sterilfiltrieren und schnell bei 4 °C kühlen.
- Die PFA-Lösung kann man 1-2 Tage bei 4°C lagern.

#### **Proben Fixierung**

Die in Situ Hybridisierungsmethode hängt direkt von der Qualität der ribosomalen Nukleinsäure (RNA) ab. Deshalb mussten die Proben fixiert werden, um die Aktivität von endogenen **Nukleasen** sowie anderer abbauender Enzyme zu reduzieren oder sogar zu hemmen. Die Fixierung konserviert die Zellstruktur und verhindert damit den weiteren Verlust der Nukleinsäure.

Für die Fixierung wurden frische Proben verwendet. Diese Proben wurden je nach Bedarf entweder mit 4% PFA oder mit Ethanol fixiert (Amann et al., 1995).

#### **Enzymatische Behandlung**

Die Fixierung mit quervernetzenden Mitteln wie PFA ermöglicht zwar den Erhalt der kompletten Zellstruktur, hindert aber die Oligonukleotidsonden daran, in die Zelle einzudringen. In diesen Fällen war es erforderlich, die Permeabilität der Zellen vor der in Situ Hybridisierung durch enzymatische Behandlungen zu erhöhen

Um die Permeabilität der Zellen zu erhöhen, wurden Behandlungen mit Lysozym (Pernthaler et al., 2002; Beimfohr et al., 1993), Lipase/ Proteinase K (Davenport et al., 2000), Mutanolysin (Bunthof et al., 2001) und HCl-Pepsin (Leitch et al., 1994) durchgeführt.

#### **DAPI Lösung**

Wenn nicht anderes erwähnt, wurde DAPI Pulver (4<sup> $\prime$ </sup>, 6-Diamono-2-Phenylindol) mit sterilem Wasser zu einer Arbeitskonzentration von 70 µg/ ml aufgelöst. Die Lösung wurde bis zur Verwendung in einem abgedunkelten Gefäß bei -20 °C (Amann et al., 2000)

#### **Oligonukleotidsonden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) angefordert. Wenn nicht anders besagt, wurden die Sonden mit sterilem Wasser zu einer Endkonzentration von 50 ng/ µl verdünnt.

Die in der Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotidsonden stammen aus der Literatur oder online von der **ProbeBase** Datenbank (Loy et al., 2003; <u>http://www.microbial-ecology.de/probebase</u>).

Abhängig von den Versuchen wurden die Oligonukleotidsonden entweder nicht markiert oder fluoreszenzmarkiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe Indocarbocyanine (Cy3), Indodicarbocyanine (Cy5) und 6-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Fluos) dienten für die Fluoreszenz-Markierung der Oligonukleotidsonden.

Nr.	Sonden	Sonden-Eigenschaften und RNA-Position
1	UNIV1390	alle Organismen (16S, 1390-1407)
2	EUK515	Eukarya
3	EUB338	Bacteria (16S, 338-355)
4	EUB338 II	Planctomycetales (16S, 338-355)
5	EUB338 III	Verrucomicrobiales (16S, 338-355)
6	ALF1b	α-Proteobacteria (16S, 19-35)
7	BET42a	$\beta$ -Proteobacteria (23S, 1027-1043)
8	GAM42a	γ-Proteobacteria (23S, 1027-1043)
9	SRB385	$\delta$ -Proteobacteria (16S, 385-402)
10	SRB385Db	Manche Sulfatreduzierer der $\delta$ -Proteobacteria und einige
		Nicht Sulfatreduzierer (16S, 385-402)
11	DSV698	Desulfovibrionaceae (16S, 698-717)
12	DELTA495a	$\delta$ -Proteobacteria (16S, 495 – 512)
13	HGC69a	Actinobacteria (23S, 1901-1918)
14	LGC354a	Firmicutes mit niedrigen GC mol % (16S, 354-371)
15	LGC354b	Firmicutes mit niedrigen GC mol % (16S, 354-371)
16	LGC354c	Firmicutes mit niedrigen GC mol % (16S, 354-371)
17	ARC344	Archaea (16S, 344- 363)
18	ARC915	Archaea (16S, 915-934)
19	CREN499	Meiste Crenarchaeota (16S, 499-516)
20	EURY498	Meiste Euryarchaeota (16S, 498-511)
21	MX825	Methanosaeta thermoacetophila, Methanothrix soehngenii,
		Methanosaeta concilii (16S, 825-847)
22	SARCi654	Methanosarcina (16S, 645-663)
23	MSMX860	Methanosarcina spp., Methanococcoides spp.,
		Methanolobus spp., Methanohalophilus spp.,
		Methanosaeta spp., meistens Essigsäureverwerter (16S,
		860-880)
24	MB310	Methanobacterium spp., Methanobrevibacter spp.,
		Methanosphaera spp., Methanobacteriales; meistens
		H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> -Verwerter (16S, 310-331)
25	MC1109	Methanococcales, verwenden meistens H2/CO2 and

		Formate (16S, 1109-1128)						
26	MG1200	Methanomicrobium spp., Methanogenium spp.,						
		Methanoculleus spp., Methanospirillum spp.,						
		Methanocorpusculum spp., Methanoplanus spp., meistens						
		H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> und Formiatverwerter (16S, 1200-1220)						
27	MPOB1	Propionsäure oxidierende Bakterien						
28	EUBA7	Eubacterium limosum, Fermentierer und Acetogene						
		Bakterien.						
29	SYNE4	Synergists jonesii, Fermentierer und Acetogene Bakterien.						
30	Amx820	Anaerob Ammonium oxidierenden Bakterien, Candidatus						
		'Brocadia anammoxidans' und Candidatus 'Kuenenia						
		stuttgartiensis' (16S, 820-841).						

Tab. 2: Die für die FISH Analysen selektieren Oligonukleotidsonden.

### **Referenz Stämme**

Es wurden zur Durchführung der FISH Versuche und bei der Überprüfung der Oligonukleotidsonden, Kontrollstämme von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) angefordert und nach den DSMZ Protokolle kultiviert. Die verwendeten DSMZ Stämme sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

## **Homogenisierung**

Vor der Hybridisierung wurden die Proben 5 min eiskalt homogenisiert (2000 rpm, RW20 DZM, Jahnke & Kunkel, IKA<sup>®</sup> Labortechnik, München). Danach wurden die Proben mit dem Ultraschallgerät für 5 min bei Raumtemperatur behandelt.

## Vorbereitung der Gelatine Objektträgern

Die Beschichtung der Objektträger mit Gelatine erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

- Teflonbeschichtete Objektträger mit Aussparungen werden mit Spülmittel entfettet und danach mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen.
- 2. Die Objektträger werden für kurze Zeit (ca. 1 min) in 80 % Ethanol eingetaucht und dann schräg getrocknet.

- Die Objektträger mit einer dünnen Gelatineschicht (0,1 % Gelatine und 0,01% Kaliumchromsulfat), die vorher im Wasserbad (50- 60 °C) gelöst wurde, wurden mit Hilfe einer Pipette überzogen und anschließend schräg getrocknet.
- 4. Die Objektträger können dann direkt verwendet oder schräg in einer Objektträger-Box bei Raumtemperatur gelagert werden.

## **Hybridisierungsversuche**

Die in Situ Hybridisierungsversuche erfolgten nach einem Protokoll von Wagner M. (1995; modifiziert).

## B- Mikroskopische Analyse mit Hilfe des CLSM

Nach der Hybridisierung wurden die Proben mikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops 510 Meta (CLSM, Abb. 8) untersucht.



<u>Abb. 8</u>: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta) am Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft, TU München. Diese Ausrüstung ermöglicht uns eine bessere Analyse der Biozönose in den verschiedenen Fermentertypen.

Die Fermenterproben stellen sehr komplexe Umweltsysteme dar und können nicht ohne weiteres analysiert werden. Deshalb wurden Vorversuche zur Optimierung der Proben-Fixierung, der Penetration der Oligonukleotidsonden sowie der Hybridisierungsbedingungen durchgeführt. Die Abbildungen 9 bis 12 zeigen einige Ergebnisse der Optimierungsversuche für Reinkulturen und Fermenterproben.



Abb. 9: In Situ Hybridisierung von Methanobacterium bryantii (DSM862) mit den Sonden Arch915-Cy5 (rot gefärbt) und Eury498-Cy3 (gelb gefärbt). Für die Gegenfärbung wurde 4´,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau gefärbt) verwendet. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert. Cy3 ist für das Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanine und Cy5 für Indodicarbocyanine.



<u>Abb. 10</u>: Die Zellen des Stammes *Methanosarcina barkeri* (DSM800) wurden mit **Arch915-Cy5** (rot gefärbt) und **Eury498-Cy3** (Gelb gefärbt) Sonden hybridisiert. **DAPI** (blau gefärbt) dient für die Gegenfärbung. Die Zellen wurden mit 4% PFA für 5 Stunden fixiert.



Abb. 11: Die homogenisierte, in Ethanol fixierte und mit Lysozym behandelte Fermenterprobe F2-4 wurde mit den Oligonukleotidsonden EUB338-Cy3 (Gelb gefärbt) und Arch915-Cy5 (rot gefärbt) in Situ hybridisiert. Für die Gegenfärbung wurde DAPI (blau gefärbt) angesetzt.



Abb. 12: Die homogenisierte und mit Ethanol fixierte Fermenterprobe F2-4 wurde mit den Oligonukleotidsonden EUB338 (I+II+III)-Cy3 (gelb gefärbt) und Arch915-Cy5 (rot gefärbt) in Situ hybridisiert. DAPI (blau gefärbt) wurde für die Gegenfärbung angesetzt.

#### C- Untersuchungen zur Extraktion von Nukleinsäuren (DNA/RNA)

Wegen der komplexen mikrobiellen Zusammensetzung der Fermenterproben und den PCR inhibierenden Inhaltsstoffen (wie Huminsäuren, Harnstoff, Fettsäuren oder Alkoholen) war die qualitative sowie quantitative Extraktion der gesamten DNA/RNA, repräsentativ für alle mikrobiellen Populationen, optimierungsbedürftig.

Laut Literaturangaben, hängt die Qualität der Nukleinsäure sehr viel von der ausgewählten Extraktionsmethode (Trochimchuk et al., 2003; LaMontagne et al., 2002; Wilson I. G., 1997; Zhou et al., 1996; Tebbe et al., 1993; Miller et al., 1999; Leff et al., 1995; Kuske et al., 1998; Hurt et al., 2001; Stach et al., 2001). Deshalb wurden Optimierungsversuche zur Extraktion von chromosomaler DNA aus Fermenterproben der Pellmeyer Anlage mit Hilfe von verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden durchgeführt. Sie ergaben, dass die von uns leicht modifizierte Methode von der Firma BIO101 (Fast DNA Spin Kit for Soil) bisher die besten Ergebnisse lieferte (Lebuhn et al., in Druck). Die Qualität und Menge der extrahierten chromosomalen DNA wurde mit Hilfe der Gel Elektrophorese (Sambrook et al., 1989) überprüft (Abb. 13 und 14).



<u>Abb. 13</u>: Chromosomale DNA aus der Pellmeyer Fermenteranlage. M: 100 bp Marker, 1 bis 4 sind Fermenterproben.



## **Optimierung des Zellaufschluss**

Bei den durchgeführten Lysierungsversuchen wurde gezeigt, dass Zellen von Stamm *Ruminococcus albus* (DSM20455) innerhalb von 10s Behandlung mit der **FastPrep** Gerät fast komplett (80-90%; Abb. 15) lysiert wurden, während diese von *Acetobacterium wieringae* (DSM1911) erst nach 120s vollständig lysiert wurden (Abb. 15). Für die Methanogene waren mindesten 120s für komplette Lysierung nötig.

Zur vollständigen Zell-Lysierung bei unseren Fermenterproben ist eine kumulative 90-120s Behandlung mit FastPrep Gerät erforderlich (Abb. 15).

Die Lysierungseffizienz hängt auch von der Art des zu lysierenden Bakteriums ab.

	Probe	Zell-Lysierung (%)							
		0 s	10 s	20 s	30 s	60 s	90 s	120 s	
1	Methanosarcina barkeri (DSM800)	0	20-30	30-40	50-60	70-90	> 95	100	
2	Acetobacterium wieringae (DSM1911)	0	0-10	20-30	50-60	70-80	80-90	100	
3	Ruminococcus albus (DSM20455)	0	80-90	100	100	100	100	100	
4	Selenomonas ruminantium (DSM2872)	0	80-90	100	100	100	100	100	
5	Acetobacterium dehalogenans (DSM11527)	0	30-40	40-60	60-70	> 95	100	100	
6	Flavobacterium succinicans (DSM4003)	0	80-90	100	100	100	100	100	
7	Fermenter probe (SBI-1)	0	10-20	20-40	40-50	60-70	<b>80-90</b>	100	
8	Methanobacterium bryantii (DSM862)	0	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	

<u>Abb. 15</u>: Test zur Zell-Lysierung mit Hilfe der FastPrep Gerät (BIO 101). Verschiedene Kontrollstämme wurden mitgetestet.

#### D- Amplifizierung der 16S rDNA aus der Fermenter

und Für ein sauberes PCR-Produkt Optimierung gutes war eine der Amplifikationsbedingungen von Nukleinsäuren aus Fermenteranlagen erforderlich. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, Bovine Serum Albumin (BSA), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) und T4-Gen 32-Protein verwendet und festgestellt, dass die PCR-Ansätze mit DMSO (5% Endkonzentration) und MgCl<sub>2</sub> (5,5 mM Endkonzentration) die besten Ergebnisse lieferte (Jiang et al., 2005; Schmalenberger et al., 2001; Kreader C. A., 1996; Vahjen et al., 1994; Miller D. N., 2001; Moreira D., 1998; Suzuki et al., 1996; Ishii et al., 2001). Zum Test der Eigenschaften der 16S rDNA Amplifikation aus der extrahierten chromosomalen DNA/RNA wurden bisher folgende Primer-Paare für die DGGE Analyse eingesetzt (Tab. 3):

Die Bestimmung der Qualität und Menge des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe der Gel Elektrophorese (Abb. 16 und 17).

Bezeichnung	Primer-Sequenz	Mikroorganismen
Uni21-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Archaea und Bacteria
Uni1492-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	
Bac341-F*	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria
Bac907-R	CCG TCA ATT C <b>M</b> T TT <b>R</b> AGT TT	V3-Region
Bac1055-F*	ATG GCT GTC GTC AGC T	Bacteria
Uni1392-R	ACG GGC GGT GTG TAC	V9-Region
Arch344-F*	ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA	Archaea
Arch915-R	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	V3-Region
Arch931-F*	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	Archaea
Uni1492-R	ACG GGC GGT GTG TAC	V9-Region
*= GC-Clamp	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC	5'-GC-reiche Sequenz
	CCG CCG CCC CCG CCC G	

<u>**Tab. 3**</u>: Die für die PCR-DGGE Analysen verwendeten Primer.



<u>Abb. 16</u>: Amplifikation der 16S rDNA mit Hilfe des *Archaea*-spezifischen Primersystems Arch931-F und Uni1492-R
M: 100 bp Marker; 1: Negativ-Kontrolle; 2 -5: Fermenterproben; 6: *Methanoseata concilii*;
7: *Methanobacterium bryantii*;
8: *Methanosarcina barkeri*



## E- Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Die verschiedenen Sequenzen des PCR-Produkts wurden mit Hilfe der DGGE Methode nach einer ansteigenden Stringenzreihe getrennt (Abb. 18A und B; Muyzer and Smalla, 1998a; Muyzer et al., 1998b, Muyzer G., 1999).



<u>Abb. 18A</u>: DGGE Profil der 16S rDNA Banden der Pellmeyer Biogasanlage. Bac1055-F und Uni1392-R Primer-Set wurden verwendet. 1 bis 4 sind Fermenterproben.



<u>Abb. 18B</u>: DGGE Profil der 16S rDNA Banden von Proben aus der Pellmeyer Biogasanlage. Arch344-F und Arch915-R Primer-Set wurden verwendet. 1 bis 4 sind Fermenterproben.

Das DCode System für DGGE (**The DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System**) und das **DCode Electrophoresis Reagent Kit** für DGGE/CDGE von der Firma BioRad Laboratories (Life Science Group, Hercules, California, USA) wurden hier für die Analyse angesetzt.

Die verschiedenen 16S rDNA/RNA Banden wurden vom Gel ausgeschnitten, gereinigt und reamplifiziert.

# F- Klonierung, Sequenzierung und phylogenetische Einordnung der 16S rDNA/RNA Klone

Zur Bestimmung der mikrobiologischen Struktur in den Fermenteranlagen wurden die Amplifikate mit dem **TOPO TA Cloning Kit** (Invitrogen) kloniert und mit spezifischen Primern sequenziert (Medigenomix). Die Sequenzen wurden mit Hilfe von entsprechenden Softwares (**Chromas 2** und **BioEdit**) sowie online mit den nächsten verwandten Sequenzen verglichen (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>). Anschließend wurden die Klone phylogenetisch eingeordnet und die Stammbäume mit Hilfe der **Phylip 3.65** und **TreeView** Softwares (<u>http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</u>) erstellt.

## G- Kultivierungsversuche mit der Multi-probable-number (MPN) Methode

Für die Durchführung wurde das DSM330 Medium (für Pansen Bakterien) mit 2-3% Agar nach dem DSMZ Protokoll angesetzt

## G1- DSMZ Medium 330: (RUMEN BACTERIA MEDIUM )

Mineral Lösung	38,000	ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3000	g
Trypticase peptone (BBL)	2,0000	g
Yeast extracts	0,5000	g
Fettsäure Mischung	3,1000	ml
Haemin	1,0000	mg
Glucose	0,5000	g
Maltose	0,5000	g
Cellobiose	0,5000	g
Stärke (gelöst)	0,5000	g
Glycerol	0,5000	g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0000	g
Resazurin	1,0000	mg
Cysteine-HCl x H <sub>2</sub> O	0,2500	g
$Na_2S \ge 9 H_2O$	0,2500	g
MilliQ Wasser	960,00	ml

Der pH wurde bei 6,7 - 6,8 eingestellt und die Gasphase mit  $H_2/CO_2$  aufgepresst.

Mineral Lösung:		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,00	g
NaCl	12,00	g
(NH4) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,00	g
$CaCl_2 \ge H_2O$	1,60	g
$MgSO_4 \ge 7 H_2O$	2,50	g

#### **Fettsäure Mischung**

MilliQ Wasser

Acetic acid	4,25	ml
Propionic acid	1,50	ml
Butyric acid	1,00	ml
n-Valeric acid	0,25	ml
iso-Butyric acid	0,25	ml
DL-2-Methyl butyric acid	0,25	ml
iso-Valeric acid	0,25	ml

Die Platten wurden in den anaeroben Töpfen gestapelt mit  $H_2/CO_2$ -Gas aufgepresst und anschließend bei 37 °C inkubiert.

## **G2- Anaerobia Medium**

Minerallösung	18,7	ml
Selenit-Wolframat Lösung	1	ml
Spurenelementlösung SL9	1	ml
Natriumhydrogencarbonat	5,0	g
Vitaminlösung A	0,5	ml
Vitamin B12-Lösung	1	ml
Hefe-Extrakt	1	g
Peptone	2	g
Cellulose	5	g
Sludge Fluid	20	ml
Na-Essigsäure	1	g
$MgSO_4 \ge 7 H_2O$	0,5	g
Resazurinlösung	1	ml
MilliQ Wasser	auf 1000	ml

Medium in 2 x 1L Schott-Flasche aufteilen und mit  $N_2/CO_2$  für 15 min begasen. Addieren von 0,5g/L Natriumsulfid, 0,5g/L L-Cysteine und 20g/L Agar dann für weitere 5 min
begasen mit niedrigem Überdruck (wegen der Schaumbildung), pH-Wert messen und gegebenenfalls mit 2 M HCL oder 1 M NaOH auf pH 7,0 – 7,2 einstellen. Medium in Serumflaschen umfüllen oder für Agarplatten direkt und ohne Überdruck in der Flasche bei 121 °C autoklavieren. Bei 55-60 °C Flaschen aus dem Autoklav nehmen und direkt auf Platten in der Anaerobkammer aufteilen.

Die Platten wurden dann mit  $H_2/CO_2$  Gas-Mischung 3 mal aufgespült (die letzte auf 2 Bar Überdruck), für 1 Woche inkubiert und anschließend die aufgewachsenen Kolonien ausgezählt.

#### **G3-** Anaerobmedium für Sulfatreduzierer

Minerallösung	18,7	ml
Selenit-Wolframat Lösung	1	ml
Spurenelementlösung SL9	1	ml
Natriumhydrogencarbonat	5	g
Vitaminlösung A	0,5	ml
Vitamin B12-Lösung	1	ml
SRB-Mix	10	ml
Titan-Citratlösung	4	ml
Resazurinlösung	1	ml
MilliQ Wasser	auf 1000	ml

#### **G4- Anaerob Medium für Homoacetogene**

Minerallösung	18,7	ml
Selenit-Wolframat Lösung	1	ml
Spurenelementlösung SL9	1	ml
Natriumhydrogencarbonat	5,0	g
Vitaminlösung A	0,5	ml
Vitamin B12-Lösung	1	ml
Trimethoxybenzoat	10	ml
Titancitratlösung	4	ml
Resazurinlösung	1	ml
MilliQ Wasser	auf 1000	ml

### **G5- Methanogenen Medium**

Minerallösung	18,7	ml
Selenit-Wolframat Lösung	1	ml
Spurenelementlösung SL9	1	ml
Natriumhydrogencarbonat	5,0	g
Vitaminlösung A	0,5	ml
Vitamin B12-Lösung	1	ml
Methanogenen Mix	10	ml
Natriumsulfidlösung	2,6	ml
Resazurinlösung	1	ml
MilliQ Wasser	auf 1000	ml

#### **G6- Stammlösungen für Mineralmedium**

Die Stammlösung für den Ansatz des Anaerobmediums wurde nach dem Protokoll von Widdel und Bak (1992) hergestellt. Die Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Mineralmedium (50-fach konzentriert)			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,0	g	
NH <sub>4</sub> Cl	13,5	g	
NaCl	50,0	g	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20,5	g	
KCl	26,0	g	
$CaCl_2 \ge 2H_2O$	7,5	g	
MilliQ Wasser	auf 1000,0	ml	

#### Selenit-Wolframat Lösung

Die angesetzte Selenit-Wolframat Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C (Tschech und Pfennig 1984).

Selenit-Wolframat Lösung

NaOH

200 mg

$Na_2SeO_3 \ge 5 H_2O$	6	mg
$Na_2WO_4 \ge H_2O$	8	mg
destilliertes Wasser	auf 1000	ml

# Spurenelementlösung SL9

Bei der Ansetzung der Spurenelementlösung SL9 Lösung wurde das pH mit 1 M NaOH Lösung auf 6,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte anaerob bei 4 °C (Tschech und Pfennig 1984).

Spurenelementlösung SL 9			
Nitrilotriessigsäure (NTA)		12,8	g
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		1,5	g
$CoCl_2 \ge 6 H_2O$		190	mg
$MnCl_2 \ge 2 H_2O$		80	mg
ZnCl <sub>2</sub>		70	mg
$Na_2MoO_4 \ge H_2O$		36	mg
$NiCl_2 \ge 6 H_2O$		24	mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		6,0	mg
$CuCl_2 \ge 2 H_2O$		2,0	mg
destilliertes Wasser	auf 100	0,0	ml

#### **Vitaminlösungen**

Die Vitaminlösungen wurden 2000fach konzentriert angesetzt. Beide Vitaminlösungen wurden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert (Pfennig 1978).

### Vitaminlösung A

4-Aminobenzoesäure		4	mg
D(+) Biotin		1	mg
Nikotinsäure		10	mg
Ca-D(+)-Pantothenat		5	mg
Pyridoxamindihydrochlorid		15	mg
Thiaminchloriddihydrochlorid		10	mg
destilliertes Wasser	auf	100	) ml

#### Vitamin B12-Lösung

Cyanocobalamin		5	mg
destilliertes Wasser	auf	100	ml

#### **Reduktionsmittel**

Die Kulturmedien wurden je nach experimenteller Fragestellung entweder mit einer Natriumsulfidlösung oder mit Titan(III)-Verbindungen (Zehnder und Wuhrmann 1976) reduziert. Der Ansatz der Natriumsulfidlösung erfolgte in einem 25 ml Schraubdeckelfläschchen. Dazu wurden 0,9 g Na<sub>2</sub>S in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Das Wasser wurde vor Gebrauch durch Kochen (10 Minuten) entgast. Der Gasraum des Gefäßes wurde mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gespült und die Lösung im dicht verschlossenen Gefäß autoklaviert.

Zur Synthese von Ti(III)-Citrat wurden 5,14 ml 15 % Ti(III)-Chlorid (technische Reinheit Merck-Schuchard, Darmstadt) und 10 ml 1 M Natriumcitrat unter einer Stickstoffatmosphäre zusammengegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von festem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 7,0 eingestellt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Darstellung von Ti(III)-NTA erfolgte entsprechend mit 1 M NTA (Nitrilotriessigsäure) anstelle von Natriumcitrat (Adrian 1999). Die Ti(III)-Lösung wurde mit einer Glasspritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter (Isopore GTTP 0,2  $\mu$ m, Millipore Eschborn) in sterile 2 ml Eppendorf Capes überführt und aufbewahrt. Einmal geöffnete Gläschen wurden kein zweites Mal verwendet.

#### Ansetzen des Anaerobmediums

Minerallösung	18,7	ml
Selenit-Wolframat Lösung	1	ml
Spurenelementlösung SL9	1	ml
Natriumhydrogencarbonat	5,0	g
Vitaminlösung A	0,5	ml
Vitamin B12-Lösung	1	ml

Natriumsulfidlösung	2,6	ml
Resazurinlösung	0,5	ml
MilliQ Wasser	auf 1000	ml

Medium in einer Schott-Flasche mit  $N_2/CO_2$  für 20 min begasen, pH-Wert messen und gegebenenfalls mit 2 M HCL oder 1 M NaOH auf pH 7,0–7,2 einstellen, in Serumflaschen umfüllen und anschließend bei 121 °C autoklavieren. Bevor das Medium für die Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt wird, muss es für mindestens 24 Stunden ausgleichen.

#### H- Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl der Bakterien wurde durch eine mikroskopische Zählung bestimmt. Die Probe aus dem Fermenter wurde entsprechend in einer phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS Puffer) verdünnt und mit dem Teflonstab bei 2000 rpm homogenisiert (RW20 DZM Janke & Kinkel IKA Labortechnik, Staufen, Germany). 100  $\mu$ l verdünnte Probe mit 30  $\mu$ l 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100  $\mu$ g/ ml) vermischt und mindestens 20 min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine Filtration der Probe mit GTBP Isoporefilter (0,2  $\mu$ m, 25 mm; Millipore). Der Filter wurde auf Objektträger in Citifluor (Antifading-Reagenz) eingebetet. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und integriertem Okular mit Zählquadrat. Dabei wurden mindestens 20 Gesichtsfelder (10 x 10 Einzellquadrate, entspricht 0,156 mm) ausgezählt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte dann nach folgender Gleichung:

Zellzahl / ml = \_\_\_\_\_ x Xm x V

A-Filter

A-Zähl

mit: V = Verdünnungsfaktor A-Filter = Wirksame Filterfläche: 346 mm<sup>2</sup> A-Zähl = Fläche eines Zählfeldes: 0,024 mm<sup>2</sup> Xm= mittlere Zellzahl pro Feld. Mit diesem Verfahren konnte die Gesamtzellzahl bestimmt werden, eine Aussage über die Anzahl kultivierbarer Zellen war damit jedoch nicht möglich.

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) nach Amann et al. (1995)

130 mM	NaCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
рН 7,2	

Die PBS-Lösung wird bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

#### I- Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen

Die Anzahl der kultivierbaren Zellen wurde mit Most-Probable-Number (MPN) Tests geschätzt (Gavin und Cummings 1978). Die Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen erfolgte mit Melasseschlempe (10 %, vol/vol) als Substrat. Dabei wurde ausschließlich die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bewertet.

Die Abschätzung der Anzahl kultivierbarer Zellen einzelner physiologischer Gruppen im Reaktor ließ sich mit Hilfe von selektiven Substraten, beziehungsweise durch den Nachweis spezifischer Stoffwechselprodukte in MPN Ansätzen durchführen.

Für homoacetogene Bakterien ist ein colorimetrisches Verfahren beschrieben, bei dem die Bildung eines farbigen Komplexes die Entstehung typischer Stoffwechselprodukte von Homoacetogene anzeigt (Harriott und Frazer 1997).

Homoacetogene Bakterien können aromatische und aliphatische Methylether als Kohlenstoffquelle nutzen und die Methoxygruppen durch eine O-Demethylierung zur Synthese von Essigsäure einsetzen (Bache und Pfennig 1981). Durch die O-Demethylierung von methoxylierten Substraten entstehen Hydroxylgruppen.

Benachbarte Hydroxylgruppen bilden mit Ti(III) einen farbigen Komplex, der colorimetrisch nachgewiesen werden kann (Liu 1997). Für den Nachweis homoacetogener Bakterien wurde Trimethoxybenzoat als selektive C-Quelle eingesetzt. Titancitrat diente als Reduktionsmittel. Bei der Inkubation bildete sich ein gelber Hof um die Kolonien, die zur O-Demethylierung fähig waren. Es wurden ausschließlich die Kolonien ausgewertet, die eine Gelbfärbung des Mediums verursachten, auch wenn diese Gelbfärbung bei weiterer Inkubation wieder verschwand.

Die Aktivität der Sulfatreduzierer ließ sich mit Hilfe von Eisenchlorid nachweisen. Das Eisenchlorid bildet mit dem entstehenden Sulfid einen schwarzen Niederschlag und dient als Nachweis für die biogene Produktion von Sulfid. Um die biogene Sulfidproduktion zu messen, musste auf Natriumsulfid als Reduktionsmittel verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment anstelle von Natriumsulfid Titancitrat als Reduktionsmittel eingesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente ein Gemisch aus verschiedenen Substraten, die von sulfatreduzierenden Bakterien verwertet werden können (siehe Unten die Zusammensetzung). In diesem Ansatz wurden nur Kolonien ausgewertet, die eine charakteristische Schwarzfärbung zeigten. Nur sulfidogene Organismen wurden in die Auswertung einbezogen.

Arbeitskonzentration Flüssigkultur		<u>Tiefagar</u>
NatriumEssigsäure	20 mM	12 mM
Natriumformiat	20 mM	12 mM
Natriumbenzoat	20 mM	12 mM
D,L -Lactat (60 %)	10 mM	6 mM
Ethanol (absolut)	10 mM	6 mM
Natriumpropionat	10 mM	6 mM
Natriumbutyrat	10 mM	6 mM

#### Zusammensetzung des SRB-Mix Substrats

Als Substrat für methanogene Archaea wurde ein Gemisch aus Essigsäure, Formiat, Trimethylamine und Methanol (je 10 mM) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Atmosphäre mit Wasserstoff angereichert. Die Bestimmung der Zellzahl von Methanogenen erfolgte nicht in Tiefagarshakes sondern in Flüssigkultur, damit das gebildete Methan ungehindert in die Gasphase diffundieren konnte.

#### II.1.4 Ergebnisse und Diskussion für Meilenstein 1 (In Situ Hybridisierung):

- Herstellung der Standardbiozönose
- Übertragbarkeitsversuche
- Versuche mit dem Praxissubstrat

Die Proben stammen aus den jeweiligen Fermenter, die unserem Partner von der Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik in Freising-Weihenstephan in den Meilensteinen aufgelistet hat.

### II.1.4.1 Probenahme

Es wurden im Rahmen der Übertragbarkeitsversuche regelmäßig Proben aus den verschiedenen Fermentertypen entnommen (Abb. 19). Dabei wurden für die mikrobiologische Untersuchung jedes Mal Proben aus den 2L Batch, 36L Batch- und Durchflussfermenter, 3500L Batch- und Durchflussfermenter sowie aus dem Praxisfermenter (900000L) entnommen. Bei der Beprobung wurden parallel die Temperatur und der pH-Wert erfasst.



<u>Abb. 19</u>: Die für die mikrobiologische Analyse von dem LfL-Projektpartner betriebenen Fermenter.

Um einen besseren Vergleich zwischen mikrobiologischen und physikalisch-chemischen Daten sowie die Fermenterbezeichnungen zu vereinheitlichen wurden die in folgender Tabelle 4 zusammengestellten Versuchsvariantenkürzel unseres LfL-Partners (Freising-Weihenstephan) verwendet.

Fermenterkürzel	Beschreibung	Zweck	
Versuchsvariantenkürzel	Füllung		
SB1	3500L-Fermenter, Durchflussbetrieb. Füllstand ca. 3000 L, "Standardbiozönose- fermenter"	Produktion eines gleich bleibenden Grundsubstrates (Standardbiozönose "SB") für die einzelnen Gärtests	
3500LD SB	Befüllung mit Gülle und TMR		
SB2	3500L Fermenter, Durchflussbetrieb, Füllstand 2800 L	Vergleich Durchflussfermenter verschiedenen Typs bei gleich bleibender Beschickung	
3500LB SB	3500L Fermenter, Batchbetrieb, Füllstand 2800 L	Vergleich Batchfermenter verschiedenen Typs bei gleich bleibender	
3500LD SBW+Substrat	Beschickung mit SB + Testsubstrat wie "Gruppe A"-Fermenter	Beschickung	
A1, A2, A3 (Gruppe A)	36 L-Fermenter, Durchflussbetrieb, Füllstand 28 L	Einfluss des Substrates im Vergleich zur Nullprobe (Gruppe A)	
36LD SBW+Substrat	Beschickung mit SB + Testsubstrat ,,wie ,,SB2"- Fermenter		
B1, B2, B3 (Gruppe B)	36 L-Fermenter, Durchflussbetrieb, Füllstand 28 L	Nullprobe der 36 L Durchflussversuche mit Substrat (Gruppe B)	
36LD SBW	Beschickung mit Grundsubstrat SB ohne Versuchssubstrat		
C1	36 L-Fermenter, Batchbetrieb, Füllstand 28 L	Nullprobe der 36 L Batch- Versuche	
36LB SBW	Füllung mit SB und Wasser		
C2+C3	36 L-Fermenter, Batchbetrieb Füllstand 28 I	Versuchsvariante mit Substrat im Vergleich zur	
36LB SBW+Substrat	Füllung mit SB, Wasser und Substrat	Nullprobe C1, Vergleich des Fermentertyps im Gegensatz zu den gleichbefüllten 36LB SBW+Substrat	

D1-D5 (Gruppe D)	2 L-Fermenter,	Vergleich des Fermentertyps
	Batchbetrieb, Füllstand	im Gegensatz zum
	1,8 L	gleichbefüllten 2LB
2LB SBW+Substrat	Füllung mit SB, Wasser und	SBW+Substrat
	Substrat	
Praxisfermenter	Füllung mit Praxissubstrat,	Vergleich des Fermentertyps
	Füllstand 900000 L	mit Praxissubstrat

Tab.4: Übersicht zu den Versuchsfermentern und deren Einsatz

## II.1.4.2 Proben Beschreibung

Die Fermenterproben waren im Allgemeinen dickflüssig, dunkelbraun gefärbt und bestanden hauptsächlich aus Rindergülle und dem Standard Tierfutter TMR (Total-Mix-Ratio). Die Proben hatten am Anfang sehr stark nach Gülle gerochen, was später mit der Vergärung nachließ (Abb. 19).

Bei den Proben von Maissilage hat sich immer eine Schwimmschicht gebildet, die meistens aus Maiskörnern bestand. Im Vergleich zu den Durchflussfermentern, waren die aus den Batchfermentern stammenden Proben meistens dünnflüssig mit einem starken Faulgeruch. Die Proben aus den Durchflussfermentern waren hingegen meistens dickflüssig.

## II.1.4.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine hohe Diversität in den verschiedenen Fermentern. Verschiedene Formen wie Stäbchen, Kokken, Bazillen oder Filamente wurden mikroskopisch identifiziert (Abb. 20).



**<u>Abb. 20:</u>** Mikroskopisches negatives Bild einer 2 L Fermenterprobe nach einer Woche Vergärungszeit.

#### II.1.4.4 In Situ Analyse bei der Herstellung von Standardbiozönose

Die Herstellung der Standardbiozönose (siehe auch Endbericht 2005 vom Partner der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik in Freising-Weihenstephan; LfL-Partner) wurde auch mit mikrobiologischen Analysen begleitet.

Für die Herstellung der Standardbiozönose wurde TMR (Total Mixed Ration= Mischfutter für Milchkühe) und Rindergülle (20:80, oTS Verhältnis) als Substratmischung verwendet (siehe auch Endbericht 2005 vom LfL-Partner; Freising-Weihenstephan).

Das TMR Futter besteht aus (Quelle: LfL-Partner; Freising-Weihenstephan):

_	Maissilage	43%
_	Grassilage	18%
_	Heu	4%
_	Wasser	9%
_	Sojapellets	7%
_	Getreideschrot	12%
_	Kuhkorn (Mineralstoffmischung für Rinder)	7%

Es wurden in regelmäßigen Abständen Fermenterproben abgenommen, entsprechend bearbeitet und mit der FISH Technik und CLSM Mikroskopie analysiert. Die spezifisch für die einzelnen Bakterien Populationen geeigneten Oligonukleotidsonden wurden in Tabelle 2 aufgelistet.

Die FISH Untersuchungen zeigten hier eine hohe Diversität in der Biozönose (Abb. 21A) mit Dominanz der Domäne *Bacteria* auf Kosten der *Archaea* Populationen darunter auch die Methanogene (Abb. 21B). Das lag vermutlich daran, dass im Fermenter reichlich organische Substrate wie Stärke, Proteine und Fett zur Verfügung standen, die die verschiedene Bakterien Populationen der Vergärungsphasen (wie LGC, HGC und *Alfa-Proteobacteria*; Abb. 22 und 23) als Substrate verwenden konnten und dadurch das weitere Wachstum gefördert wurde (Abb. 21B). Diese Vermutung ließ sich durch die chemische Zusammensetzung des TMR Futter (Quelle: LfL-Partner; Freising-Weihenstephan) deutlich bestätigen. Hier zeigte die Analytik einen hohen Anteil an Stärke (21,3%), Rohprotein (16,7%), Rohfett (2,1%) und Zucker (ca. 0,8%). Mit der Zeit sank die Zellzahl der meisten Bakterienpopulationen. Dies gilt besonders für die LGC, HGC und *Alfa-*

Proteobacteria Gruppen (Abb. 21B). Ab Tag 41 wurden die Übertragbarkeitsversuche gestartet.

Eine Hybridisierung mit Sonden für die *Archaea* Subdomäne *Euryarchaeota* (Eury499) und *Crenarchaeota* (Cren498) ergab, dass ausschließlich mit der *Euryarchaeota* spezifischen Sonde Zellen detektiert werden konnte. *Crenarchaeota* ließen sich hier nicht nachweisen.

Bei der Zellzahlbestimmung stellte die Domäne *Bacteria* mit bis zu 85% der gesamten mit DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid) gefärbten Zellen in den verschiedenen Reaktoren die Mehrheit. Für die Identifizierung der *Bacteria* Populationen wurden EUB338 (I, II und III) Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Sonde Arch915 wurde zur Identifizierung der *Archaea* eingesetzt (Abb. 21A).

Es wurden 4 Bakteriengruppen für die weitere mikrobiologische Analyse ausgewählt, um den Gärprozess bei unterschiedlichen Prozessparametern zu untersuchen. Es handelt sich hier um:

– **Die Gram positiven Bacteria mit niedrigem GC-Gehalt (LGC):** Treten hauptsächlich bei der Hydrolyse aber auch in den acidogenen und acetogenen Phasen auf. Viele Vertreter dieser Gruppe (Clostridien) wurden aus Biogas Anlagen identifiziert und isoliert (Akila et al., 2003).



<u>Abb. 21A</u>: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dominanten aktiven Bakteriengruppen detektiert in den verschiedenen Fermentertypen mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenz-Sonden. Grün für Färbung mit Cy3-Sonden und Rot für Cy5-Sonden. Gegenfärbung für alle Mikroorganismen mit 4,6-Diamino-2phenylindolhydrochlorid Lösung (DAPI, blau). Die Skalierungslinie beträgt 5 µm. – Die Gram positiven Bacteria mit hohem GC-Gehalt (HGC): Kommen auch in der Hydrolyse, Acidogenen und Acetogenen Phase vor. *Bifidobacterium ruminantium* gehört zu den HGC Bacteria und wurde aus Rinderpansen isoliert (Biavati et al., 1991).

– Die Sulfatreduzierer (SRB): Strikt anaerobe Bakterien, aber weniger Sauerstoffempfindlich als die Methanogenen. Die SRB können Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Anders als die Methanogene, haben die SRB ein sehr breites Substratspektrum und können Stoffe wie organische Säuren, Fettsäuren, Alkohole und Wasserstoff als Elektronendonator verwenden und dadurch abbauen. Nach den Methanogenen sind auch die SRB eine sehr wichtige Gruppe, weil sie häufig in Konkurrenz in Bezug auf den Wasserstoff zu den Methanogenen stehen. Auf der anderen Seite sind die SRB nützlich für die Methanogene, weil sie in der Acetogenen Phase Essigsäure für die Methanogene produzieren können. Die SRB können hauptsächlich in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

- Die Gruppe 1: Vertreten durch Gattungen wie Desulfovibrio, Desulfomonas, Desulfotomaculum, Archaeoglobus und Desulfobulbus. Diese Gruppe verwendet Substrate wie Lactat, Pyruvat, Ethanol oder einige Fettsäuren als C- und Energie-Quelle und Sulfat wird zum Hydrogensulfid reduziert.
- Die Gruppe 2: Als Vertreter kommen hier Gattungen wie Desulfobacter, Desulfobacterium, Desulfococcus, Desulfonema und Desulfosarcina vor. Diese Gruppe spezialisiert sich in der Oxidation von Fettsäuren und Essigsäure und in der Reduktion von Sulfaten zu Sulfiden.

– Die Methanogene: sind allein verantwortlich f
ür die Methanproduktion w
ährend der Verg
ärung. Diese Gruppe tritt in der letzten Phase "Methanogenese" der Verg
ärung auf und spielt w
ährend dessen eine Schl
üsselrolle.



<u>Abb.21B</u>: Populationsdynamik in dem 3500L Durchflussfermenter während der Herstellung der Standardbiozönose (SB1). Die Bakterienverhältnisse in der Fermenterprobe (%).

Es zeigte sich bei der Zellzahlbestimmung und Umrechnung der DAPI (4,6-Diamino-2phenylindolhydrochlorid) Verhältnisse von der FISH Analysen (Abb. 21C), dass die ausgewählten Bakteriengruppen von der Substratzusammensetzung sowie der Art und Größe des Fermenters beeinflusst werden können. Bei der ersten Woche der Vergärung war die Biozönose noch dünn und brauchte noch Zeit, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren (Abb. 21C). Nach etwa einem Monat exponentieller Entwicklung (Abb. 21C) stabilisierten sich die Verhältnisse der ausgewählten Bakteriengruppen innerhalb der Biozönose. Die Sulfatreduzierer (SRB) zum Beispiel wuchsen verhältnismäßig schnell und zeigten die höchste Zelldichte nach etwa 3 Wochen der Vergärung. Dabei lag die Zellzahl der SRB bei etwa 6 x  $10^8$ /ml. Später nach etwa 6 bis 7 Wochen stabilisierte sich die Biozönose und die Zellzahl der SRB lag bei etwa  $2,5 \times 10^8$ /ml, während die Methanogenen für den gleichen Zeitraum bei etwa  $2 \times 10^8$ /ml lagen.



<u>Abb. 21C</u>: Entwicklung der Standardbiozönose im 3500L Durchflussfermenter (SB1) bei der Co-Vergärung von TMR. Zellzahl der ausgewählten Bakteriengruppen.



Abb.22: Die LGC Bacteria bei der Herstellung der Standardbiozönose (SB1). Diese Population wurde mit den spezifischen Oligonukleotidsonden (LGC345a+b+c) identifiziert.

Die Abbildung 21C zeigte auch, dass die Zelldichte der SRB mit steigender Zellzahl der LGC Bacteria, die häufig in der Hydrolyse vorkommen, ansteigt. Eine Erklärung dafür ist, dass die SRB für ihr Wachstum Produkte der LGC Bacteria verwenden können (Abb. 22).

# II.1.4.4.1 Entwicklung der Methanogenen bei der Herstellung der Standardbiozönose (SB1)

Die Methanogenen besitzen mehrere Koenzyme ( $F_{420}$ ,  $F_{430}$ , Methanopterin, Methanofuran, HS-HTP und Koenzym M), die spezifisch und eigenartig bei der Methanogenen sind. Der Koenzym  $F_{420}$  z.B. spielt bei der Methanogenese die Rolle als Elektronendonator bei der Reduktion von CO<sub>2</sub> und die Produktion von Methan. Die oxidierte Form des Koenzym  $F_{420}$  absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 420nm und fluoresziert dadurch blau-grün (Madigan et al., 2002). Diese Fluoreszenz ermöglicht eine schnelle mikroskopische Identifizierung der Methanogenen.

Die Population der Methanogenen wurde bei der Entwicklung der Biozönose näher untersucht und war am Anfang der Co-Vergärung wenig vertreten (3-4%; Abb. 21B und 21C) und hauptsächlich durch *Methanococcus* und *Methanosarcina* Populationen repräsentiert. Andere für solche Gärsysteme bekannte Methanogenen wie *Methanosaeta* oder *Methanobacterium* Zellen wurden nicht detektiert (Raskin et al., 1994a und 1994b). Die Methanogene tauchen in der Regel etwas später auf, weil sie Zwischenprodukte (wie H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, Essigsäure Formate) der vorherigen Vergärungsphasen benötigen.

In der Abbildung 23 wurde die Entwicklung der *Methanosarcina* Population begleitet und ein deutliches Wachstum dieser Population festgestellt.

Die *Methanosarcina* Zellen wurden am Anfang der Vergärung beim 3500 L Durchflussfermenter (SB1) kaum identifiziert, während *Methanococcus* Zellen mit einer Dichte zwischen 2% und 3% innerhalb der Methanogenen dominierten (Abb. 21B). Später wuchs die Zellzahl der *Methanosarcina* Population sehr stark und dominierte innerhalb der Methanogenen nach etwa 4 bis 5 Wochen (Abb. 21B und 23).



<u>Abb. 23:</u> Negativ mikroskopische Aufnahmen der FISH Analysen zeigten die Entwicklung der *Methanosarcina* Population (Pfeile) im 3500L Durchflussfermenter bei der Herstellung der Standardbiozönose (SB1). Die Zellen wurden mit 4,6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI) gefärbt.

Bei dem Anfahrbetrieb des 3500L Durchflussfermenters zur Herstellung der Standardbiozönose (SB1) wurde eine Populationsverschiebung innerhalb der Methanogenen deutlich beobachtet und methodisch hier begleitet (Abb. 21B, 23). Diese Beobachtung zeigt auch, dass die Mikrobiologie von den Gärbedingungen, wie z.B. der Prozesstechnik und der Substratzusammensetzung, stark beeinflusst werden kann.

Auch ist aus der Literatur bekannt, dass die Methanogenen strikt anaerob wachsen und sehr sauerstoffempfindlich sind. Sauerstoff kann schon bei niedriger Konzentration (weniger als 10 ppm) die Methanogenese hemmen. Diese Hemmung wird durch eine irreversible Zerlegung des  $F_{420}$ -Hydrogenase Komplexes verursacht, weil vermutlich eine protektive Superoxide Dismutase fehlt (Garcia et al., 2000).

# II.1.4.5Entwicklung der Biozönose in den verschiedenen Fermentern während<br/>der Übertragbarkeitsversuche

Die FISH Untersuchungen zeigten hier auch eine hohe Dominanz der Domäne *Bacteria* auf Kosten der *Archaea* Populationen (Abb. 22B und 24). Diese Beobachtung bestätigt

hiermit die Literaturangabe über Populationsverteilung in solche Gärsysteme (Madigan et al., 2002; Garcia et al., 2000; Santegoeds et al., 1999; Zinder S. H., 1993).

Bei der Zellzahlbestimmung machten die Domäne *Bacteria* bis zu 85% der gesamten mit DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid) gefärbten Zellen aus. Für die Identifizierung der *Bacteria* Populationen wurden EUB338 (I, II und III) Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Sonde Arch915 wurde zur Identifizierung der Domäne *Archaea* eingesetzt (Abb. 22B und 24).



<u>Abb. 24</u>: Die Verhältnisse zwischen *Archaea* und *Bacteria* in den verschiedenen Fermentertypen während der Übertragbarkeitsversuche.

Die dominanten Bakteriengruppen in den 3500 L, 36 L und 2 L Fermentern waren die *Deltaproteobacteria* und darunter die Sulfatreduzierer (SRB) mit bis zu 25% der gesamten mit DAPI gefärbten Zellen (Sonden Delta495a, SRB385 und SRB385Db), die *Alfa-Proteobacteria* bis zu 20% (Sonde Alf1b; Abb. 25), die Gram positiven *Bacteria* mit niedrigen GC-Gehalt (LGC *Bacteria*) bis zu 20% und identifiziert mit Sonden LGC354 (a, b und c). Die wenig dominanteren Gruppen waren hier die Gram positiv *Bacteria* mit höheren GC-Gehalt (HGC *Bacteria*) mit bis zu 4% (Sonden HGC69a und HGC69-Competitor), die *Clostridium Cluster I* (Sonde ClosI 864) bis zu 7% und die *Archaea* bzw. auch die Methanogenen (3-4%) und identifiziert mit Sonden Arch915, Eury498, Sarci645, MB310, MC1109 und MG1200.



<u>Abb. 25</u>: *Alfa-Proteobacteria* in der Gülle mit der Sonde Alf1b detektiert (Pfeile).

# II.1.4.5.1EntwicklungderMethanogenenwährendderÜbertragbarkeitsversuche in den Batchfermentern

Bei den Übertragbarkeitsversuchen wurde auch festgestellt, dass sich die *Methanosarcina* Population sowohl in den 3500L als auch in den 36L und 2L Batchfermentern weiter entwickelt hatte und in allen 3 Fermentergrößen dominierte (Abb. 26). Die Zellzahl der *Methanococcus* Population ging hingegen sehr stark zurück.

Die acetotrophe *Methanosarcina* Arten haben bisher das breiteste Substratspektrum innerhalb der Methanogenen und können folgende Substrate abbauen:

_	4 H2+CO2	$\longrightarrow$	CH4 + 2H2O
_	4 Formiat	$\longrightarrow$	CH4 + 3CO2 + 2H2O
_	2 Ethanol + CO2	$\longrightarrow$	CH4 + 2 Essigsäure
_	Methanol + H2	$\longrightarrow$	CH4 + H2O
_	4 Methanol	$\longrightarrow$	3CH4 + CO2 + 2H2O
_	4 Methylamine + 2H2O	$\longrightarrow$	3CH4 + CO2 + 4NH4
_	4 Trimethylamine + 6H2O	$\longrightarrow$	9CH4 + 3CO2 + 4NH4
_	2 Dimethylsulfide + 2H2O	$\longrightarrow$	3CH4 + CO2 + H2S
_	2 Dimethylamine + 2H2O	$\longrightarrow$	3CH4 + CO2 + 2NH4
_	4 2-Propanol + CO2	$\longrightarrow$	CH4 + 4 Acetone + 2H2O
_	Essigsäure	$\longrightarrow$	CH4+CO2

*Methanosarcina* Arten kommen in verschiedenen natürlichen Ökosystemen vor. Dabei wird die organische Materie zu Methan (70%) und Kohlendioxid (30%) abgebaut.

In der Regel konkurrieren die Methanogene Bakterien für deren Substrate mit 3 metabolischen Gruppen (Zinder S. H., 1993):

- 1. Die Sulfatreduzierer
- 2. Die Acetogene
- 3. und Eisenreduzierer (Fe<sup>3+</sup>)

Die Konkurrenz Situation zwischen den Methanogenen und die anderen 2 Gruppen entsteht meist in substratarme Habitate wie Bodensediment oder Marinensediment.



Abb. 26: negativ mikroskopische Aufnahmen der FISH Analysen zeigten die Entwicklung der *Methanosarcina* Population in den 3500L, 36L und 2L Batchfermentern bei der Übertragbarkeitsversuche. Die Zellen wurden mit 4,6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI, 70ng/ml) gefärbt.

# II.1.4.5.2Übertragbarkeitsversuche und Entwicklung der Biozönose:<br/>Vergleich zwischen den 3500L, 36L und 2L Batchfermentern

Bei dem Vergleich zwischen den 3500L, 36L und 2L Batchfermentern wurde festgestellt, dass in den ersten 4 bis 5 Wochen und in allen 3 Batchsystemen die Methanogenen sich deutlich weiter entwickelt haben. Die Zellzahl der Methanogenen entwickelte sich von etwa 2-3 x  $10^7$ /ml am Anfang der Vergärung auf etwa 2-3,5 x  $10^8$ /ml nach 4 Wochen (Abb. 27, 28 und 29). Bei den 3500L erreichte die Zellzahl der Methanogenen schon nach einer Woche das Maximum und lag mit deren Zellzahl bei ca. 3 x  $10^8$ /ml. Das lag vermutlich daran, dass die Biozönose des Inokulums aus dem gleichen Fermentertyp und der gleichen Fermentergröße stammt und sich dadurch für ein derartiges Milieu bereits einigermaßen adaptiert hatte.

Diese gute Entwicklung wurde auch bei den Sulfatreduzierern (SRB) beobachtet. Hier ging die Zellzahl von ca. 3 x  $10^7$ /ml auf ca. 2-3 x  $10^8$ /ml in den 36L und 2L Batchfermentern (Abb. 27, 28 und 29). In den 3500L Batchfermentern hingegen lag die Zellzahl der SRB bei etwa 5 x  $10^7$ /ml.





Diese gute und etwa stabile Entwicklung dieser beiden Populationen lag vermutlich daran, dass durch den Batchprozess die Entwicklung der Biozönose wenig gestört wurde. Dabei wurde zum Beispiel die Sauerstoffdiffusion komplett unterdrückt, während im Durchflusssystem dieses Problem durch regelmäßige Substratzufuhr häufig beobachtet wurde.

Archaim Uri und Carsten Krause (1993) schrieben, dass das Verhältnis Propionsäure zu Essigsäure als Indikator für Prozessinstabilität verwendet werden könnte. Hill et al. (1987) schlugen vor, die Essigsäure Konzentration von mehr als 800 mg/l oder das Verhältnis Propionsäure zu Essigsäure von mehr als 1:4, als Indikator einen Absturz des Gärprozesses zu verwenden.

Am Anfang der Vergärung war die Essigsäure Konzentration in den 2L, 36L und 3500L Batchfermentern sehr weit über 800 mg/l und lag auf Grund der vorangegangenen Substratzufuhr bei etwa 3200 mg/l (Quelle: LfL-Partner ; Freising-Weihenstephan). Diese relativ hohe Essigsäurekonzentration hatte vermutlich die Entwicklung der Biozönose in den Batchsystemen nicht besonders gestört. Betrachten wir die Entwicklung der Methanogenen so sehen wir, dass diese Population sich in den ersten erfassten 4 Wochen weiter entwickelt hat, während die Zelldichte der anderen Bakteriengruppen eher sank (Abb. 27, 28 und 29).



<u>Abb. 28</u>: Entwicklung von ausgewählten Bakteriengruppen im 36L Batchfermenter während der Übertragbarkeitsversuche.

Diese hohe Essigsäurekonzentration erklärt zum Teil die Dominanz der *Methanosarcina* Population in den Fermentern, da die bisher bekannten Essigsäure Verbraucher nur zu den Gattungen *Methanosarcina* oder *Methanosaeta* gehören (Schmidt et al., 2000).

Die starke Entwicklung bei der Methanogenen- und Sulfatreduzierer - Population lag vermutlich auch daran, dass bei der Vergärung reichlich Zwischenprodukte (wie  $H_2$ ,  $CO_2$ , Essigsäure, Formate, etc...) zur Verfügung standen, so dass diese Produkte nicht als

limitierende Faktoren vorhanden waren und dadurch das Wachstum dieser Bakteriengruppen nicht verhinderten.

Auf der anderen Seite haben die Sulfatreduzierer die Fähigkeit, komplexe organische Substrate abzubauen  $H_2$  zu verwerten und CO<sub>2</sub> sowie Essigsäure zu produzieren (Scheid et al., 2001).

Die anderen Bakteriengruppen wie HGC und LGC Bacteria, die häufig in der hydrolytischen Phase vorkommen, wuchsen in der ersten Woche nicht gut. Die Zellzahl der LGC Bacteria stieg bei 2L und 3500L Fermenter in der ersten Wochen von ca. 8 x  $10^{6}$ /ml auf ca. 5-6 x  $10^{7}$ /ml, später sank die Zellzahl und lag die ganze Zeit der Vergärung bei etwa 1 x  $10^{7}$ /ml (Abb. 27, 28 und 29).



Batchfermenter während der Übertragbarkeitsversuche.

Es wurde bei diesen Übertragbarkeitsversuchen beobachtet, dass die Zelldichte der SRB mit steigender Zellzahl der LGC Bacteria häufig stieg. Das lag vermutlich daran, dass die

Zwischenprodukte von der Hydrolyse, an der vermutlich die LGC Bacteria (wie viele Clostridien Gruppen) auch beteiligt sind, für das Wachstum der SRB verwendet wurde. Die SRB sind laut Literaturangaben robuster als die Methanogenen, weil die SRB die Möglichkeit haben, andere Abbauwege für ihr Wachstum zu verwenden (wie Fermentation oder syntrophisches Wachstum mit den Methanogenen; Santegoeds et al.; 1999). Die SRB können z.B. den Wasserstoff auch für die Sulfatreduktion nutzen und konkurrieren dabei mit den Methanogenen (Spanjer et al., 2002; Weijma et al., 2002).

Als Zusammenfassung für diese Übertragbarkeitsversuche konnte man mit wenigen Ausnahmen schon sagen, dass in den 2L, 36L Fermentern für die ausgewählten Bakteriengruppen sowohl qualitativ als auch quantitativ keine großen Unterschiede in der Populationszusammensetzung festgestellt werden konnten. In den 3500L hingegen wuchs z.B. die SRB Population deutlich unterschiedlich als bei den 2L und 36L Fermentern. Die Zellzahl der SRB sank in den 3500L Fermentern nach ca. 4 Wochen drastisch ab und lag nach 104 Tagen bei ca. 1x 10<sup>7</sup>/ml während bei den 2L und 36L Fermentern die Zellzahl nur langsam sank und nach 104 Tagen bei ca. 1x 10<sup>8</sup>/ml lag (Abb. 27, 28 und 29). Mit Ausnahme der Methanogenen sank generell die Zelldichte der 3 anderen ausgewählten Bakteriengruppen mit der Zeit ab. Eine Ausschöpfung des Substratspektrums in den Gärsystemen könnte als Erklärung für diese Zellzahlabnahme sein.

# II.1.4.6Analyse der Biozönose bei der Übertragbarkeitsversuche zum<br/>Praxisfermenter

Es wurden während der Vergärung von Praxissubstrat ausgewählte Bakteriengruppen mit Hilfe der FISH Technik und CLSM Mikroskopie näher untersucht.

Die Beschickungsration für den Praxisfermenter mit 900000L (Pellmeyer Biogasanlage, Eggertshof bei Freising) wurde je nach Anlieferung in der Vorgrube jeweils aus 32,5 Kubikmetern Inhalt eines anderen Praxisfermenters, ca. 2 Tonnen Maissilage und einer variablen Menge an Fettabscheiderfett, gemischt (Quelle: LfL-Partner). Diese Mischung diente als Praxissubstrat zur Fermenterbeschickung.



**<u>Abb.</u>** 30: Praxissubstratmischung aus der Vorgrube für die Fermenterbeschickung.

Die 3 Fermentier-Typen (Praxisfermenter mit 900000L, 3500L und 36L Durchflussfermentern) bekamen bei diesen Versuchen die gleiche Substrat- und Inokulmszusammensetzung und wurden bei gleicher Temperatur und pH betrieben.

Die Fermenterausstattung und der Anfahrbetrieb sowie die Prozesstechnik wurden im Endbericht des LfL-Partners (Freising-Weihenstephan) ausführlich dargestellt.

Der Inhalt der 3500L und 36L Fermentern stamm aus der Praxisfermenter und wurde aus einer Vorgrube der Praxisanlage abgefüllt (Abb. 30).

Bei den analysierten Bakteriengruppen handelt es sich hier auch um die Methanogenen, die Sulfatreduzierer (SRB), die Gram positiven Bacteria mit niedrigem GC-Gehalt (LGC Bacteria) und die Gram positiven Bacteria mit hohem GC-Gehalt (HGC Bacteria). Es wurde hier auch Rindergülle separat für den Vergleich untersucht.



<u>Abb. 31</u>: Nachweis der HGC Bacteria im Praxisfermenter mit Hilfe der Oligonukleotidsonde **HGC69a** (Pfeile). Die FISH Ergebnisse in den Abbildungen 32 bis 35 zeigten, dass mit weniger Ausnahmen die Entwicklung dieser Bakterienpopulationen in den 3 Fermentern für die ersten 3 Wochen einigermaßen ähnlich verlief. Die SRB waren am stärksten hier vertreten und die Zellzahl lag während der ganzen Gärprozess bei ca. 3-6 x 10<sup>8</sup>/ml. Die Methanogenen waren hier die zweite stärkste Population nach den SRB und deren Zellzahl erreichte etwa 2 bis 3 x 10<sup>8</sup>/ml (Abb. 32, 34 und 35). Bei der Methanogenen dominierte in allen 3 Fermentern die *Methanococcus* Population, während Zellen der *Methanosarcina* selten detektiert wurden (Abb. 34 und 36). Betrachtet man die Entwicklung der Methanogenen während der Übertragbarkeitsversuche mit dem Praxissubstrat, so kann man feststellen, dass die Entwicklung sowie Verschiebung innerhalb der Methanogenen von der Substratzusammensetzung sowie Prozesstechnik beeinflusst werden können.







Auch bei der FISH Analysen wurden Zellen der HGC Population sowohl im Praxisfermenter (Abb. 31) als auch in den restlichen Fermentern identifiziert (Abb. 32, 33 und 34) aber diese Population war im Vergleich zu den restlichen Populationen deutlich schwächer vertreten (Abb. 32, 33, und 34).



<u>Abb. 34</u>: Identifizierung der *Methanococcus* Zellen bei in Situ Hybridisierung mit der Sonde **MC1109** (Pfeile). Entwicklung der Biozönose im 36L Durchflussfermenter bei der Vergärung von Praxissubstrat.



<u>Abb. 35</u>: Entwicklung der Biozönose im 36L Durchflussfermenter bei der Vergärung von Praxissubstrat.

Diese gute Entwicklung der Methanogenen und SRB Populationen deuten vermutlich auf eine Anreicherung der Wasserstoffproduzierer (hydrolytische und Acetogene Bakterien so wie viele Clostridien) oder der Fettanreicherung in den Fermentern hin (siehe auch Versuche mit Rapsöl).

Auf der anderen Seite deutet die starke Entwicklung der Methanogenen in den Fermentern auch darauf hin, dass der Gärprozess sehr stabil und ausgeglichen verlief.

Auch ein Vergleich zwischen der Populationszusammensetzung in der Gülle und der Substratmischung (Mischung von der Vorgrube) am Anfang der Vergärung zeigt, dass die Bakterienpopulationen wie Methanogenen und SRB im Praxisfermenter dichter waren (Zellzahl über 4 x  $10^8$ /ml) als in der Gülle (Zellzahl etwa 1 x  $10^7$ /ml für Methanogenen und 2 x  $10^8$ /ml für SRB, Abb. 37). Die LGC Population hingegen war in der Gülle mehr vorhanden und zeigte eine Zellzahl von ca. 1 x  $10^8$ /ml (Abb. 37). Es ist in der Literatur schon bekannt, dass die Methanogenen auch in der Gülle identifiziert und detektiert wurden (Snell-Castro et al., 2005).



<u>Abb. 36</u>: *Methanococcus* Zellen bei in Situ Hybridisierung mit der Sonde MC1109 (Pfeile). Entwicklung der Biozönose im 3500L Batchfermenter bei der Vergärung von Praxissubstrat.



**<u>Hinweis:</u>** Die aus den Gärversuchen mit Praxissubstrat von den 36L, 3500L und Praxisfermenter ermittelten mikrobiologischen Ergebnisse können wegen technischen Schwierigkeiten bei der Substratbeschickung nur mit Vorbehalt betrachtet werden (Mitteilung des LfL-Partnes)

#### II.1.4.7 Ergebnisse und Diskussion (Meilenstein 2): Substrate Co-Vergärung

Im Rahmen des Meilensteins 2 wurden 3 Substrate bei der Co-Vergärung mikrobiologisch näher untersucht. Es handelt sich hier um Maissilage, Grassilage und Rapsöl.

Bei 2L und 36L Batchfermentern mit Maissilage war der pH-Wert manchmal im leicht sauren Bereich.

Die mikrobiologische Aktivität als Schlüsselfaktor während der Co-Vergärung von erneuerbaren Energien wie Mais, Gras und Öl in Biogasanlagen wurde bisher nur wenig untersucht.

Die Ergebnisse der FISH Analysen mit den Substraten wurden bei den verschiedenen Fermentern mit einander verglichen (Abb. 38).

Die Tabelle 5 zeigt die Eigenschaften der 3 bei der Co-Vergärung angesetzten Substraten (Quelle: LfL-Partner, Freising-Weihenstephan).

Substrat	Rohproteine (%TS)	Stärke (%TS)	Rohfett (%TS)	Rohfaser (%TS)
Maissilage	8,6	38,3	2,4	17,7
Grassilage	15,1	1,8	1,5	31,4
Rapsöl	ND	ND	98,6	ND

Tab. 5: Einige chemische Eigenschaften der 3 Substrate (LfL-Partner). ND: Nicht detektiert.

#### II.1.4.7.1 Entwicklung der Biozönose in den 3500L Durchflussfermentern

Die in Situ Hybridisierungsversuche der 3500L Fermenterproben mit den spezifischen Sonden für die jeweilige Bakteriengruppe ergab, dass bei der Co-Vergärung von Maissilage die Populationgruppen sehr unterschiedlich wuchsen. Bei den Methanogenen ging die Zellzahl nach einer Woche Maissilage Co-Vergärung von ca. 6 x  $10^6$ /ml auf 6 x  $10^7$ /ml (Abb. 39), was praktisch eine 10 fache Vermehrung bedeutet. Danach stabilisierte sich die Entwicklung dieser Population und stand für ca. 2 Wochen bei etwa 1 x  $10^8$ /ml (Abb. 39). Später stieg die Zellzahl dieser Population weiter und erreichte das Maximum nach etwa 64 Tagen Co-Vergärung bei ca. 4 x  $10^8$ /ml. Danach sank die Zellzahl dieser Population und lag am Ende der Co-Vergärung nur noch leicht unter 3 x  $10^8$ /ml (Abb. 39).



Abb. 38: Entwicklung der Domäne *Bacteria* (Sonde EUB338I+II+III) in den Fermentern mit Grassilage. Hier treten diverse Morphologien auf.

Die Abbildung 39 zeigt, dass die SRB am stärksten vertreten waren (Maximum der Zellzahl lag bei etwa 6 x  $10^8$ /ml am Tag 64), gefolgt von den Methanogenen (Maximum bei ca. 4,5 x  $10^8$ /ml bei Tag 64), und dann die LGC Bacteria mit einem Maximum bei ca. 2 x  $10^8$ /ml am Tag 64. Die HGC Bacteria waren hier die schwache Population mit einem Zellzahlmaximum bei etwa 5 x  $10^7$ /ml (Abb. 39). Diese Biozönose hat sich hier einigermaßen besser mit Maissilage entwickelt als mit Grassilage (Abb. 39 und 40). Das lag vermutlich daran, dass Maissilage einen hohen Anteil an Stärke (38,3% TS) hat und dadurch die Entwicklung der hydrolytischen Populationen der LGC und zum Teil der HGC Bacteria fördern konnte (Tab. 5). Auch die Tabelle 5 zeigt, dass Grassilage sehr wenig Stärke aufweist aber den höchsten Anteil an Rohfasern (31,9 % TS) hat. Rohfasern sind in der Regel schwer abbaubare Stoffe und bestehen aus sehr viel cellulosehaltigen Substanzen.



<u>Abb. 39:</u> Entwicklung von ausgewählten Bakterien Populationen bei der Co-Vergärung von Maissilage in einem 3500L Durchflussfermenter.



<u>Abb. 40</u>: Entwicklung von ausgewählten Bakteriengruppen bei der Co-Vergärung von Grassilage in einem 3500L Durchflussfermenter.

Stärke kann unter anaeroben Bedingungen von vielen hydrolytischen Bakterien wie *Clostridium sp., Eubacterium ruminantium, Streptococcus bovis, Selenomonas ruminantium* oder *Butyrivibrio fibrisolvens* abgebaut werden (Delbes et al., 2000; Marounek et al., 1986).

Bei Grassilage wuchsen die 4 Bakteriengruppen schlechter als bei Maissilage. Zwar blieb die Reihenfolge in der Stärke dieser Gruppen etwa ähnlich, die Zelldichte stieg zunächst für etwa 4 bis 5 Wochen. Danach knickte das Wachstum aller 4 Gruppen ab. Die Zellzahl lag nach 91 Tagen Co-Vergärung bei allen Gruppen unter 1 x 10<sup>8</sup>/ml (Abb. 40). Das lag an der fehlenden Fütterung der Fermenter nach etwa 70 Tage Co-Vergärung (Mitteilung des LfL-Partners).

Bei der Co-Vergärung von Rapsöl im 3500L Durchflussfermenter wurde bei den FISH Analysen festgestellt, dass die SRB die höchste Zellzahl erreichten (über 1 x  $10^9$ /ml). Auch die Methanogenen wuchsen ständig und ihre Zellzahl stieg nach 105 Tagen Co-Vergärung immer weiter und lag bei etwa 8 x  $10^8$ /ml. Die Zellzahl der anderen Bakteriengruppen, die LGC und HGC Bacteria, hingegen blieb während der ganzen Zeit der Co-Vergärung ziemlich konstant und lag unter 2 x  $10^8$ /ml (Abb. 41). Die Entwicklung der Methanogenen in den ersten 4 Wochen war eher schleppend, vermutlich lag das daran, dass diese Population, die vorher mit TMR aufgezogen wurde, für die Adaptation mit den neuen Substrat mehr Zeit gebraucht hat. Nach etwa 4-5 Wochen stieg die Zellzahl der SRB sowie der Methanogenen wieder und lag nach 105 Tagen bei etwa 2 x  $10^8$ /ml für die Methanogenen und 1 x  $10^9$ /ml für die SRB (Abb. 41).



<u>Abb. 41</u>: Entwicklung von ausgewählten Bakteriengruppen bei der Co-Vergärung von Rapsöl in einem 3500L Durchflussfermenter.





#### Entwicklung der einzelnen Bakteriengruppen in den 3500L Durchflussfermentern

Einen Vergleich der Biozönose Entwicklung im 3500L Durchflussfermenter mit den verschiedenen Substraten ergab, dass Methanogene mit Rapsöl und langfristig (nach etwa 5-6 Wochen) am besten gewachsen sind und damit die höchste Zellzahl nach 105 Tagen erreichten. Bei Maissilage und Grassilage hingegen sank die Zahl eher und war bei Grassilage am niedrigsten (Abb. 42).



Auf der anderen Seite wuchsen die Sulfatreduzierer (SRB) hier auch am besten mit Rapsöl. Die Zellzahl der SRB stieg stark und erreichte die Schwelle von  $10^9$ /ml. Die SRB war die einzige Bakteriengruppe, deren Zellzahl über  $10^9$ /ml stieg und dies nur bei Rapsöl (Abb. 43). Es ist bekannt, dass die SRB gut Fett abbauen können und dadurch auch Essigsäure und Wasserstoff produzieren (Madigan et al., 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei dem 3500L Fermenter das Rapsölsubstrat den SRB und Methanogenen zugute kam, da diese beiden Populationen am besten wuchsen (Abb. 37 bis 42). Am schlechtesten wuchsen beide Populationen bei Grassilage. Hintergrund hierfür ist, dass das Rapsöl besser von den SRB abzubauen war, als Maissilage und Grassilage. Zusätzlich wurden vermutlich mit Rapsöl reichlich Zwischenprodukten hergestellt, so dass die Methanogenese richtig aktiv bei der Methanproduktion war.



<u>Abb. 44</u>: Aktivität der HGC Bacteria im 3500L Durchflussfermenter mit verschiedenen Inputmaterialien.



<u>Abb. 45</u>: Aktivität der LGC Bacteria im 3500L Durchflussfermenter mit verschiedenen Inputmaterialien.
Diese Ergebnisse finden teilweise eine Bestätigung bei den chemischen Analysen des LfL-Partners (Freising-Weihenstephan). Dabei zeigte Grassilage mehr Rohfasern (Mittelwert: 31,9% TS) und weniger Stärke (Mittelwert: 1,8) als Maissilage (Mittelwert; Rohfasern: 17,7% TS und Stärke: 38,3% TS), Rapsöl hat keine Rohfasern.

Bei den LGC Bacteria, konnte gezeigt werden, dass sie langfristig (nach etwa 5-6 Wochen Co-Vergärung) sich besser mit Rapsöl oder Maissilage entwickelt haben als mit Grassilage. Dabei ging die Zellzahl der LGC Population bei Rapsöl von etwa 5 x  $10^7$ /ml am Anfang der Co-Vergärung auf ca. 2 x  $10^8$ /ml nach 105 Tagen (Abb. 45). Vermutlich waren in Maissilage und Rapsöl Stoffe vorhanden, die das Wachstum der LGC Population fördern (siehe auch Tab. 5).

Bei der HGC Population wurde bei der Co-Vergärung der verschiedenen Substrate kaum eine Änderung in der Entwicklung festgestellt (Abb. 44). Offensichtlich hatte diese Gruppe nicht die optimale Substratzusammensetzung für ein gutes Wachstum. Auf der anderen Seite hat sich die HGC Population vermutlich mehr durch die täglichen Zufuhr von Standardbiozönose ernährt (etwa 95 kg täglich, Tabelle 4).

#### II.1.4.7.2 Entwicklung der Biozönose in den 36L Durchflussfermentern

Die Ergebnisse der in Situ Hybridisierung für die ausgewählten Bakteriengruppen bei den 36L Durchflussfermentern zeigten, dass die ausgewählte Bakteriengruppen sich bei den 3 Substraten (Mais, Gras und Rapsöl) unterschiedlich entwickelt haben (Abb. 46, 47, 48 und 49). Am besten wuchsen beispielsweise die Sulfatreduzierer (SRB) mit Rapsöl (Abb. 49). Dabei lag die Zellzahl der SRB bei etwa 6 x  $10^8$ /ml, während bei Maissilage für den gleichen Zeitraum die Zellzahl bei ca. 2-2,5 x  $10^8$ /ml lag (Abb. 46 und 49).



<u>Abb. 46:</u> Entwicklung von ausgewählten Bakterienpopulationen bei der Co-Vergärung von Maissilage im 36L Durchflussfermenter.

Bei Grassilage war die Zellzahl der SRB für den gleichen Zeitraum am niedrigsten und lag zum Beispiel am Tag 64 bei ca. 5 x  $10^{7}$ /ml (Abb. 48). Diese mikrobiologischen Ergebnisse fanden bei den physikalisch-chemischen Analysen von dem LfL-Partner (Freising-Weihenstephan) eine deutliche Unterstützung (Abb. 50 und 51). Dabei wurde für den gleichen Zeitraum bei Rapsöl deutlich mehr Wasserstoff produziert (Mittelwert= 144 ppm) als bei Maissilage (Mittelwert= 98 ppm) oder Grassilage (Mittelwert= 65,6 ppm).



<u>Abb. 47:</u> Entwicklung von ausgewählten Bakterienpopulationen im 36L Durchflussfermenter ohne Substrat (Nullprobe). Dieser Versuch wurde parallel zur Maissilage Co-Vergärung durchgeführt.



<u>Abb. 48</u>: Entwicklung von ausgewählten Bakterienpopulationen im 36L Durchflussfermenter mit Grassilage.





Anders als bei der Methanogenen haben die SRB ein sehr breites Substratspektrum und können Stoffe wie organische Säuren, Fettsäuren und Alkohole als Elektronendonator verwenden und dadurch abbauen. Deshalb kam das Rapsöl für die SRB gerade zugute und entwickelte sich dabei diese Population besser als die anderen Bakteriengruppen. Durch den Abbau von Rapsöl können die SRB unter anderen sehr viel Essigsäure und Wasserstoff produzieren. Diese Zwischenprodukte können von den Methanogenen für die Methanbildung angesetzt werden. Es ist bekannt, dass etwa 70% des im anaeroben Reaktor produzierten Methan aus Essigsäure stammt und der Rest aus Wasserstoff und CO<sub>2</sub> (Zinder S. H., 1993). Deshalb sind die Methanogenen mit Rapsöl im Vergleich hier mit Grass- oder Maissilage gut gewachsen (Abb. 46 bis 49). Die Zellzahl der Methanogenen lag während der 4 Wochen Zeitraum bei ca. 2 x 10<sup>8</sup>/ml mit Rapsöl (Abb. 49), bei ca. 2-2,5 x  $10^8$ /ml mit Maissilage (Abb. 46) und bei ca. 7 x  $10^7$ /ml mit Grassilage (Abb. 48). Diese Ergebnisse fanden auch Bestätigung bei den physikalisch-chemischen Analysen. Dabei wurde mit Rapsöl mehr Methan produziert und lag bei ca. 313,2 während für Maissilage bei 206,9 und für Grassilage bei 148,2  $L_N$  kg oTS<sub>Zufuhr</sub> (siehe auch die Tabelle im gemeinsamen Kapital). Die Methanausbeute lag auch höher mit Rapsöl (Mittelwert = 69,1%) als mit Maissilage (Mittelwert= 57,2%) oder Grassilage (Mittelwert = 56,9%).



<u>Abb. 50</u>: Vergleich zwischen der Tagesgasmenge und der Entwicklung der Sulfatreduzierer im 36LD SB und Substrat (Mais/ Rapsöl).

Wenn wir jetzt die mikrobiologischen Ergebnisse für LGC und HGC Bacteria mit diesen Substraten betrachten, können wir schon vermuten, dass in und bei diesen Bakteriengruppen die Reaktoren von nicht Fettabbauern dominiert sind, die mehr proteinund cellulosehaltige Stoffe verbrauchen können. Diese beiden Gruppen wuchsen bei der Zugabe von Silage ständig bis zur einer bestimmten Zeit (etwa 4-5 Wochen). Nach etwa 2 Monate Co-Vergärung, ging die Zellzahl der LGC und HGC deutlich runter und lag bei etwa 1 x 10<sup>7</sup>/ml (LGC und HGC) für Grassilage und 1-5 x 10<sup>7</sup>/ml für Maissilage (Abb. 46 bis 49). Bei der Co-Vergärung von Rapsöl, wurde keine deutliche Stimulation des Wachstums bei den LGC bzw. HGC Gruppen beobachtet (Abb. 49). Diese beiden Bakteriengruppen haben sich in den 36L Durchflussfermentern vermutlich durch die tägliche Zugabe von Standardbiozönose weiter entwickelt. Dabei lag die Zellzahl die ganze Zeit bei ca. 2-4 x 10<sup>7</sup>/ml. Vermutlich lag das daran, dass bei den Reaktoren mit Silagen mehr Rohfasern und cellulosehaltige Stoffe als bei Rapsöl vorhanden waren (Quelle: LfL-Partner; Freising-Weihenstephan). Diese mikrobiologischen Daten fanden hier auch eine Unterstützung von der chemischen Analyse bei unserem LfL-Partner (Freising-Weihenstephan). Dabei ergab sich, dass der Rohfasergehalt für Maissilage bei einem Mittelwert von etwa 17,4% TS, für Grassilage bei ca. 31,9% TS und für Rapsöl (0%) lag. Auf der andere Seite, kam durch tägliche Zugabe von Standardbiozönose

teilweise Rohfasern in den Reaktoren rein (siehe Beschickungsplan vom LfL-Partner (Freising-Weihenstephan).



<u>Abb. 51</u>: Vergleich zwischen der Tagesgasmenge und der Entwicklung der Methanogenen im 36LD SBW mit Substrat (Mais/ Rapsöl).

Bei dem Vergleich zwischen der Mikrobiologie und den chemischen Analysen bei der Co-Vergärung von den Substraten wurde festgestellt, dass bei Rapsöl durchschnittlich mehr Wasserstoff täglich produziert wurde, als bei Maissilage (Abb. 50). Gleichzeitig stieg die Zellzahl der SRB bei Rapsöl deutlich und lag für lange Zeit (ca. 4 Monate) bei etwa 6-7 x  $10^8$ /ml während bei Maissilage bei etwa 2-3 x  $10^8$ /ml.

Nach etwa 70 Tagen Co-Vergärung sank die Wasserstoffproduktion drastisch ab, was darin begründet ist, dass die Reaktoren nach etwa 70 Tagen nicht mehr gefüttert wurden und die Biozönose geschwächt war (Mittelung des LfL-Partners). In Abbildung 50 ist die Abnahme der Tagesgasmenge deutlich zu sehen.

Auch haben sich die Methanogenen mit Rapsöl gut entwickelt. In der Abbildung 51 ist deutlich zu sehen, dass am Anfang der Co-Vergärung mit Rapsöl sehr viel Methan produziert wurde und gleichzeitig die Zellzahl der Methanogenen mit hoch gingen.

Bei den Methanogenen ging es hier auch am schlechtesten bei der Co-Vergärung von Grassilage.

Wenn man jetzt die Substrateigenschaften von der Tabelle 5 berücksichtigt, stellt man fest, dass Grassilage verglichen mit Maissilage und Rapsöl relativ arm an Stärke (1,8% TS) und Fett (1,5% TS) ist, aber auf der anderen Seite der Anteil von Rohfasern (31,9% TS) und Rohproteine (15,1% TS) im Vergleich mit den anderen beiden Substrate ziemlich hoch ist. Auch bei den Substrateigenschaften wurde bei Maissilage und Grassilage reichlich an Rohproteine (8,6% und 15,1% TS) und Rohfasern (17,7% und 31,9% TS) bestimmt.

Bei der Co-Vergärung von Rapsöl, wurde bei den mikrobiologischen Analysen keine deutliche Stimulation des Wachstums bei den LGC bzw. HGC Gruppen beobachtet, wobei das Überleben der LGC und HGC vermutlich durch die tägliche Zugabe von Standardbiozönose zurückzuführen ist.

#### II.1.4.7.3 Analyse der Biozönose in den 36L Batchfermentern

Die Substratvergärung wurde auch bei den 36L in Batchverfahren untersucht. Dabei zeigte die mikrobiologische Untersuchung, dass sich die SRB und Methanogenen auch mit Rapsöl besser entwickelten als mit Mais- oder Grassilage.

Bei der Analyse der Methanogenen im 36L Batchfermenter mit Maissilage wurden Zellen der *Methanosarcina* Population identifiziert (Abb. 52) während im 36L Batchfermenter mit Grassilage oder Rapsöl die *Methanosarcina* Zellen seltener detektiert wurden. Ähnlich gilt es auch für die anderen Durchflussfermentern.

Bei den 36LB Fermentern mit Rapsöl ging die Zellzahl der Methanogenen von etwa 1,5 x  $10^8$ /ml am Anfang der Co-Vergärung auf ca. 2,5 x  $10^8$ /ml nach 43 Tagen zurück. Das bedeutet, die Zellzahl der Methanogenen hat sich in diesem Fall fast verdoppelt. Die SRB haben sich auch entwickelten und für den gleichen Zeitraum etwa verdoppelt (Abb. 53).



<u>Abb. 52</u>: Entwicklung der *Methanosarcina* Population im 36L Batchfermentern mit Maissilage.



Beim Versuchen mit Maissilage hat sich die Zellzahl der SRB im Vergleich zu Rapsöl verschlechtert und sank von ca. 2,5 x  $10^8$ /ml am Anfang auf etwa 1,2 x  $10^8$ /ml nach 44 Tagen Co-Vergärung. Das lag vermutlich daran, dass das Substrat für das Wachstum der SRB nicht mehr so reichlich wie am Anfang zur Verfügung stand und deshalb die Entwicklung dieser Population nach etwa 4-5 Wochen Co-Vergärung nachließ (Abb. 54).

Die LGC Bacteria entwickelten sich am besten im 36LB mit Maissilage. Dabei lag die Zellzahl dieser Population während der Co-Vergärung bei etwa 1 x  $10^8$ /ml (Abb. 54). Für die HGC Bacteria lief die Entwicklung schlecht, sowohl mit Mais- als auch mit Grassilage (Abb. 54 und 55). Die LGC und HGC Bacteria wuchsen am schlechtesten mit Rapsöl (Abb. 56).

Es wurde bei den Grassilage Versuchen schon häufig beobachtet, dass die ausgewählten Bakteriengruppen sowohl im Durchfluss- als auch im Batchverfahren sehr schlecht wuchsen und nach etwa 4 Wochen Co-Vergärung die Biozönose einbrach. Das lag vermutlich daran, dass die Gärbedingungen mit Grassilage für ein stabiles Wachstum der Biozönose nicht optimal waren.

Die Entwicklung der Biozönose mit Grassilage lief ähnlich wie bei den Versuchen ohne Substrat (Nullprobe; Abb. 57).







<u>Abb. 56</u>: Aktivität von ausgewählten Bakteriengruppen im 36L Batchfermenter bei der Co-Vergärung von Rapsöl.





### II.1.4.7.4 Entwicklung der Biozönose in den 2L Batchfermentern

Die Entwicklung der ausgewählten Bakteriengruppen in den 2L Batchfermentern mit den Substraten wurde hier auch näher untersucht. Dabei lief die Entwicklung der Biozönose mit wenigen Ausnahmen ähnlich wie bei den 36LB Fermentern.



Die Zelldichte der verschiedenen Bakteriengruppen sank mit der Zeit bei allen 3 Substraten. Die Zellzahl der SRB mit Rapsöl sank von ca. 6 x  $10^8$ /ml am Anfang der Vergärung auf etwa 3 x  $10^8$ /ml nach etwa 4 Wochen (Abb. 58 bis 60).

Wie bei den anderen Versuchen wuchsen die HGC Bacteria hier am schlechtesten und deren Zellzahlmaximum lag die ganze Zeit der Co-Vergärung bei etwa 5 x  $10^7$ /ml.







<u>Abb. 60</u>: Aktivität von ausgewählten Bakteriengruppen im 2L Batchfermenter bei der Co-Vergärung von Rapsöl.

# II.1.4.8 Vergleich zwischen den chemischen Analysen und den mikrobiologischen Ergebnissen bei der Co-Vergärung von verschiedenen Substraten

Beim Vergleich der Daten aus den physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Analysen der Co-Vergärung der 3 Substrate in den 36L Durchflussfermentern, im Zeitraum von Tag 40 bis 67, wurden deutliche Unterschiede festgestellt.

Die Versuche zeigten, dass mit Rapsöl die höchste Gas- (454,6 L/kg oTS) und Methanausbeute (313,2 L/kg oTS) erzielt wurde, was nicht nur an der hohen Gasproduktion, sondern auch am höchsten Methananteil (69,1%) im Vergleich zum Biogas aus den anderen Co-Substratfermentationen mit Maissilage (57,2%) und Grassilage (56,9%) lag.

Werden diese Ergebnisse den Auswertungen der mikrobiologischen Untersuchungen des Co-Vergärungsversuches mit Rapsöl gegenüber gestellt, so zeigt sich, dass im gleichen Zeitraum die Methanogenen sehr gut gewachsen sind, da ihre Zelldichte bei etwa  $2 \cdot 10^8$  /ml lag, während sie bei Grassilage nur bei etwa 7 x  $10^7$ /ml betrug.

Beim Co-Vergärungsversuch mit Maissilage konnte für den betrachteten Zeitraum zwar eine noch etwas höhere Zelldichte der Methanogenen nachgewiesen werden  $(2,5 \times 10^8)$ /ml), trotzdem lag der Methananteil im produzierten Biogas niedriger. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Methanogenen im Standardbiozönosesubstrat von Methanococcus ähnlichen Zellen dominierten, die keine Essigsäure sondern Formiat oder Wasserstoff und Kohlendioxid zu Methan umsetzen können. Es ist auch allgemein bekannt, dass nur wenige Methanogenen Gruppen (Gattungen Methanosarcina und Methanosaeta) überhaupt in der Lage sind Essigsäure als Substrat zu verwenden (Madigan et al., 2002; Schmidt et al., 2000) während alle Methanogenen H<sub>2</sub> mit CO<sub>2</sub> umzusetzen vermögen und diesen Stoffwechselweg auch deutlich favorisieren (Garcia et al., 2000). Maissilage bewirkte hingegen, wie die Analysen zeigten (Tab.6), eine Hydrolyse die zu relativ viel Essigsäure führte (609,8 mg/L), deren Abbau zu Methan wiederum CO<sub>2</sub> (42,7%) freisetzt. Gleichzeitig war jedoch die Wasserstoffproduktion deutlich niedriger, als beim Versuch mit Rapsöl. Damit wurde das Biogas aus der Co-Fermentation mit Maissilage durch das produzierte CO<sub>2</sub> "verdünnt", während bei der Co-Vergärung mit Rapsöl mehr CO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub> zu Methan umgesetzt werden konnte. Einerseits führt das zur Reduktion des Kohlendioxidgehaltes und andererseits zur Steigerung des Methangehaltes im gebildeten Biogas.

		Co-Vergärung von Basissubstrat (Stand				lardbiozönose) mit	
		Maissilage Grassilage			Rapsöl		
		Mittel-	Std	Mittel-	Std	Mittel-	Std
Messgröße	Einheit	Wert	Abw.	Wert.	abw.	Wert	abw.
	$[L_N^*]$						
Gasausbeute	$(\text{Kg OIS}_{\text{Zufuhr}})$	<mark>362.0</mark>	15.3	260.5	10.4	454.6	9.3
	[L <sub>N</sub> *	<del> , -</del>	,-		, .		- ,-
Methanausbeu	(kg oTS <sub>Zufuhr</sub> )						
te	1]	<mark>206,9</mark>	9,0	148,2	6,0	313,2	6,2
CH <sub>4</sub>	[%]	<mark>57,2</mark>	1,7	<mark>56,9</mark>	0,8	69,1	0,3
$CO_2$	[%]	<mark>42,7</mark>	1,8	<mark>43,0</mark>	0,8	30,9	0,3
$H_2$	[ppm]	<mark>98,2</mark>	10,1	<mark>65,6</mark>	6,5	144,0	4,1
$H_2S$	[ppm]	<mark>626,9</mark>	51,4	<mark>528,6</mark>	47,5	347,0	33,3
	[Zelldichte	25.0	2.0		1.0	10 6	0.2
Methanogene	*10 <sup>°</sup> ]	25,0	3,0	<mark>/,</mark> 6	1,0	19,6	0,3
HGC	$\times 10^7$	36	31	<mark>4 6</mark>	43	10.8	123
	[Zelldichte	<u>,,,</u>	5,1		1,5	10,0	12,5
LGC	*10 <sup>7</sup> ]	<mark>5,6</mark>	0,0	<mark>8,4</mark>	10,3	2,7	0,0
Sulfatreduzier	[Zelldichte						
er	*10']	<mark>25,8</mark>	3,3	15,5	15,9	64,5	0,9
TS	g/L	<mark>37,7</mark>	3,4	<mark>48,9</mark>	4,3	50,5	5,4
oTS	g/L	<mark>28,2</mark>	0,6	37,3	0,5	38,3	0,8
CSB	gr O <sub>2</sub> / kg	<mark>42,2</mark>	4,3	<mark>58,4</mark>	5,2	60,9	7,3
KS	mmol/L	<mark>252,1</mark>	13,6	<mark>293,2</mark>	28,9	272,0	27,1
FFS	mg/L	<mark>861,8</mark>	356,7	<mark>731,5</mark>	245,9	698,1	207,2
$pH_{Labor}$	-	<mark>8,0</mark>	0,1	<mark>7,8</mark>	0,2	8,1	0,1
Leitfähigkeit	mS/cm	<mark>20,7</mark>	1,2	21,0	1,2	21,7	1,1
Essigsäure	mg/L	<mark>609,8</mark>	316,3	505,8	234,2	310,5	113,0
Propionsäure	mg/L	<mark>15,8</mark>	34,3	<mark>36,0</mark>	26,1	2,1	3,5
isoButtersäure	mg/L	<mark>0,0</mark>	0,0	21,7	15,9	0,0	0,0
Buttersäure	mg/L	<mark>2,9</mark>	8,3	<mark>39,7</mark>	32,8	0,0	0,0
isoValeriansäu							
re	mg/L	<mark>0,8</mark>	2,4	<mark>53,2</mark>	38,6	0,0	0,0
Valeriansäure	mg/L	<mark>0,0</mark>	0,0	<mark>0,0</mark>	0,0	0,0	0,0
Capronsäure	mg/L	<mark>0,0</mark>	0,0	<mark>0,0</mark>	0,0	0,0	0,0
Oenanthsäure	mg/L	<mark>0,0</mark>	0,0	10,1	26,7	0,0	0,0
NH4-N	mg/L	<mark>2531,3</mark>	164,7	2734,3	177,8	2730,0	158,1
Rohprotein	g/L	<mark>6,8</mark>	0,3	<mark>9,4</mark>	0,5	8,6	0,6
Rohfaser	g/L	<mark>5,2</mark>	0,5	<mark>8,4</mark>	0,5	6,4	0,1
Rohfett	g/L	<mark>0,8</mark>	0,1	<mark>1,3</mark>	0,1	4,8	0,6

Stärke	g/L	<mark>0,6</mark>	0,3	<mark>0,4</mark>	0,1	0,4	0,1
NDF	g/L	<mark>13,5</mark>	0,8	<mark>20,9</mark>	0,7	19,2	0,7
ADF	g/L	<mark>12,2</mark>	0,8	<mark>16,7</mark>	1,2	16,6	0,6
ADL	g/L	<mark>10,7</mark>	0,6	<mark>14,0</mark>	0,6	13,9	0,7
Gesamt C	g/L	<mark>14,6</mark>	0,3	<mark>20,4</mark>	0,3	21,6	1,0
Norg	g/L	<mark>1,1</mark>	0,0	1,5	0,1	1,4	0,1

**Tab. 6**: Zusammenführende Übersicht über chemisch-analytische und mikrobiologischer Analysenwerte bei der Co-Vergärung von Substraten unterschiedlicher Zusammensetzung im 4-wöchigen Zeitraum gleichmäßiger Gasproduktion (Tag 40-67).

Zusätzlich ist hervorzuheben, dass im Biogas aus der Maissilage die höchste durchschnittlich Konzentration an Schwefelwasserstoff (627 ppm) im Gegensatz zum (347 ppm) Rapsöl, gemessen wurde. Da H<sub>2</sub>S jedoch nachweislich die Methanogenese hemmt, kann hierin auch ein weiterer Grund für die im Verhältnis zum Rapsöl deutlich schlechtere Auffallend Gasausbeute gesehen werden. ist trotz der niedrigsten Schwefelwasserstoffkonzentration im Biogas der Rapsöl-Co-Vergärung, dass sich dort im betreffenden Zeitraum die Sulfatreduzierer mit einer Zelldichte von ca. 6 x 10<sup>8</sup>·/ml am besten vermehrt haben. Die niedrige Schwefelwasserstoffkonzentration begründet sich dabei zum einen durch das Fehlen von Schwefel im Rapsöl (nur 0,07% der TS) während sich das gute Wachstum der SRB wiederum auf die hohe Wasserstoffkonzentration im Biogas zurückführen lässt, da Sulfatreduzierer in der Lage sind, mit den Methanogenen und anderen Bakterien um den Wasserstoff zu konkurrieren (O'Reilly et al., 2005; Spanjer et al., 2002; Weijma et al., 2002). Das dies jedoch nicht zu einem geringen sondern sehr hohen Methananteil in dem aus Rapsöl gebildeten Gas geführt hat, legt die Vermutung nahe, dass die Wasserstoffproduktion im Gärsubstrat beim Abbau des Rapsöls sehr viel höher gewesen sein muss, als es sich aus dem Konzentrationswert im entwichenen Biogas ableiten lässt. Dazu passt auch die Erkenntnis von anderer Seite, dass durch Vergärung von biogenen Ölen besonders viel Wasserstoff gewonnen werden kann (Gavala et al., 2005).

Zuletzt darf außerdem nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei Maissilage um ein komplexes Substrat bestehend aus sehr unterschiedlich abbaubaren Substanzen handelt, während Rapsöl nur aus 2 Stoffgruppen; Alkohole (Glycerin) und Fettsäuren besteht, die beide als sehr leicht abbaubar gelten und somit schon per se zu einem höheren Gasertrag führt.

Darin ist auch die Hauptursache für die im Vergleich schlechteste Gas- und Methanausbeute aus der Grassilage zu suchen. Hier macht sich der Mangel an geeigneten Substraten in den relativ niedrigen Zelldichten der Methanogenen (7,6 x  $10^7$ /ml) und der Sulfatreduzierer (15,5 x  $10^7$ /ml) bemerkbar. Außerdem fällt auf, dass nur bei der Co-Vergärung von Grassilage eine relativ hohe Propionsäurekonzentration (36 mg·/L) und überhaupt nennenswerte Konzentrationen an höheren Fettsäuren (Tab.6) gemessen wurden. Da bekannt ist, dass Propionsäure und höhere Fettsäuren die Methanogenese inhibiert (Kotsyurbenko et al., 2004; Ungerfeld et al., 2004), kann hierin ein weiterer Grund für die Geringe Methanausbeute aus diesem Substrat gefunden werden.



<u>Abb. 61:</u> Tägliche Biogasproduktionsrate und Zelldichteverlauf bei der Co-Vergärung von Maissilage in den 36L Durchflussfermentern.

Werden die Ergebnisse für die HGC und LGC Bakterien betrachtet, so kann festgestellt werden, dass die HGC Bakterien bei der Co-Vergärung von Rapsöl im Vergleich zu den anderen Co-Substraten am besten gewachsen sind (Zelldichte =  $10.8 \times 10^7$ /ml), während es die LGC Bakterien am schlechtesten wuchsen (Zelldichte =  $2.7 \times 10^7$ /ml). Die Bakterien mit hohen Guanin- und Cytosin-Gehalt (HGC) müssen sich somit besser an den Abbau des Rapsöls angepasst haben, als die mit niedrigem Gehalt dieser beiden Basen (LGC). Im Falle der Co-Fermentationen mit den Silagen ist das Verhältnis dagegen ausgewogener, was mit Sicherheit auf die Komplexität dieser Co-Substrate zurückzuführen ist, welche eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen diesen Bakterien zur Verfügung stellt.

Die oben anhand der Tabelle beschriebenen Sachverhalte werden im Folgenden nochmals am Beispiel von Maissilage (wichtigstes Substrat für die landwirtschaftliche Biogaserzeugung) graphisch im zeitlichen Verlauf detailliert dargestellt.

In Abbildung 61 ist ein deutlicher Anstieg der Biogasproduktionsrate in den ersten Tagen der Co-Fermentation zu erkennen, dessen Erklärung sich nun bei gleichzeitiger Auftragung der Zelldichten ausgewählter Bakteriengruppen mit der starken Zunahme der hydrolytischen Bakterien, vor allem der HGC Bakterien und der Sulfatreduzierer bestätigen lässt. Letztere werden außerdem noch durch die starke Freisetzung von Wasserstoff zu diesem Zeitabschnitt (Abb. 62) gefördert.

Demgegenüber kommt die Methanogenese deutlich langsamer in Gang, weshalb das zu Beginn der Co-Vergärung aus den Hydrolyseprozessen freiwerdende Kohlendioxyd ungenutzt entweichen kann.





Dass es dabei zum Zeitpunkt der höchsten Biogasproduktionsrate während des gesamten Gärungsverlaufes auch kurzzeitig zum höchsten gemessenen Methananteil kommt, ist dem Zusammenspiel aus einem momentanen Überangebot an CO<sub>2</sub> und Wasserstoff zu verdanken. Sobald die Methanogenen Population sich etwas entwickelt hat werden diese Gase zu Methan umgesetzt, weshalb ihr Gehalt im Biogas bereits kurz vorher begonnen hat, steil abzufallen (Abb. 62 und 63). Nahezu gleichzeitig beginnt auch der Konsum der durch die hydrolytisch aktiven Bakterien gebildeten Essigsäure, so dass deren Konzentration im Gärsubstrat nach einem anfänglichen Maximum auch beginnt, stark abzunehmen (Abb. 64).



<u>Abb. 63</u>: Wasserstoffkonzentration im produzierten Biogas und Zelldichteverlauf bei der Co-Fermentation von Maissilage in den 36L Durchflussfermentern.

Sobald sich die tägliche Biogasproduktionsrate zu stabilisieren beginnt und nur noch in einem engeren Bereich, bedingt durch die tägliche Substratzufuhr hin und her schwankt, beginnen die Zelldichten der HGC Bakterien sowie der Sulfatreduzierer wieder stark abzunehmen. Während die LGC Bakterien möglicherweise verdrängt durch die Sulfatreduzierer oder andere hier nicht erfasste Bakteriengruppen verdrängt werden und deren Zellzahl pro Milliliter über den gesamten Versuchszeitraum fällt, vermehren sich die Methanogenen und Sulfatreduzierer verlangsamt, jedoch stetig weiter. Daher steigt der Methangehalt im produzierten Biogas ebenfalls langsam weiter an, bis am 65. Versuchstag die Methanogenen einen Rückgang erfährt, während die Sulfatreduzierer weiterhin ansteigen. Es ist zu vermuten, dass es an dieser Stelle zu einer Konkurrenzsituation zwischen diesen beiden Bakteriengruppen um Substrate gekommen ist, da die Wasserstoffkonzentration im Biogas tendenziell stetig abnimmt und die HGC Bakterien als eine der wichtigen hydrolytisch aktiven Bakteriengruppen ihren Tiefststand erreicht haben. Da die Sulfatreduzierer bei der Aufnahme von Wasserstoff flexibler sind, sie können ihn mit einem weiten Spektrum an anderen Verbindungen umsetzen (Madigan et al., 2002), sieht sich ihre weitere Entwicklung nicht so stark beeinträchtigt wie die der methanogenen Population. Als Konsequenz daraus sanken nicht nur die Zelldichte der Methanogenen, sondern auch die tägliche Biogasproduktionsrate und der Anteil des Methans in diesem Gas.



<u>Abb. 64</u>: Konzentration der flüchtigen freien Fettsäuren im produzierten Biogas und Zelldichteverlauf bei der Co-Vergärung von Maissilage in den 36L Durchflussfermentern.

Wird dazu der Verlauf des Summenparameters der freien flüchtigen Fettsäuren ausgedrückt als Essigsäurekonzentration gegenübergestellt, so fällt nach einem leichten Rückgang tendenziell wieder ein Anstieg ab dem 65. Versuchstag auf (Abb. 64). Dies unterstützt die Hypothese eines eingetretenen Versorgungsmangels der Methanogenen, die den Verbrauch und die Umsetzung der Essigsäure zu Methan beeinträchtigt haben könnte.

### II.1.4.9 Ergebnisse und Diskussion der PCR-DGGE Analysen

### II.1.4.9.1 Vergleich der DGGE-Profilen mit 16S rDNA

Die DGGE Technik (Muyzer et al., 1998; Muyzer et al., 1999) wurde hier verwendet, um die Diversität und Aktivität der verschiedenen Gruppen der Biozönose in den verschiedenen Fermentern (Übertragbarkeitsversuche) und bei unterschiedlichen Substraten näher zu untersuchen.



Es wurden bei der Herstellung der Standardbiozönose 7 Fermenterproben mit der DGGE Technik analysiert. Bei Tag 0 handelt es sich hier um das Inokulum aus der Pellmeier Biogasanlage (Abb. 65).



<u>Abb. 66</u>: DGGE-Profile der 16S rDNA Fragment amplifiziert mit *Archaea*-spezifischen Primern. Vergleich zwischen 2L, 36L und 3500L Batchfermentern während der Übertragbarkeitsversuche.

Die Ergebnisse der DGGE Analysen von 16S rDNA zeigten, dass es sich um ein System mit einer sehr hohen Populationsdiversität innerhalb der Domäne *Bacteria* handelt. Auch wurde festgestellt, dass kein deutlicher Unterschied in den DGGE-Profilen während der Standardbiozönose-Herstellung liegt (Abb. 65). Dies bedeutet auch, dass die Populations-Struktur sowie -Zusammensetzung der Domäne *Bacteria* hier etwa gleich geblieben ist und keine signifikante Populationsverschiebung beobachtet wurde.

Betrachtet man hier die verwendete Substratzusammensetzung (TMR + Gülle) sowie das Inokulum aus der Pellmeier Biogasanlage, so kann man feststellen, dass es sich hier um ein sehr komplexes Gärsystem mit sehr breitem Substratspektrum handelt, welches reich an Nährstoffen für die diverse Bakterien Populationen ist.

Das TMR Futter besteht aus (Quelle: LfL-Partner; Freising-Weihenstephan):

_	Maissilage	43%
_	Grassilage	18%
_	Heu	4%
_	Wasser	9%

_	Sojapellets	7%
_	Getreideschrot	12%
_	Kuhkorn (Mineralstoffmischung für Rinder)	7%

Auch während der Übertragbarkeitsversuche wurden Fermenterproben zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und mit der DGGE Technik untersucht. Es wurde hier praktisch die hergestellte Standardbiozönose auf die 2L, 36L und 3500L Fermentern verteilt und in Batchverfahren betrieben (Quelle: LfL-Partner).

Der Vergleich der DGGE-Profilen von 16S rDNA für die verschiedenen Fermenter zeigten, dass sowohl bei der Domäne *Archaea* als auch bei *Bacteria* die Populationen-Struktur sowie -Zusammensetzung sowohl in 2L und 36L als in 3500L Fermentern stabil und ziemlich unverändert blieb (Abb. 66 und 67).





### II.1.4.9.2 Vergleich der DGGE-Profilen von 16S rRNA

Beim Vergleich der DGGE-Profilen von 16S rRNA konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Biozönose in den Fermentern unterschiedlich lief. Diese Unterschiede in den DGGE-Profilen könnten auch für eine Differenz in der Biozönose-Aktivität deuten. In dem 3500L Durchflussfermenter und während der Standardbiozönoseherstellung wurden nur leichte Änderungen in den Banden-Profile beobachtet (Abb. 68). Diese Beobachtung wurde durch die FISH Analysen bei der Standardbiozönoseherstellung und für den gleichen Zeitraum deutlich bestätigt (Abb. 21C).



Abb. 68: DGGE-Profile von 16S rRNA Fragmenten amplifiziert mit *Bacteria*-spezifischen Primern. Vergleich zwischen dem 3500L Durchfluss, 2L, 36L und 3500 L Batchfermentern.

Bei den 3500L und 36L Batchfermentern hingegen waren die Verschiebungen in den Banden-Profilen noch deutlicher und zeigten, dass mit der Zeit die Banden immer weniger wurden, was auf eine Reduzierung der Biozönose-Aktivität hindeuten könnte. Diese DGGE Ergebnisse können die FISH Analysen bei der Übertragbarkeitsversuche noch bestätigen (Abb. 27 und 28).

Bei den *Archaea* DGGE-Profilen wurden bei den 3500L, 36L und 2L für die ersten 4 Wochen keine großen Unterschiede festgestellt. Später und am Tag 104 der Co-Vergärung zeigte im 36L Batchfermenter eine deutliche Reduzierung der Bandenzahl, was auf eine Schwäche der Archaea Aktivität deuten konnte (Abb. 69). Die Ergebnisse lassen sich durch die FISH Analyse noch bestätigen. Dabei sank die Zellzahl der Methanogenen von 4 x 10<sup>8</sup>/ml am Tag 32 auf etwa 1 x 10<sup>8</sup>/ml am Tag 104 (Abb. 28).



# 3500 L 36 L 2 L

**Abb. 69**: DGGE-Profile von 16S rRNA Fragmenten amplifiziert mit *Archaea*-spezifischen Primern. Vergleichungen zwischen 2L, 36L und 3500L Batchfermentern während der Übertragbarkeitsversuche. M für Standardmarker. Die DGGE Analysen zeigten auch, dass bei *Bacteria* DGGE-Profilen mehr PCR-Banden detektiert wurden als bei den *Archaea* DGGE-Profilen (Abb. 68 und 69).

Diese DGGE Ergebnisse ließen sich mit den FISH Analysen gut bestätigen. Dabei wurde festgestellt, dass die Domäne *Bacteria* deutlich über die *Archaea* dominierten (Abb. 21B und 24).

Auf der anderen Seite zeigte die Analyse der DGGE-Profilen für 16S rRNA bei der Substratversuche mit Maissilage, dass bei der *Archaea* Biozönose nur leichte Änderung in der Bandenverteilung beobachtet wurde (Abb. 70).

#### II.1.4.10 Phylogenetische Analyse der PCR-DGGE Sequenzen

#### II.1.4.10.1 Analyse der Archaea Klone

Für die phylogenetische Analyse wurden Banden aus den DGGE-Gelen geschnitten, reamplifiziert und mit der **TOPO TA Cloning Kit** kloniert (Abb. 70 und 71). Danach wurden die Klone mit den spezifischen Primern sequenziert. Die Sequenzen der *Archaea* Banden wurden von **Dr. Michael Lebuhn** (LfL, Weihenstephan-Freising) weiter bearbeitet und die phylogenetische Zuordnung der *Archaea* Sequenzen bestimmt.

Die Sequenzen **MA\_A3K1** und **MA\_A4K1** sind Umweltklone nicht-identifizierter Archaeen am ähnlichsten (Abb. 72) und fallen in die Gattung *Methanoculleus* innerhalb der Methanomicrobiales.

Die Sequenzen MA\_A9K5 und MA\_EK2 fallen ebenfalls in die Gattung Methanoculleus innerhalb der Methanomicrobiales, und sind *Methanoculleus bourgensis* am Ähnlichsten (Abb. 72).

Die Sequenzen **MA\_A9K4** und **MA\_A9K6** sind identisch und bilden eine eigene Entwicklungslinie zwischen den Ordnungen Methanosarcinales und Methanomicrobiales (Abb. 72) und können damit eine bisher unbekannte, neue Ordnung innerhalb der Domäne *Archaea* darstellen.

Die Sequenz **MA\_A6K1** ist sehr wahrscheinlich der Gattung Methanosarcina zuzuordnen (Abb. 72), könnte allerdings auch eine neue Species innerhalb dieser Gattung darstellen.

Diese phylogenetischen Ergebnisse zeigen, dass über die Hälfte der in dieser Arbeit analysierten Archaea Sequenzen unbekannt sind. Das bedeutet auch, dass die bisherigen FISH Analysen nicht alle *Archaea* Populationen erfasst haben und die Entwicklung von noch spezifischeren Oligonukleotidsonden erforderlich ist.



Abb. 70 : DGGE Profile für *Archaea* 16Sr RNA Sequenz. Inokulum (1); Standardbiozönose (2: 13.07.2004, 3: 08.10.2004); 3500L SBW und Maissilage (4:Tag 7, 5: 14, 6: 20, 7: 64, 8: 79 und 9: Tag 94); 36L SBW ohne Substrat (10: Tag 7 und 11: Tag 14).





Abb. 72: Phylogenetische Analyse von 16Sr Sequenzen aus mesophilen Biogas-Reaktoren.

# Die 16S Archaea Sequenzen

# MA\_A3K1; 549 bp

1	ACGGGGGCAG	CAGGCGCGAA	ACCTTTACAA	TGCGGGCAGC	CGTGATAAGG
51	GAACCTCGAG	TGCCTGTAAA	CGCAGGCTGT	TCAGGTGTTT	AAAACGCACC
101	TGGAGAAAGG	GCCGGGCAAG	ACCGGTGCCA	GCCGCCGCGG	TAATACCGGC
151	GGCTCGAGTG	GTGGCCGCTT	TTATTGGGCT	TAAAGCGTTC	GTAGCTGGGT
201	TGTTAAGTCT	CTTGGGAAAT	CTGGCGGCTT	AACCGTCGGG	CGTCTAAGGG
251	ATACTGGCAA	TCTTGGAACC	GGGAGAGGTG	AGGGGTACTT	CGGGGGTAGG
301	GGTGAAATCC	TGTAATCCTC	GAGGGACCAC	CTGTGGCGAA	GGCGCCTCAC
351	CAGAACGGCT	TCGACAGTGN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
401	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
451	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
501	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNA	GGAATTGGCG	GGGGAGCAC

# MA\_A4K1; 550 bp

1	ACGGGGCGCA	GCAGGCGCGA	AACCTTTACA	ATGCGGGCAA	CCGTGATAAG
51	GGAACCTCGA	GTGCCTGTAA	ACGCAGGCTG	TTCAGGTGTT	TAAAACGCAC
101	CTGGAGAAAG	GGCCGGGCAA	GACCGGTGCC	AGCCGCCGCG	GTAATACCGG
151	CGGCTCGAGT	GGTGGCCGCT	TTTATTGGGC	TTAAAGCGTT	CGTAGCTGGG
201	TTGTTAAGTC	TCTTGGGAAA	TCTGGCGGCT	TAACCGTCAG	GCGTCTAAGG
251	GATACTGGCA	ATCTTGGAAC	CGGGAGAGGT	GAGGGGTACT	TCGGGGGTAG
301	GGGTGAAATC	CTGTAATCCT	CGAGGGACCA	CCTGTGGCGA	AGGCGCCTCA
351	CCAGAACGGC	TTCGACAGTG	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
401	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
451	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
501	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	AGGAATTGGC	GGGGGAGCAC

# MA\_A6K1; 554 bp

1	ACGGGGTGCA	GCAGGCGCGA	AAACTTTACA	ATGCGGGAAA	CCGTGATAAG
51	GGGACACCGA	GTGCCAGCAT	CATATGCTGG	CTGTCCGGAT	GTGTAAAATA
101	CATCCGTTAG	CAAGGGCCGG	GCAAGACCGG	TGCCAGCCGC	CGCGGTAACA
151	CCGGCGGCCC	GAGTGGTGAT	CGTGATTATT	GGGTCTAAAG	GGTCCGTAGC
201	CGGTTTGGTC	AGTCCTCCGG	GAAATCTGAT	AGCTCAACTA	TTAGGCTTTC
251	GGGGGATACT	GCCAGACTTG	GAACCGGGAG	AGGTAAGGGG	TACTACAGGG
301	GTAGGAGTGA	AATCTTGTAA	TCCCTGTGGG	ACCACCTGTG	GCGAAGGCGT
351	CTTACCAGAA	CGGGTTCGAC	GGTGAGGGAC	GAAAGCTGGG	GGCACGAACC

401 GGATTAGATA CCCGGGTAGT CCCAGCCGTA AACGATGCTC GCTAGGTGTC
451 AGGCATGGCG CGACCGTGTC TAGTGCCGAA GGGAAGCTGT TAAGTCCACC
501 GCCTGGGAAG TACGGTCGCA AGGCTGAAAC TTAAAGGAAT TGGCGGGGGSA
551 GCAC

### MA\_A9K4; 550 bp

1	ACGGGGTGCA	GCAGGCGCGA	AAATTTTACA	ATGCGGGCAA	CCGTGATAAG
51	GGAACCTCGA	GTGCCTGTAA	ACGCAGGCTG	TTCAGGTGTT	TAAAACGCAC
101	CTGGAGAAAG	GGCCGGGCAA	GACCGGTGCC	AGCCGCCGCG	GTAATACCGG
151	CGGCTCGAGT	GGTGGCCACT	TTTATTGGGC	CTAAAGCGTT	CGTAGCTGGG
201	TTGTTAAGTC	TCTTGGGAAA	TCTGGCGGCT	TAACCGTCAG	GCGTCTAAGG
251	GATACTGGCA	ATCTTGGAAC	CGGGAGAGGT	AAGGGGTACT	TCGGGGGTAG
301	GAGTGAAATC	CTGTAATCCT	CGAGGGACCA	CCTGTGGCGA	AGGCGCCTCA
351	CCAGAACGGC	TTCGACAGTG	AGGGACGAAA	GCTGGGGGCA	CGAACCGGAT
401	TAGATACCCG	GGTAGTCCCA	GCCGTAAACG	ATGCTCGCTA	GGTGTCAGGC
451	ATGGCGCGAC	CGTGTCTGGT	GCCGCAGGGA	AGCCGTGAAG	CGAGCCACCT
501	GGGAAGTACG	GCCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGGAATTGGC	GGGGGAGCAC

# MA\_A9K5; 550 bp

1	ACGGGGTGCA	GCAGGCGCGA	AAACTTTACA	ATGCGGGCAA	CCGTGATAAG
51	GGAACCTCGA	GTGCCTGTAA	ATGCAGGCTG	TTCAGGTGCC	TAAAACACAC
101	CTGAAGAAAG	GGCCGGGCAA	GACCGGTGCC	AGCCGCCGCG	GTAATACCGG
151	CGGCTCGAGT	GGTGGCCGCT	TTTATTGGGC	TTAAAGCGTT	CGTAGCTGGG
201	TTGTTAAGTC	TCTTGGGAAA	TCTGGCGGCT	TAACCGTCAG	GCGTCTAAGG
251	GATACTGGCA	ATCTTGGAAC	CGGGAGAGGT	GAGGGGTACT	TCGGGGGTAG
301	GGGTGAAATC	CTGTAATCCT	CGAGGGACCA	CCTGTGGCGA	AGGCGCCTCA
351	CCAGAACGGC	TTCGACAGTG	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
401	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
451	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN
501	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	AGGAATTGGC	GGGGGAGCAC

### MA\_A9K6; 550 bp

1	ACGGGGTGCA	GCAGGCGCGA	AAATTTTACA	ATGCGGGCAA	CCGTGATAAG
51	GGAACCTCGA	GTGCCTGTAA	ACGCAGGCTG	TTCAGGTGTT	TAAAACGCAC
101	CTGGAGAAAG	GGCCGGGCAA	GACCGGTGCC	AGCCGCCGCG	GTAATACCGG
151	CGGCTCGAGT	GGTGGCCACT	TTTATTGGGC	CTAAAGCGTT	CGTAGCTGGG
201	TTGTTAAGTC	TCTTGGGAAA	TCTGGCGGCT	TAACCGTCAG	GCGTCTAAGG

251	GATACTGGCA	ATCTTGGAAC	CGGGAGAGGT	AAGGGGTACT	TCGGGGGTAG
301	GAGTGAAATC	CTGTAATCCT	CGAGGGACCA	CCTGTGGCGA	AGGCGCCTCA
351	CCAGAACGGC	TTCGACAGTG	AGGGACGAAA	GCTGGGGGCA	CGAACCGGAT
401	TAGATACCCG	GGTAGTCCCA	GCCGTAAACG	ATGCTCGCTA	GGTGTCAGGC
451	ATGGCGCGAC	CGTGTCTGGT	GCCGCAGGGA	AGCCGTGAAG	CGAGCCACCT
501	GGGAAGTACG	GCCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGGAATTGGC	GGGGGAGCAC

# MA\_EK2; 550 bp

1	ACGGGGTGCA	GCAGGCGCGA	AAACTTTACA	ATGCGGGCAA	CCGTGATAAG
51	GGAACCTCGA	GTGCCTGTAA	ATGCAGGCTG	TTCAGGTGCC	TAAAACACAC
101	CTGAAGAAAG	GGCCGGGCAA	GGCCGGTGCC	AGCCGCCGCG	GTAATACCGG
151	CGGCTCGAGT	GGTGGCCGCT	TTTATTGGGC	TTAAAGCGTT	CGTAGCTGGG
201	TTGTTAAGTC	TCTTGGGAAA	TCTGGCGGCT	TAACCGTCAG	GCGCCTAAGG
251	GATACTGGCA	ATCTTGGAAC	CGGGAGAGGT	GAGGGGTACT	TCGGGGGTAG
301	GAGTGAAATC	CTGTAATCCT	CGAGGGACCA	CCTGTGGCGA	AGGCGCCTCA
351	CCAGAACGGC	TTCGACAGTG	AGGGACGAAA	GCTGGGGGAG	CAAACCGGAT
401	TAGATACCCG	GGTAGTCCCA	GCCGTAAACG	ATGCGCGTTA	GGTGTATCGG
451	TGACCACGAG	TTACCGAGGT	GCCGAAGGGA	AACCGTGAAA	CGTGCCGCCT
501	GGGAAGTACG	GTCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGGAATTGGC	GGGGGAGCAC

#### II.1.4.10.2 Analyse der Bacteria Klone

Die Klonierung und Sequenzierung der *Bacteria* Klone erfolgte ähnlich wie für die *Archaea* Klone.

Es wurden hier 15 Sequenzen aus der Domäne *Bacteria* von **Dr. Michael Lebuhn** (LfL, Weihenstephan-Freising) weiter untersucht und die phylogenetische Zuordnung der *Bacteria* Sequenzen bestimmt.

In Abbildung 73 wurden die Positionen der DGGE-Banden markiert, die weiter bearbeitet werden konnten.

Folgende Sequenzen konnten wegen Signalüberlagerungen nicht editiert und analysiert werden: MBB14K5; MBB3K11; MBB3K14.

Die 12 editierbaren Sequenzen wurden zunächst von dem Plasmidanteil bereinigt und im Folgenden über FASTA-Suchen auf nächste Verwandte und im Alignment (MUSCLE) auf Sequenzkonsistenz geprüft.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse zu den einzelnen Sequenzen:

Es handelt sich bei allen 12 Sequenzen um rrs-Bruchstücke von Bacteria.

Von den Sequenzen und den nächsten Verwandten wurde ein neues gemeinsames Alignment angefertigt und die phylogenetische Zuordnung über CLUSTREE (neighbourjoining, Kimura-2-parameter model of substitution, 1000 bootstrap repetitions) bestimmt. Als Outgroup wurde die Sequenz **AE016991** verwendet. Knoten unter 75% Bootstrap-Wahrscheinlichkeit wurden kollabiert. Damit ergab sich kein signifikanter Knoten mehr zum gewählten Outgroup (Abb. 74).

Die Sequenz MBB3K5 ist nicht-identifizierte Bacteria am ähnlichsten (Abb. 74).

Die Sequenz **MBB1K4** ist den *Spirochaetales* mit unbekannter Funktion zuzuordnen (Abb. 74).

Die Sequenzen **MBB19K1** und **MBB8K6** sind *Thermotogales* am ähnlichsten (Abb. 74). Es könnte sich um Primärfermentierer (z.B. xylanolytisch) handeln.

Die Sequenz **MBB6K15** ist *Bacteroidetes* am ähnlichsten, und **MBB6K13** fällt in diese Ordnung (Abb. 74). Hier handelt es sich wahrscheinlich um Sekundärfermentierer (z.B. xylanolytisch, proteolytisch und/oder cellulolytisch).

Die Sequenzen **MBB18K3** und **MBB18K1** sind *Syntrophomonadaceae* am ähnlichsten. Hier handelt es sich wahrscheinlich um Primärfermentierer (möglicherweise syntrophe Acetogene).

Die Sequenz **MBB17K2** ist innerhalb der *Peptostreptococcaceae* einem proteolytischen (NH<sub>3</sub>-Produzent) Bakterium sehr ähnlich.

Die Sequenzen **MBB4K3** und **MBB1K21** fallen (nicht signifikant) in einen Ast unklassifizierter *Clostridiales*. Es handelt sich wahrscheinlich um Primärfermentierer. Die Sequenz **MBB14K9** fällt (nicht signifikant) in die *Clostridiaceae* innerhalb der *Clostridiales*. Es handelt sich wahrscheinlich um Primärfermentierer (möglicherweise cellulolytisch).





#### Abb. 74: Phylogenetische Analyse von Bacteria-rrs-Klonen aus mesophilen Biogas-Reaktoren.

# MBB14K9; 572 bp

1	NNNNNNNNN	NNNNNNNG	GGAATATTGC	GCAATGGACG	GAAGTCTGAC
51	GCAGNGACGC	CGCGTGAGCG	ATGAAGGCCT	TCGGGTCGTA	AAGCTCTGTC
101	CTTGGGGAAG	AAGGTCTTCG	GACCTGACGG	TACCCAAGAA	GAAGGCCCCG
151	GCTGACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA	CGTAGGGGGC	GAGCGTTGTC
201	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	AGCGCGTAGG	CGGGTAATTA	AGTCAGATGT
251	GAAAGACCGG	GGCCTAACCC	CGGGGTTGCA	TCTGAAACTG	GATATCTTGA
301	GGGCAGGAGA	GGAAAGTGGA	ATTCCTGGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAA
351	ATCAGGAGGA	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	TTTCTGGACT	GACCCTGACG
401	CTGATGTGCG	AAAGTGTGGG	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC
451	CACGCTGTAA	GCGATGGATA	CTAGGTGTGG	GAGGTATCGA	CCCCTTCCGT
501	GCCGGAGCTA	ACGCAATAAG	TATCCCGCCT	GGGGAGTACG	GTCGTAAGGC
551	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC	GG		

# MBB17K2; 559 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT
51	GCAGCAAGGC	CGCGTGAACG	ATGAAGGTCT	TCGGATCGTA	AAGTTCTGTC
101	GCAGGGGAAG	ATAATGACGG	TACCCTGTGA	GGAAGCACCG	GCTAACTACG
151	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CGTAGGGTGC	TAGCGTTATC	CGGATTTACT
201	GGGCGTAAAG	GGTGCGTAGG	TGGTCTTTCA	AGTCGGTGGT	TAAAGGCTAC
251	GGCTCAACCG	TATTAAGCCG	CCGAAACTGG	AAGACTTGAG	TGCAGGAGAG
301	GAAAGTGGAA	TTCTCAGTGT	AGCGGTGAAA	TGCGTAGATA	TTGAGAAGAA
351	CACCAGTAGC	GAAGGCGGCT	TTCTGGACTG	TAACTGACAC	TGAGGCACGA
401	AAGCGTGGGT	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAAA
451	CGATGAGTAT	TAGGTGTCGG	GGGTTACCCC	CCTCGGTGCC	GCAGTTAACG
501	CATTAAATAC	TCCGCCTGGC	GAGTACGCAC	GCAAGTGTGA	AACTCAAAGG
551	AATYGACGG				

# MBB18K1; 561 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGAGG	GAACTCTGAT
51	GCAGCAACGC	CGCGTGAGTG	AAGAAGGTTT	TCGGATCGTA	AAACTCTGTC
101	ATTGGGGAAG	AATAAATGAC	GGTACCCAAT	GAGGAAGCCC	CGGCTAACTA
151	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	AACGTAGGGG	GCGAGTGTTG	TCCGGAATTA
201	CCGGGCGTAA	AGGGCATGCA	GGCGGTGCGC	CAAGTCGGGG	GTGTAAAGTT
251	ACGGCTCAAC	CGTGACCTTG	CAATCGAAAC	TGGCGCACTG	GAGTGCGGGA
301	GAGGGAAGTG	GAATTCCCGG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATCGGGAG
351 GAACGCCAGT GGCGAAGGCG GCTTCCTGGC CCGCGACTGA CGCTCATGTG
401 CGAAAGCCAG GGGAGCGAAC CGGATTAGAT ACCCGGGTAG TCCTGGCCGT
451 AAACGATCGG TGCTAGGTGT AGGCGCGTCA AGCGTCTGTG CCGAAGTTAA
501 TGCGATAAGC ACCTCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGGCT GAAACTCAAA
551 GGAATTGACG G

#### MBB18K3; 561 bp

1CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGTACAATGGAGGGAACTCTGAT51GCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTC101ATTGGGGAAGAATAAATGACGGTACCCAATGAGGAAGCCCCGGCTAACTA151CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGGGGCGAGTGTTGTCCGGAATTA201CCGGGCGTAAAGGGCATGCAGGCGGTGCGCCAAGTCGGGGGTGTAAAGTT251ACGGCTCAACCGTGACCTGCAATCGAAACTGGCGCACTGGAGTGCGGGA301GAAGGCAAGTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGCCCGCGACTGACGCTCATGTG351GAACGCCAGTGGGAGCGAACCGGAATGCGACCCGGGTAAACCCAAGTCAAA501TGCGATAAGCGGGGAATTGACGGAAACCAAAGGAAACCAAAA551GGAATTGACGGGGGGG

## MBB19K1; 581 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATCTTGG	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT
51	CCAGCGACGC	CGCGTGGAGG	AAGAAGTCCT	TCGGGATGTA	AACTTCTGAA
101	CTAGCCGAAT	AAAAGGCCTG	TGGACACACA	GGAGAAGAAA	GTAGGCTAGG
151	AAAAGTCCCG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA	CGTAGGGGGC
201	AAGCGTTACC	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	GGGGCGTAGG	CGGTAAAAGA
251	AGTCATCTGT	GAAAACCTAT	TGCTCAACGA	TAGGCTAGCG	GATGAAACAG
301	AATTACTTGA	GGGCACCAGA	GGTAGACGGA	ATTACCCGAG	TAGGGGTGAA
351	ATCCGCAGAT	ACGGGTAGGA	ACGCCGGTGG	AGAAGTCGGT	CTACTGGGGT
401	GCACCAGTCG	CTGAGGCCCG	AAAGCTAGGG	GAGCAAACCG	GATTAGATAC
451	CCGGGTAGTC	CTAGCCGTAA	ACGATGCTCA	CTAGGTGTAG	GGAGTGATAA
501	ACTCTCTGTG	CTGAAGCGAA	CGCGCTAGGT	GAGCCGCCTG	GGGAGTACGT
551	CCGCAAGGAT	GAAACTCAAA	TGAATYGACG	G	

#### MBB1K21; 570 bp

- 1 CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATATTGC GCAATGGACG GAAGTCTGAC
- 51 GCAGCGACGC CGCGTGAGCG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AAGCTCTGTC
- 101 CTTGGGGAAG AAGGCGAAAG CTTGACGGTA CCCAAGAAGA AAGCCCCGGC

151 TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGGGCGA GCGTTGTCCG
201 GAATTACTGG GCGTAAAGGG TGCGTAGGCG GCCCTTTAAG TCGGATGTGA
251 AAGCCCGCGG CTTAACCGCG GAATGGCATT YGAAACTGGA CGGCTTGAGT
301 GTCGGAGAGG GTAGTGGAAT TCCCAGCGTA GCGGTGAAAT GCGTAGATAT
351 TGGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTA CCTGGACGAT AACTGACGCT
401 GAGGCACGAA AGCTAGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCT
451 AGCCGTAAAC GATGGGTACT AGGTGTGGGT GGTTTCGATA CCATCCGTGC
501 CGTAGTTAAC GCATTAAGTA CCCCGCCTGG GGAGTACGTG CGCAAGCATG
551 AAACTCAAAG GAATTGACGG

## MBB1K4; 584 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGCTA	AGAATCTTCC	GCAATGGGCG	AAAGCCTGAC
51	GGAGCGACGC	CGCGTGAACG	ATGAAGGCCG	TGAGGTTGTA	AAGTTCTTTT
101	CGGGAGGGGG	AATAAGCGTG	GCAGGCAATG	GCCGCGCGAT	GACGTGAATC
151	CCGGAATAAG	CCCCGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAACACGTAG
201	GGGGCGAGCG	TTGTTCGGAA	TCATTGGGCG	TAAAGGGCGT	GCAGGCGGCC
251	CTGCAAGTCC	GGCGTGAAAT	GTCCCGGCTC	AACCGGGGGAG	ACGCGCTGGA
301	AACTGTGGGG	CTTGAGTACA	GGAGGGGATG	CCGGAATTCC	AGGTGTAGGG
351	GTGAAATCTG	TAGATATCTG	GAGGAACACC	AATGGCGAAG	GCAGGCATCT
401	GGCCATGTAC	TGACGCTGAG	ACGCGAAGGT	GCGGGGAGCA	AACAGGTTTA
451	GATACCCTGG	TAGTCCGCAC	AGTAAACGAT	GTGCACCAGG	TGGCGGGGGG
501	TCAACCCTCG	GTACCGAAGC	TAACGCATTA	AGTGCACCGC	CTGGGGAGTA
551	TGCTCGCAAG	GGTGAAACTC	AAAGGAATYG	ACGG	

### MBB3K5; 592 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTCG	AGAATAGTCT	ACAATGGTCG	AAAGACTGAT
51	AGTGCGACGC	CGCGTGAACG	AAGACTCCTT	TCGGGGTGTA	AAATTCTTTT
101	ATATGTGAGC	AGTGGATGTT	ACATTAATAG	TGTGATATCA	GGGATATTAG
151	CATATGAATA	AGCAACGGCT	AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAACACGG
201	GGGTTGCGAG	CGTTGTCCGG	AATTACTAGG	CGTAAAGGGC	AGGTAGGCGG
251	AGATGTAAGT	TTGATGTTAA	AGGTACTGGC	TCACCCAGTG	TACGGCATCA
301	GATACTGCAT	TTCTTGAATA	CGGTTGGGGA	AGACAGAATT	CCTGGTGTAG
351	CGGTGGAATG	CGCAGAGATC	AGGAGGAATA	CCGAAGGCGA	AGGCAGTCTT
401	CTAAGCCGGT	TATTGACGCT	AAACTGCGAA	GGTGTGGGTA	TCAAACAGGA
451	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	CACAGTAAAC	GATAATCACT	AGGTGTCGGT
501	TTCTTATCAA	TGGATTCGGT	GCCGTAGCTA	ACGCGTTAAG	TGATTCGCCT
551	GGGGAGTACG	ATCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATYGAC	GG

## MBB4K3; 572 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG	GGAATATTGC	GCAATGGACG	GAAGTCTGAC
51	GCAGCGACGC	CGCGTGAGCG	ATGAAGGTCT	TCGGATCGTA	AAGCTCTGTC
101	CTTGGGGAAG	AAGGTCTTCG	GACTTGACGG	TACCCAAGAA	GAAAGCCCCG
151	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CGTAGGGGGC	GAGCGTTGTC
201	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	GGTGCGTAGG	CGGCCCTTTA	AGTCGGATGT
251	GAAAGCCCGC	GGCTTAACCG	CGGAATGGCA	TTCGAAACTG	GAGGGCTTGA
301	GTGTCGGAGA	GGGTAGTGGA	ATTCCCAGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT
351	ATTGGGAGGA	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC	TACCTGGACG	ATAACTGACG
401	CTGAGGCACG	AAAGCTAGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGCAGTC
451	CTAGCCGTAA	ACGATGGGTA	CTAGGTGTGG	GTGGTTTCGA	TACCATCCGT
501	GCCGTAGTTA	ACGCATTAAG	TACCCCGCCT	GGGGAGTACG	TGCGCAAGCA
551	TGAAACTCAA A	.GGAATTGAC G	G		

# MBB6K13; 579 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGA	GGAATTTTGG	TCAATGGACG	CAAGTCTGAA
51	CCAGCCATGT	CGCGTGTAGG	AGGACGGCCC	TAAGGGTTGT	AAACTTCCTT
101	TGCAGTGGAA	TAAAGTTTGC	CACGTGTTGG	CGATTTGCAA	GTACGCTGCG
151	AATAAGGATC	GGCTAACTCC	GTGCCAGCAG	CCGCGGTAAT	ACGGAGGATC
201	CAGGCGTTAT	CCGGATTTAT	TGGGTTTAAA	GGGTGCGCAG	GCGGGGAATT
251	AGGTCGGCGG	TGAAATTTCG	GGGCTCAACC	TCGACAGTGC	CGTTGTAACC
301	GTTTCTCCTG	AGTGCGGATG	AGGTAGGCGG	AATTTGTGGT	GTAGCGGTGA
351	AATGCGTAGA	TATCACAAGG	AACACCGATT	GCGGAGGCAG	CTTACTAAAC
401	CGTTACTGAC	GCTCATGCAC	GAAGGCGTGG	GGATCAAACA	GGATTAGATA
451	CCCTGGTAGT	CCACGCAGTA	AACGATGATT	ACTTGCTGTT	TGCGATACAC
501	AGTAAGCGGC	GAAGCGAAAG	CGTTAAGTAA	TCCACCTGGG	GAGTACGTTC
551	GCAAGAATGA	AACTCAAATG	AATTGACGG		

# MBB6K15; 566 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG	GGAATATTGC	GCAATGGACG	GAAGTCTGAC
51	GCAGCGACGC	CGCGTGAGCG	ATGAAGGTCT	TCGGATCGTA	AAGCTCTGTC
101	CTTGGGGAAG	AAGGCGAAAG	CTTGACGGTG	CCCAAGAAGA	AAGCCCCGGC
151	TAACTACGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	TAGGATCCGA	GCGTTATCCG
201	GATTTATTGG	GTTTAAAGGG	TGCGTAGGCG	GAAATGTAAG	TCAGTGGTGA
251	AATCCTGCAG	CTTAACTGTA	GAATAGCCGT	TGAAACTGTG	TTTCTTGAGT
301	ACATTTGAGG	TAGGCGGAAT	GTGGTGTGTA	GCGGTGAAAT	GCATAGATAT
351	ACCACAGAAC	ACCGATTGCG	GAGGCAGCTT	ACTAAACTGT	CACTGACGCT
401	GATGCACGAA	AGCGTGGGTA	TCAAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA

- 451 CGCTGTAAAC GATGATTACT GGTTGTTTGC GATACACTGC AAGTGACTGA
- 501 GCGAAAGCAC TAAGTAATCC ACCTGGGGAG TACGTCGGCA ACGATGAAAC
- 551 TCAAAGGAAT TGACGG

## MBB8K6; 581 bp

1	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATCTTGG	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT
51	CCAGCGACGC	CGCGTGGAGG	AAGAAGTCCT	TCGGGATGTA	AACTTCTGAA
101	CTAGCCGAAT	AAAAGGCCTG	TGGACACACA	GGAGAAGAAA	GTAGGCTAGG
151	AAAAGTCCCG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA	CGTAGGGGGC
201	AAGCGTTACC	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	GGGGCGTAGG	CGGTAAAAGA
251	AGTCATCTGT	GAAAACCTAT	TGCTCAACGA	TAGGCTAGCG	GATGAAACTG
301	AATTACTTGA	GGGCACCAGA	GGTAGACGGA	ATTACCCGAG	TAGGGGTGAA
351	ATCCGCAGAT	ACGGGTAGGA	ACGCCGGTGG	AGAAGTCGGT	CTACTGGGGT
401	GCACCAGACG	CTGAGGCCCG	AAAGCTAGGG	GAGCAAACCG	GATTAGATAC
451	CCGGGTAGTC	CTAGCCGTAA	ACGACGCTCA	CTAGGTGTAG	GGAGTGATAA
501	ACTCTCCGTG	CTGAAGCGAA	CGCGCTAAGT	GAGCCGCCTG	GGGAGTACGT
551	CCGCAAGGAT	GAAACTCAAA	GGAATTGACG	G	

## II.1.4.11 Kultivierungsversuche mit der Multi-probable-number (MPN) Methode

## A- <u>Übertragbarkeitsversuche</u>

Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien wurden bei den Übertragbarkeitsversuchen mit Most Probable Number (MPN) Test geschätzt (Gavin und Cummings 1978). Die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien erfolgte mit DSMZ Medium 330 (Rumen Bacteria Medium). Hier wurde die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bewertet.

- 3500L Durchfluss (Tag 32):  $1,7 (\pm 0,54) \ge 10^6$  KBE / ml
- 3500L Batch (Tag 32):  $4 (\pm 2) \times 10^{6} \text{ KBE} / \text{ml}$
- 36L Batch (Tag 32): 1,2 ( $\pm$  0,65) x 10<sup>7</sup> KBE / ml

Bei diesen Versuchen wurde festgestellt, dass in den Batchsystemen mehr Kolonien gebildet sind, als in Durchflussreaktoren. Auch wurde gezeigt, dass bei 36L Batch mehr Kolonien abgezählt wurden, als bei 3500L Batchfermenter.

## **B- Substratversuche**

Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien der einzelnen physiologischen Bakteriengruppen in den verschiedenen Fermentern wurde mittels selektiven Substraten oder durch den Nachweis spezifischer Stoffwechselprodukt mit der MPN Methode bestimmt.

Bei dem Substratversuch handelt es sich um Maissilage.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass die kultivierbaren Bakterien bei den einzelnen physiologischen Gruppen in den Fermentern unterschiedlich wuchsen (Tab. 7).

Auch wurde beobachtet, dass durchschnittlich mehr Methanogenen in den Fermentern wachsen, als Sulfatreduzierer (SRB). Diese Beobachtung wurde von der FISH Methode nicht bestätigt. Dabei wurden mehr SRB abgezählt als Methanogenen. Vermutlich lag das daran, dass die Kultivierungsbedingungen nicht zugunsten der SRB waren, obwohl die SRB weniger Empfindlich zum Sauerstoff als die Methanogenen sind.

Auf der anderen Seite wurden mehr Kolonien abgezählt in Batchfermentern als in Durchflussfermentern. Diese Bestimmung konnte damit bestätigen, dass im Batchverfahren durch die einmalige Substratzufuhr die anaerobe Biozönose vom Sauerstoff weniger gestört wurde als im Durchflussverfahren. Die höchste Zahl der kultivierbaren Methanogenen wurde bei 2L Batchfermenter mit Maissilage festgestellt. Dabei lag die Zahl der gebildeten Kolonien bei 13,6 ( $\pm$ 0,6) x 10<sup>5</sup> /ml (Tab. 7). Für die SRB lag die Anzahl der Kolonien bei 12,65 ( $\pm$  0,5) x 10<sup>5</sup> /ml (Tab. 7).

Am schlechtesten wuchsen die homoacetogenen Bakterien in den 3500L Durchflussfermentern mit Maissilage, wobei die Zahl der gebildeten Kolonien bei 0,33 ( $\pm$  0,45) x 10<sup>5</sup> /ml lag.

	Zellzahl x 10 <sup>5</sup> / ml Fermenterprobe				
Fermenter	Anaerobia	Methanogene	Sulfatreduzierer	Homoacetogene	
3500LD SBW +	5,5 (± 0,9)	2,15 (± 0,3)	3,5 (± 0,45)	0,33 (± 0,45)	
Maissilage					
36LD SBW ohne	2,25 (± 1,5)	1,66 (± 1,5)	5,35 (± 0,5)	2,5 (± 1,3)	
Substrat					
36LD SBW +	$4(\pm 0,6)$	9,15 (± 0,6)	2,75 (± 2,5)	1 (± 1)	
Maissilage					
36LB SBW +	5 (± 0,5)	11,6 (± 0,4)	8,5 (± 1)	2,66 (±0,45)	
Maissilage					
2LB SBW +	5,5 (± 0,2)	13,8 (± 0,6)	12,65 (± 0,5)	2,66 (± 0,5)	
Maissilage					
Standardbiozönose	6,5 (± 0,6)	6 (± 0,5)	5,5 (± 0,6)	2,3 (± 1,1)	
(13.07.2004)					

**<u>Tab.</u>** 7: Die abgezählten Kolonien der einzelnen physiologischen Bakteriengruppen aus den verschiedenen Fermentern.

### **II.1.5** Literaturverzeichnis

Adrian L. (1999): Reduktive Dechlorierung von Trichlorbenzolen durch anaerobe Mikroorganismen. Dissertation Technische Universität Berlin.

**Akila G. and T. S. Chandra (2003):** A novel cold-tolerant Clostridium strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulose. FEMS Microbiology Letters. 63 - 67.

Alm E. W., Oerther D. B., Larsen N., Stahl D. and Raskin L. (1996): The oligonucleotide probe database. Appl. Environm. Microbiol. 3557-3559.

Amann R. and Ludwig W. (2000): Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol Rev. 24: 555-565.

Amann R. (1995): Fluorescently labelled, rRNA-targeted Oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Mol. Ecol. 4: 543-554.

Amann R., Ludwig W. and Schleifer K.-H. (1995): Phylogenetic identification and in Situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169.

Amann R., Krumholz L. and Stahl D. A. (1990): Fluorescent-Oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology.J. Bacteriol. 172: 762-770.

**Angelidaki I. and Ahring B. K. (2000):** Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. Water Sci. Technol. 41(3):189-94.

**ATV-FACHGRUPPENAUSSCHUSS, Arbeitsbericht 3 (1994):** Geschwindigkeitsbestimmende Schritte beim anaeroben Abbau von organischen Verbindungen in Abwässer. Korrespondenz Abwasser, S. 41-101. Bache, R. and Pfennig. N. (1981): Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Arch. Microbiol. 130:255-261.

Balch W. E., Fox G. E., Magrum L. J., Woese C. R. and Wolf R. S. (1979): Methanogens; Reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43: 260-296.

Barker H. A. (1956): Bacterial Fermentation. Wiley, New York.

**Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten (Stmlf, Bayern):** Biogas – Entwicklungstrends.

**Becker, G. und Hams, S. (2002):** Erfahrungen mit unterschiedlichen Systemen für Gärtests. Tagung "Vergärung organischer Stoffe". 18./19. April 2002. Düsseldorf.

Beimfohr C., Krause A., Amann R., Ludwig W. and Schleifer, K.-H. (1993): In situ identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. Syst. Appl. Microbiol. 16, 450-456.

**Bernard L., Courties C., Duperray C., Schäfer H., Muyzer G. and Lebaron P. (2001)**: A new Approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. Cytometry. 43: 314-321.

**Biavati B. and Mattarelli P. (1991):** *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumen of cattle. Int. J Syst Bacteriol. 41 (1): 163-168.

**Bunthof C.J., van Schalkwijk S., Meijer W., Abee T. and Hugenholtz J. (2001):** Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. Appl Environ Microbiol. 67(9): 4264-71.

Crocetti G., Murto M. and Bjornsson L. (2005): An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridization (FISH). J Microbiol Methods.

**Dabert P., Delgenès J.-P., Moletta R. and Godon J.-J. (2002)**: Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. Re/Views in Enviro. Sc. 1: 39-49.

**Dahllöf I.** (2002): Molecular community analysis of microbial diversity. Curr. Op. Microbiol. 13: 213-217.

**Davenport R. J., Curtis T. P., Goodfellow M., Stainsby F. M. and Bingley M. (2000)**: Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing Actinomycetes and foaming in activated sludge plants. Appl. Environm. Microbiol. 1158-1166.

**Delbes C., Moletta R. and Godon J. J. (2000):** Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. Environ Microbiol. 2(5):506-15.

**Delong E. (2002)**: Microbial population genomics and ecology. Curr. Op. Microbiol. 5: 520-524.

**Devereux R., Kane M. D., Winfrey J. and Stahl D. A. (1992)**: Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing-bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 15: 601-609.

**E.I.b.w. Umwelttechnik (3/2005):** Von der Innovation zum Praxiseinsatz in: Biogas. Seite 35.

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2004): Handreichung, Biogasgewinnung und –nutzung.

Garcia J.-L., Patel, Bharat K. C. and Ollivier B. (2000): Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. Anaerobe. 6: 205-226.

Gavala H. N., Skiadas I. V., Ahring B. K. and Lyberatos G. (2005): Potential for biohydrogen and methane production from olive pulp. Water Sci Technol. 52(1-2):209-15.

Gavin, J. J. and Cummings D. P. (1978): Enumeration of Microorganisms, p. 727-736. In J. J. Gavin and D. P. Cummings (eds.), CRC Handbook of Microbiology.

Hansjörg Nußbaum (2004): 7000 Liter Milch aus dem Grundfutter – Wahrheit oder Wunschgedanke? (Vortrag bei der Landwirtschaftskammer Niederösterreich im November 2004).

Harmsen H. J. M., Akkermans A. D. L., Stams A. J. M. and de Vos W. M. (1996a): Population dynamics of Propionic acid-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2163-2168.

Harmsen H. J. M., Kengen H. M. P., Akkermans A. D. L., Stams A. J. M. and de Vos W. M. (1996b): Detection and localisation of syntrophic Propionic acid-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based Oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1656-1663.

Harriott O. T. and Frazer A. C. (1997): Enumeration of Acetogens by a Colorimetric Most-Probable-Number Assay. Appl. Environ. Microbiol. 63:296-300.

Hill D. T., Cobbs S. A. and Bolte J. P. (1987): Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digestion failure. Trans. ASAE 30, 496-501.

Hungate R. E. (1967): A role tube methode for the cultivation of strict anaerobes. In Methods in Microbiology, Vol 2B, J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), pp. 117-132. Acedemic press, New York.

Hurt R. A., Qiu X., Wu L., Roh Y. and Palumbo A. V. (2001): Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4495-4503.

Institut für Land-, Umwelt- und Energietechnik der Universität für Bodenkultur in Wien (ILUE, 2003, Österreich): Optimierung der Biogaserzeugung aus den

Energiepflanzen Mais und Kleegras. Endbericht Juli 2003. Forschungsprojekt Nr. 1249 GZ 24.002/59-IIA1/01

**Ishii K. and Fukui M. (2001):** Optimization of Annealing Temperature to reduce Bias caused by Primer Mismatch in Multitemplate PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3753-3755.

Jiang J., Alderisio K. A., Singh A. and Xiao L. (2005): Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Appl. Environ. Microbiol. 71. 1135- 1141.

**Joux F. and Lebaron P. (2000):** Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes and infections. 1523-1535.

**Kreader C. A. (1996):** Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1102-1106.

Kotsyurbenko O. R., Chin K. J., Glagolev M. V., Stubner S., Simankova M. V., Nozhevnikova A.N. and Conrad R. (2004): Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. Environ Microbiol. 6(11):1159-73.

Kuske C. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C., Hill K. K. And Jackson P. J. (1998): Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2463-2472.

LaMontagne M. G., Michel Jr. F. C., Holden P. A. and Reddy C. A. (2002): Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. J. Mic. Meth. 49: 255-264.

Lebuhn M., Effenberger M., Gronauer A. and Wilderer P. (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. Water Sci. Tech. In press.

Leff L. G., Dana J. R., McArthur J. V. and Shimkets L. J. (1995): Comparison of Methods of DNA Extraction from Stream Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1141-1143.

Leitch A. R., Schwarzacher T., Jackson D. and Leitch I. J. (1994): In Situ-Hybridisierung. Aus dem Engl. Übers. Von Beate Bettenhausen. Heidelberg. Spektrum Akad. Verl.

Liu S. (1997): An improved colorimetric assay for vicinal diol determination by Ti (III) and its utilization for reporting microbial O-demethylation. J. Microbiol. Methods 29: 85-95.

Loy A., Horn M. and Wagner M. (2003): ProbeBase, an online resource for rRNAtargeted oligonucleotide probes. Nucleic Acid Res., 31, 514-516.

Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. (2002): Brock Biology of Microorganisms. 10<sup>th</sup> Edition. Prentice-Hall international Editions.

Marchaim U. and Carsten Krause (1993): Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. Bioresource Technology. Volume 43, Issue 3, Pages 195-203

**Marounek M. and Bartos S. (1986):** Stoichiometry of glucose and starch splitting by strains of amylolytic bacteria from the rumen and anaerobic digester. J Appl Bacteriol. 61(1):81-6.

Maukonen J., Matto J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T. and Saarela M. (2003): Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. J Ind Microbiol Biotechnol. 30(6):327-56.

McKendry P. (2002a): Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology. Volume 83, Issue 1, Pages 37-46; Copyright © 2005 Elsevier Ltd. McKendry P. (2002b): Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. Bioresource Technology. Volume 83, Issue 1, Pages 47-54; Copyright © 2005 Elsevier Ltd.

McKendry P. (2002c): Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. Bioresource Technology. Volume 83, Issue 1, Pages 55-66; Copyright © 2005 Elsevier Ltd.

Miller D. N. (2001): Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. J. Mic. Meth. 44: 49-58.

Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L. and Ghiorse W. C. (1999): Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4715-4724.

Mladenovska Z., Dabrowski S. and Ahring B. K. (2003): Anaerobic digestion of manure and mixture of manure with lipids: biogas reactor performance and microbial community analysis. Water Sci Technol.; 48 (6):271-8.

**Moreira D.** (1998): Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nuc. Ac. Res. 26: 3309-3310.

**Muyzer G. (1999)**: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr. Op. Microbiol. 2: 317-322.

**Muyzer G. and Smalla K. (1998a)**: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. An. van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. and Wawer C. (1998b): Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Molecular Microbial Ecology Manual, 3.4.4: 1-27. **O'Reilly C. and Colleran E. (2005):** Toxicity of nitrite toward mesophilic and thermophilic sulphate-reducing, methanogenic and syntrophic populations in anaerobic sludge. J Ind Microbiol Biotechnol. 32(2):46-52.

**Pernthaler A., Pernthaler J. and Amann R. (2002):** Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 3094-3101.

**Pfennig N. (1978):** *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B12- requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. Int. J. Syst. Bact. **28**:283-288.

**Rabaey K. and Verstraete W. (2005):** Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends Biotechnol. 23(6):291-8.

Raskin L., Poulsen L. K., Noguera D. R., Rittman B. E. and Stahl D. A. (1994a): Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by Oligonucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1241-1248.

**Raskin L., Stromley J. M., Rittman B. E. and Stahl D. A. (1994b)**: Group-specific 16 S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1232-1240.

Schattner S. und Gronauer A. (2001): Methanbildung verschiedener Substrate - Kenntnisstand und offene Fragen. In FNR Hrsg.; Gülzower Fachgespräche: Energetische Nutzung von Biogas: Stand der Technik und Optimierungspotenzial; Band 15, S.28-39.

Schiffner (2003): in "Biogastechnolgie in Thüringen- eine Bestandsaufnahme". Workshop: Übersicht über landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Thüringen. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL). Von STIFT und TLL, Mai 2003.

**Schofield P. (2000):** Gas production methods. In: Farm animal metabolism and nutrition. CAB International. 209 - 232.

**Shi V. Liu (1997):** An improved colorimetric assay for vicinal diol determination by Ti (III) and its utilization for reporting microbial O-demethylation. Journal of Microbiological Methods. Volume 29, Issue 2, Pages 85-95

**Snell-Castro R., Godon J. J., Delgenès J. P. and Dabert P. (2005):** Characterization of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. FEMS Microbiol Ecol. 52(2):229-42.

Sambrook J. E., Fritsch F. and Maniatis T. (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Santegoeds C. M., Damgaard L. R., Hesselink G., Zopfi J., Lens P., Muyzer G. and de Beer D. (1999): Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses. Appl Environ Microbiol. 65(10): 4618-29.

Sigler W. V., Miniaci C. and Zeyer J. (2004): Electrophoresis time impacts the denaturino gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. J. of Microbiol. Methods; 57. 17-22.

Schmalenberger A., Schwieger F. and Tebbe C. (2001): Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA Gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3557-3563.

Scheid D. and Stubner S. (2001): Structure and diversity of Gram-negative sulfatereducing bacteria on rice roots. FEMS Microbiol. Eco. 36, 175-183.

Schmidt J. E., Mladenovska Z., Marianne Lange M. and Ahring B. K. (2000): Acetate conversion in anaerobic biogas reactors: Traditional and molecular tools for studying this important group of anaerobic microorganisms. Biodegradation 11: 359–364, 2000.

Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T. and Uchiyama H. (2001): A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Biotech. Letters. 23: 1205-1208.

Shihwu S. and Tao Liub (2003): Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. Chemosphere. Volume 53, Pages 43-52. Copyright © 2003 Elsevier Ltd.

**Spanjer H., Weijma J. and Abusam A. (2002):** Modelling the competition between sulphate reducers and methanogens in a thermophilic methanol-fed bioreactor. Water Sci Technol.; 45(10):93-8.

Stach J. E. M., Bathe S., Clapp J. P. and Burns R. G. (2001): PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. FEMS Microbiol. Ecol. 36. 139-151.

**Suzuki M. T. and Giovannoni S. J. (1996)**: Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62: 625-630.

**Tebbe C. and Vahjen W. (1993)**: Interference of Humic Acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2657-2665.

**Torsvik V. and Øvreås L. (2002)**: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Op. Microbiol. 5: 240-245.

Torsvik V., Daae F. L., Sandaa R.-A. and Øvreås L. (1998): Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. J. Biotech. 64: 53-62.

**Trochimchuk T., Fortheringham J., Topp E., Schraft H. and Leung K. T. (2003):** A comparison of DNA extraction and purification methods to detect Escherichia coli O157:H7 in cattle manure. J. Microbiol. Methods. 54, 165-175.

Tschech A. and Pfennig N. (1984): Growth yield increase linked to caffeate reduction in

**Ungerfeld E. M., Rust S. R., Boone D. R. and Liu Y. (2004):** Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. J. Appl. Microbiol. 97(3):520-6.

**Vahjen W. and Tebbe C. (1994):** Enhanced detection of genetically engineered *Corynebacterium glutamicum pUN1* in directly extracted DNA from soil, using the T4 gene 32 protein in the polymerase chain reaction. Eur. J. Soil Biol. 30: 93-98.

**Yadvika S., Sreekrishnan T. R., Kohli S. and Rana V. (2004):** Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques--a review. Bioresource Technol. 95(1):1-10.

Wagner M., Amann R., Lemmer H. and Schleifer K. H. (1993): Probing activated sludge with Oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1520-1525.

Wagner M., Amann R., Kämpfer P., Assmus B., Hartman A., Hutzler P., Springer N. and Schleifer K. H. (1995): Identification and in situ detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. Syst. Appl. Microbiol., 17:405–417.

Weijma J, Gubbels F, Hulshoff Pol LW, Stams AJ, Lens P, Lettinga G. (2002): Competition for  $H_2$  between sulfate reducers, methanogens and homoacetogens in a gaslift reactor. Water Sci Technol. 45(10):75-80.

**Weiland P. (2003):** Production and energetic use of biogas from energy crops and wastes in Germany. Appl Biochem Biotechnol. 109 (1-3): 263-74.

Widdel, F. and F. Bak. (1992): Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. In Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K. H. (eds.), The prokaryotes. New York.

Wilson I. G. (1997): Inhibition and facilitation of Nucleic Acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751.

Woese C. (1987): Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 221-271.

**Wolfe R. S. (1993):** An historical overview of Methanogenesis, in Methanogenesis, Editor Ferry J. G. Chapman & Hall. New York.

Zehnder A. J. and Wuhrmann K. (1976): Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidationreduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science 194:1165-1166.

Zhou J., Brunns M. A. and Tiedje J. M. (1996): DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-322.

Zhou J., Xia B., Treves D. S., Wu L.-Y., Marsh T. L., O'Neill R. V., Palumbo A. V. and Tiedje J. M. (2002): Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 326-334.

**Zinder S. H. (1993):** Physiological Ecology of Methanogens, in Methanogenesis, Editor Ferry J. G. Chapman & Hall. New York.

## II.2 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans

Die aus den verschiedenen Experimenten der Co-Vergärung gewonnenen ermittelten mikrobiologischen Versuchsergebnisse zeigten, dass die Mikrobiologie und dadurch die Biozönose von dem Typ und Bauart des Fermenters sowie die güllebasierende Substratzusammensetzung beeinflusst werden kann. Diese Beobachtung ließ sich durch die physikalisch-chemischen Analysen deutlich bestätigen (Quelle: LfL-Partner).

Es wurde bei diesen Versuchen auch festgestellt, dass hier um ein sehr komplexes System mit hoher Biodiversität handelte. Dabei dominierte die Domäne *Bacteria* auf Kosten der *Archaea* Populationen.

Auch wurde während der Standardbiozönose-Herstellung eine Verschiebung innerhalb der Methanogenen beobachtet. Dabei wurden die *Methanosarcina* Zellen am Anfang der Vergärung kaum detektiert, während die Zellzahl der *Methanosoccus* Population bei etwa 2-3% lag. Später wuchsen die *Methanosarcina* Zellen sehr stark und dominierten nach etwa 4 bis 5 Wochen der Vergärung und lag das Zellzahlverhältnis bei etwa 5-6%.

Bei der Übertragbarkeitsversuche wurde diese Populationsverschiebung innerhalb der Methanogenen nicht beobachtet aber die *Methanosarcina* Zellen dominierten immer noch.

Bei den Übertragbarkeitsversuchen mit Praxissubstrat dominierten die *Methanococcus* Zellen in allen 3 Fermentern (Praxisfermenter, 3500L und 36L Durchflussfermenter), während die *Methanosarcina* Population kaum detektiert wurde.

Bei den Substraten Co-Vergärung wurde auch gezeigt, dass die ausgewählten Bakteriengruppen bei den Substraten unterschiedlich wuchsen. So wuchsen beispielsweise die Sulfatreduzierer (SRB) in den 3500L, 36L und 2L mit Rapsöl durchschnittlich besser als mit Mais- oder Gras-Silage. Auch ließen sich die Methanogenen mit Rapsöl gut behaupten. Am schlechtesten wuchsen meistens hier die Bakteriengruppen mit Grassilage.

## II.3 Bekannte Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens

Es liegen zurzeit kaum Daten zur Frage der Mikrobiologie der Übertragbarkeit vor. Erkenntnisse über die Mikrobiologie der landwirtschaftlichen Biogasanlagen sind sehr spärlich und beruhen meistens auf Basis von Laborfermentern.

So berichtet eine Veröffentlichung des bayerischen Staatsministeriums für Landwirtschaft und Forsten in Biogas-Entwicklungstrends, dass in den landwirtschaftlichen Biogasanlagen vor allem die empfindliche Gruppe der methanbildenden Bakterien optimale Bedingungen (z.B. pH 7 und 38 °C) vorfinden werden aber die Gruppe hydrolisierenden Bakterien (Sie übernehmen den ersten Schritt des Abbaus, die Aufspaltung der langen Molekülketten in kurzkettige Kohlenwasserstoffe) dagegen nicht optimal arbeiten, weil sie einen pH-Wert im leicht saueren Milieu und etwas niedrigere Temperatur bevorzugen (Stmlf, Bayern).

Auch wenn zukünftig die für die einzelnen Abbauschritte verantwortlichen Organismen identifiziert werden können, so könnten dieser vermehrt werden, und dann zur gezielten Beimpfung des Fermentationsprozesses verwendet werden (Stmlf, Bayern).

Auch eine Publikation der IPUS GmbH erläuterte, dass den größten Unsicherheitsfaktor beim Betrieb von Biogasanlagen die Mikrobiologie darstellt (e.l.b.w. Umwelttechnik 3/2005).

Auf der anderen Seite berichtete Dr. Schiffner (SUKO) zur Vergärung von Papierreststoffe, dass hier auch die genaue Mikrobiologie des Prozesses nicht bekannt ist (STIFT und TLL; Erfuhrt, 2003).

Auch Dr. Hansjörg Nußbaum von der Lehr- und Versuchsanstalt Aulendorf (Baden-Württemberg, 2004) berichtete, dass Ohne Kenntnisse der Gärbiologie auch der Einsatz von Silierzusatzmitteln häufig erfolglos bleibt.

Das Institut für Land-, Umwelt- und Energietechnik der Universität für Bodenkultur in Wien (ILUE, 2003, Österreich) berichtete, dass das Hauptproblem des anaeroben Abbaus von Nachwachsenden Rohstoffen liegt in der Vergärung des "Ligno-Zellulose-Komplexes" in der Biomasse und in der optimalen Versorgung der Mikroorganismen mit Nährstoffen. Bislang liegen kaum Untersuchungen zum Nährstoffbedarf anaerober Mikroorganismen für die Methangärung von Energiepflanzen und Wirtschaftsdünger vor. Für eine bedarfsgerechte Ernährung der Mikroorganismen mit Nährstoffen müssen Grundlagen zur Entwicklung von Nährstoffbedarfsnormen erstellt werden (ILUE, 2003, Österreich).

## II. 4 Erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse

- 1. Arab H. (März, 2003): Input Materialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In FORUM 49, Mitteilungsblatt des Lehrstuhls für Wassergüte- und Abfallwirtschaft der TU München.
- Arab H. (2003): Optimization of the fluorescence in situ hybridization to enhance the detection of methanogens in an anaerobic waste treatment biogas plant. International Symposium, Structure and function of soil Microbiota. September 18-20, 2003, Marburg, Germany, S. 30.
- Arab, H., Wilderer P.A. (2004): Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose und Prozessüberwachung bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 29./30. September 2003, IHK Potsdam; Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 36., S. 71- 74.
- 4. Arab, H., Wilderer P.A. (2004): Detection and quantification of methanogenic bacteria in anaerobic fermenters using specific oligonucleotide probes. Proc. 10th World Congress on Anaerobic Digestion. Aug. 29 Sep. 2, 2004, Montreal, Canada, ed. S. Guiot, S. 1868-1870.
- 5. Arab, H. (September, 2004): Methanbakterien-Aktivität bei der Vergärung von landwirtschaftlichen Produkten. In Forum 55, Mitteilungsblatt des Lehrstuhls für Wassergüte- und Abfallwirtschaft der TU München.
- 6. Arab, H., Wilderer P.A. (2004): In Situ identification of bacterial and archaeal populations in a biogas Fermenter fed with cattle manure and TMR as substrate. BIOspektrum, Sonderausgabe 2004, S. 76-77.
- Gronauer, A., Aschmann, V., Effenberger, M., Kaiser, F., Kissel, R., Schlattmann, M., Speckmeier, M., Arab, H., Lebuhn, M., Wichern, M., Schwarz, W. H. (2004): Perspektiven und Entwicklungstrends f
  ür landwirtschaftliche Biogasanlagen in Bayern. Biogas in Bayern. Jahrestagung 9. Dezember 2004, Schriftenreihe 13, 2004. S. 81- 97, ISSN 1611-4159.
- Arab, H., Schlattmann, M., Speckmaier, M., Gronauer, A., Wilderer P. A. (2005): Influence of fermenter type and size on the microbial population structure and dynamics during start up of anaerobic digesters fed with cattle manure and agricultural wastes. 4<sup>th</sup> international Symposium "Anaerobic Digestion of Solid Waste"; Copenhagen; August 31-September 2; 2005.