



David G. J. Reinsberger, *Bakk. rer. nat.*

***„Identifizierung von hydrolytischen und methanogenen
Mikroorganismen als Monitoringsystem in der Biogasproduktion“***

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Ingenieurs

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Studienrichtung: Biotechnologie

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Georg M. Gübitz
Institut für Umweltbiotechnologie
Technische Universität Graz

2011

Deutsche Fassung:

Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008

Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Kurzfassung

Biogas, Fermentation, Grassilage, Migulator, Zeolith

Alternativenergien aus nachwachsenden Rohstoffen bieten eine sehr gute Möglichkeit den kommunalen Energieverbrauch ökonomisch und ökologisch zu unterstützen. Die anaerobe Fermentation von Grassilage ist zwar ein vielversprechender, jedoch ein noch nicht ausreichend erforschter Weg der Biogasgewinnung. Grassilage zu fermentieren wäre ökologisch sinnvoll, da in vielen Regionen der Milchviehproduktion beachtliche Mengen an überschüssigem Grünlandaufwuchs anfallen. Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Prozessparametern auf die Mikrobiologie bei der anaeroben Fermentation von Grassilage und dem Einsatz von dotiertem Zeolith (Migulator) als bioregulatorischem Fermentationsadditiv. Eine stabile und ökologische Biogasgewinnung ist von großem biotechnologischen Interesse.

Abstract

Biogas, fermentation, grass silage, migulator, zeolite

Alternative energy from renewable resources offers a very good economical and ecological way to support the local energy consumption. Anaerobic Fermentation of grass silage makes likewise environmental sense, since in many regions of the dairy production considerable amounts of surplus grassland accumulates. However, anaerobic fermentation of this substrate is poorly understood. This work deals with the influence of process parameters on changes on microbial populations during anaerobic fermentation of grass silage and application of zeolite (migulator) as a fermentation additive. A stable and ecological biogas generation is of huge biotechnological interest.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	3
Abstract	3
1. Einleitung	7
1.1 Merkmale der kontinuierlichen Fermentation nach Chmiel (2006)	11
1.2 Arbeitsschritte innerhalb des Projektes „Biogas ^{Plus} “	12
1.3 Biologie der Biogasformation.....	14
1.3.1 Phasen der Biogasbildung	16
1.3.2 Mikroorganismen der Biogasformation	20
1.4 Dotierter Zeolith als bioregulatorisches Additiv in der Biogasproduktion.....	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung der LfL-Bayern	24
2.2 Bioreaktoren - Aufbau und Eigenschaften.....	26
2.2.1 Probenvorbereitung.....	27
2.2.2 Vollständige Probenbezeichnungen.....	29
2.2.3 Proben für die „Confocal-Laser-Scanning-Microscopy“ (CLSM).....	30
2.2.4 Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	31
2.3 Molekulare Charakterisierungen hydrolytischer Mikroorganismen.....	32
2.3.1 Die Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA)	32
2.3.2 Polymerasenkettenreaktion	39
2.3.3 Einzelstrangverdau mittels λ -Exonuklease und Einzelstrangfaltung.....	46
2.3.4 Die Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP).....	48
2.4 Cluster-Analyse und Canonische Korrespondenzanalyse.....	54
2.4.1 Cluster-Analyse	54
2.4.2 Canonische Korrespondenzanalyse	54
2.5 CLSM-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy)	55
2.5.1 Methode „Confocal Laser Scanning Microscopy“	56
2.5.2 Probenvorbereitung-Zellfixierung	56
2.5.3 Protokoll: „Fluorescent <i>in situ</i> hybridization“ (FISH) auf Objektträger.....	57
2.5.4 FISH- Sonden.....	59
2.5.5 CLSM-Aufnahmen	59

2.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	60
2.6.1 Methode der Rasterelektronenmikroskopie.....	60
2.6.2 Zellfixierung und Dehydrierung der Proben	61
2.6.3 Aufnahmen.....	62
3. Ergebnisse	63
3.1 Charakterisierung mikrobieller Populationen des anaeroben Grassilageabbaus.....	63
3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Ganzschlammproben	63
3.1.2 Konzentrationsbestimmung der 16S rRNA Genfragment-Amplifikate.....	64
3.1.3 Analyse der bakteriellen und archaealen Gemeinschaft (SSCP-Analyse)	65
3.2 Gruppenanalyse der bakteriellen Gemeinschaft.....	68
3.2.1 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor I1	68
3.2.2 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor I2	70
3.2.3 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor I3	71
3.3 Canonische Korrespondenzanalyse.....	72
3.3.1 Besonderheiten des Fermentationslaufes	76
3.3.2 Bioreaktor I1 (Kontrolle) - <i>Anlaufphase</i>	79
3.3.3 Bioreaktor I1 (Kontrolle) - <i>Stabile Phase</i>	80
3.3.4 Bioreaktor I2 (Migulator-Additiv) - <i>Anlaufphase</i>	81
3.3.5 Bioreaktor I2 (Migulator-Additiv) - <i>Stabile Phase</i>	82
3.3.6 Bioreaktor I3 (Migulator-Additiv) – <i>Anlaufphase</i>	83
3.3.7 Bioreaktor I3 (Migulator-Additiv) - <i>Stabile Phase</i>	84
3.3.8 Signifikanzprüfung der Canonischen Korrespondenzanalyse	85
3.4 Mikroskopische Identifizierung prozessbestimmender Mikroorganismen.....	86
3.4.1 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	86
3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	89
4. Diskussion	91
4.1 DNA- Extraktion.....	91
4.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse	92
4.3 „Canonische Korrespondenzanalyse“	94
4.3.1 Aufgetretene Mikroorganismen.....	95
4.4 Mikroskopie.....	102
4.4.1 CLSM-Mikroskopie.....	102

5. Zusammenfassung.....	106
6. Literaturverzeichnis	108
7. Anhang	115
7.1 Abbildungsverzeichnis	115
7.2 Tabellenverzeichnis.....	117
7.3 Chemikalienliste.....	118
Danksagung	119

1. Einleitung

Die Europäische Kommission legte am 29. 4. 2009 die Richtlinien zur „Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen“ vor. Ein wichtiger Punkt innerhalb der Richtlinien ist das Gemeinschaftsziel der Europäischen Union (EU) 20 % des Gesamtenergieverbrauchs aus erneuerbaren Energien und 10 % des Benzin- und Dieselkraftstoffverbrauchs aus Biokraftstoffen zu erreichen. Die Gründe für diese Richtlinien sind die Erforderlichkeit der Kontrolle des Energiekonsums in Europa, die Nutzung erneuerbarer Energie, Energieeinsparungen und optimierte Energieeffizienz. Die Realisierung dieser Vorhaben soll die Treibhausgasemissionen verringern und zur Einhaltung des Kyoto-Protokolls führen (RICHTLINIE 2009/28/EG, 2009).

Die „Die ARGE Kompost & Biogas Österreich“ (ARGES) ist ein Dachverband aus derzeit fünf Länderorganisationen (Tirol, Steiermark, Oberösterreich, Niederösterreich und Kärnten) und stellte in ihrem Biogasfolder (2009) die „Grüne Bioraffinerie“ als visionäre Nutzungsmöglichkeit natürlicher Ausgangsstoffe vor. Idealerweise sollen in der „Grünen Bioraffinerie“ Ausgangsstoffe so umgesetzt werden, dass kein zu deponierender Abfall entsteht. Man will mit erneuerbaren Energien eine dem Gesamtkonsum angeglichene Produktion schaffen, was jedoch eine große Herausforderung darstellt. Biogas kann dann als Ausgleichsenergie verwendet werden, da sie wie Speicherwasserkraft akkumuliert werden kann. Von 100 % des Methans aus Biogasanlagen werden 81 % in das Erdgasnetz als Transporter eingespeist (Biogasfolder ARGES, 2009).

Laut der Abwicklungsstelle für Ökostrom (OeMAG) wurden im Jahr 2010 knapp 540 Millionen kWh Ökostrom aus Biogasanlagen ins österreichische Netz eingespeist (http://www.oem-ag.at/green_energy/statistics/Uebersicht_Einspeisetarife, 14. 4. 2011). Bis Ende des ersten Halbjahres 2010 gingen laut der „E-CONTROL-Austria“ (der Regulierungsbehörde für den Österreichischen Energiemarkt) 344 anerkannte Biogasanlagen in Betrieb (Ökostrombericht 2010, E-CONTROL-Austria, 2010).

Um die von der EU gesteckten Ziele zu erreichen, ist es unter anderem notwendig sowohl die Energieerzeugung aus Biogas zu forcieren als auch die Forschung zur Erzielung erhöhter Energieausbeuten zu fördern.

Vor diesem Hintergrund und dem stetig ansteigenden Trend zur Inbetriebnahme von Biogasanlagen (Ökostrombericht 2010- E-CONTROL, 2010) zielt das Projekt „Biogas^{Plus}“ auf die erwähnten Erfordernisse ab und stellt ein innovatives Forschungsprojekt dar, das anwendungsbezogen und international ist. Innerhalb des Projektes „Biogas^{Plus}“, einer Zusammenarbeit der „Technischen Universität Graz - Institut für Umweltbiotechnologie“, der obersteirischen „IPUS“ (Austria), der „LfL-Bayern“ (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft) und dem „Institut für Elektronenmikroskopie“ der TU Graz, wurde die Masterthese **„Identifizierung von hydrolytischen und methanogenen Mikroorganismen als Monitoringsystem in der Biogasproduktion“** verfasst.

Ziel des Projektes war es durch molekularbiologische Methoden und statistische Auswertung die mikrobiologische Zusammensetzung mit Grassilage kontinuierlich betriebener Bioreaktoren zur Erzeugung von Biogas (CH₄ und CO₂) bei verschiedenen Prozessparametern wie Ammoniak und Fettsäuren aufzuschlüsseln. Die LfL-Bayern betrieb zwei Bioreaktoren (Bioreaktor I2 und Bioreaktor I3) mit dotiertem Zeolith (in weiterer Folge auch Migulator bzw. Migulatoren genannt, IPUS- Austria), nämlich mit Klinoptilolith - einem Alumosilikatgestein - im Fermentationsschlamm. Ein dritter Bioreaktor, Bioreaktor I1, diente als Kontrollreaktor ohne Migulatorzugabe.

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Populationen im Fermentationsschlamm wurde auf molekularbiologische Methoden wie die PCR-basierende SSCP-Analyse und die DNA-Bandensequenzierung zurückgegriffen. Die PCR-basierende SSCP-Analyse wurde ursprünglich entwickelt, um DNA-Mutationen bzw. Sequenzunterschiede der DNA von verschiedenen Organismen einfach zu detektieren. Ein Vorteil gegenüber anderen PCR-basierenden Techniken ist die Einfachheit der Durchführung dieser Methode. Fehler bei einer zuvor durchgeführten Polymerasenkettenreaktion (PCR) müssen nicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die DNA-Banden der SSCP-Gele mit Silbernitrat, einer nicht radioaktiven Färbemethode, gefärbt und dadurch sichtbar gemacht

werden können (Hayashi, 1991). Zur Analyse der Populationsdynamik in Bezug auf die im Fermentationsprozess auftretenden Prozessparameter diente die „Canonische Korrespondenzanalyse“. Diese Analysemethode ermöglicht einen Einblick in eine biologische (mikrobiologische) Gesellschaft und zeigt den Einfluss von Umweltparametern (Prozessparametern) auf diese auf (ter Braak und Smilauer, 2002). Zusätzlich wurde eine Gruppierung (Clustering) der SSCP-Banden durchgeführt. Über eine *Pearson*-Korrelation bildet ein Programm (GelCompar II, Applied Maths) aufgrund spezifischer Bandenmuster je Versuchstag eine Gruppierung nach Ähnlichkeit der Bandenmuster zueinander. Für die visuelle Detektion von Mikroorganismen im Fermentationsschlamm und ihre Interaktion mit ihrer Umgebung waren die Methoden der Wahl die „Confocal Laser Scanning Microscopy“ (CLSM) in Kombination mit „Fluoreszenz In-Situ-Hybridisierung“ (FISH) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM). Die CLSM-Methode bietet die Möglichkeit zur Erstellung von hochauflösenden Bildern hoher Sensitivität und Aufnahmemodi wie die „konfokale Bildaufnahme“ oder den „Differentiellen Phasenkontrast (Halbhuber, 2002). Mit der FISH können mikrobielle Populationen in ihrem Mikrokosmos (in diesem Fall Migulatorpartikel/Grassilage) studiert werden. Die Vorteile der „Fluoreszenz In-Situ-Hybridisierung“ und anschließender Detektion mit einem CLSM-Mikroskop sind unter anderem die direkte Visualisierung von nicht-kultivierten Mikroorganismen und/oder die Möglichkeit einer generellen Quantifizierung der Mikroorganismen (Sanz und Köchling, 2007). Mit einer hohen Auflösung bietet die Rasterelektronenmikroskopie durch verschiedene Elektronendetektoren das Potenzial Proben auf topographischen und kompositionellen Kontrast zu untersuchen, wodurch ein Auftreten von Mikroorganismen sichtbar gemacht werden kann. Aufgrund dieser Möglichkeit der Observation von Proben ist die Rasterelektronenmikroskopie die Methode der Wahl, um eine bakterielle Kolonisierung von dotierten Zeolithpartikeln morphologisch zu untersuchen (Weiß et al., 2011).

Es wurde angenommen, dass Prozessparameter wie die freien Fettsäuren, Ammoniak-Stickstoff (NH_3) und auch die Raumbelastung den Prozess der Biogasbildung und im Besonderen die mikrobielle Aktivität bzw. Diversität des Prozesses beeinflussen und so die Effizienz der Methanproduktion einschränken bzw. fördern. Diesen Annahmen folgte auch die Frage, ob die Biogasbildung den Prozessbedingungen mit Hilfe von Migulatoren als

regulierendem Additiv anpassbar ist. Jeder der zuvor genannten Prozessparameter beeinflusst auf eine eigene Weise den Prozess. So können freie Fettsäuren (z.B. Essigsäure und Propionsäure) den Prozess ab einer Konzentration von 2 g l^{-1} inhibieren, wobei die Hemmwirkung mit sinkendem pH-Wert steigt (Weiland, 2003). Die freien Fettsäuren sind wichtige Zwischenkomponenten des Methanbildungsprozesses, da sie in hohen Konzentrationen mikrobiologischen Stress auslösen können, dadurch den pH-Wert senken und letztendlich die Fermentation inhibieren. Demzufolge ist die Konzentration der freien Fettsäuren unter dem inhibierenden Level zu halten, um eine gute Fermenterperformance bzw. Methanbildung zu erreichen (Wang et al., 1999). Eine wichtige Kenngröße eines Fermentationsprozesses ist der „chemical oxygen demand“ (COD) und der „biological oxygen demand“ (BOD). Dies sind zwei Parameter, die angeben, wieviel des gesamten organischen Materials im Prozess auf chemische bzw. biologische Weise zu anorganischen Produkten umgesetzt werden kann (Pisarevsky et al., 2005). Stickstoff in Form von Ammonium (NH_4) bzw. Ammoniak (NH_3) kann in hohen Konzentrationen ebenso wie die freien Fettsäuren inhibierend wirken. Trotzdem benötigt man Stickstoff für das mikrobielle Wachstum in geringen Konzentrationen von 40 bis 70 mg l^{-1} . Hohe Ammoniumkonzentrationen erhält man z.B. bei der Fermentation von Viehabfall oder auch beim anaeroben Abbau von Grassilage (Strik et al., 2006; Koch et al., 2009). Eine Inhibition des mikrobiellen Wachstums und der Stoffwechselleistung durch Ammonium kann bei einer Konzentration von über $3,5 \text{ g l}^{-1}$ auftreten, wobei Ammonium mit Ammoniak im Dissoziationsgleichgewicht steht. Eine Studie zeigte aber auch, dass eine Adaption an hohe Ammoniumkonzentrationen stattfinden kann und so Konzentrationen von 3 bis 4 g l^{-1} möglich sind (Weiland, 2003; Angelidaki und Ahring, 1993a). Ammoniak ist der eigentliche Inhibitor bei Fermentationen mit hoher Ammoniumbelastung, da er in Zellen eindringen kann und die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) behindert (Nielsen und Angelidaki, 2008; Bauer et al., 2009). Die Ammoniakkonzentration ist eine Funktion der Gesamtstickstoffkonzentration ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), des pH-Wertes, der Temperatur und des Druckes. Steigt die Temperatur oder der pH-Wert, kommt es zur vermehrten Bildung von Ammoniak (Nielsen und Angelidaki, 2008). In Bezug auf eine Inhibition des Gesamtprozesses sind außer den zuvor genannten Prozessparametern noch die Konzentration des entstehenden Schwefelwasserstoffs (H_2S) und die Konzentration

von gelösten Schwermetallen von Bedeutung. Schwefelwasserstoff, dessen Hemmwirkung mit sinkendem pH-Wert steigt, wird über 50 mg l^{-1} als Inhibitor gesehen. Als wichtige Schwermetalle gelten z.B. Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Chrom (Cr), wobei sich deren Hemmwirkung zwischen Konzentrationen von $>50 \text{ mg l}^{-1}$ bis 150 mg l^{-1} zeigt (Weiland, 2003). Die mehrmonatige Anlaufphase des Fermentationsprozesses mit ihren Schwankungen der Prozessparameter war von besonderem Interesse. Zusätzlich zur molekularen Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft und der Prozessparameter kamen mikroskopische Methoden zum Einsatz, die eine Kolonisierung von Migulator- und Grassilagepartikeln aufzeigen sollten.

Grassilage als Substrat der Biogasherstellung bietet eine gute Energie-Balance und ökologische Vorteile, wenn auch oft hohe Ammoniakkonzentrationen während der Fermentation beobachtet werden. Mit dem Migulator und seiner hohen Ammonium-Bindekapazität als Additiv in der Fermentation könnte man dies verhindern (Tada et al., 2005).

Diese Arbeit soll mit den zuvor erwähnten Methoden zeigen, ob die Prozessparameter während der thermophilen Fermentation von Grassilage Einfluss auf die Mikroorganismen haben bzw. inwieweit sie sich gegenseitig beeinflussen. Weiters soll die Wirkung von Migulatoren auf die Fermentation (insbesondere während der Hydrolysephase) untersucht werden.

1.1 Merkmale der kontinuierlichen Fermentation nach Chmiel (2006)

Die Bioreaktoren I1, I2 und I3 wurden kontinuierlich betrieben. Welche Merkmale dieses kontinuierliche Verfahren aufzeigt, geben folgende Punkte an:

Massenbilanz: $d(VC_i)/dt = F_{\text{ein}}C_{i \text{ ein}} - F_{\text{aus}}C_{i \text{ aus}} \pm Vr_i$

Fluss ein ist gleich Fluss aus, d.h. es gilt: $F_{\text{ein}} = F_{\text{aus}}$

Mittlere Verweilzeit $\tau = 1/D$ [h]

Die Verdünnungsrate $D = F/V$ [h^{-1}] ist relevant, da bei der kritischen Verdünnungsrate D_{crit} die Biomasse ausgewaschen wird.

Für die Biomassebildung gilt (wenn $x_{i \text{ ein}} = 0$): $\mu \mathbf{x} - D \mathbf{x} = \mathbf{0} \quad \mu = D$

Die Verdünnungsrate über den Zufluss mit Substrat ist so einzustellen, dass eine optimale Biogasbildung ohne die kritische Verdünnungsrate zu erreichen, gewährleistet ist (Chmiel, 2006). Die kritische Verdünnungsrate D_{crit} und die damit verbundene Auswaschung der Mikroorganismen ($x = 0$) aus dem System ist vor allem für die langsam wachsenden Archaeen ein Problem, da Archaeen Generationszeiten von 5 bis 15 Tagen haben (Chmiel, 2006; Weiland, 2003).

1.2 Arbeitsschritte innerhalb des Projektes „Biogas^{Plus}“

Folgendes Schema (*Abbildung 1*) zeigt die Vorgehensweise bzw. den Ablauf der Teilschritte, welche die Basis der vorliegenden Arbeit bilden:

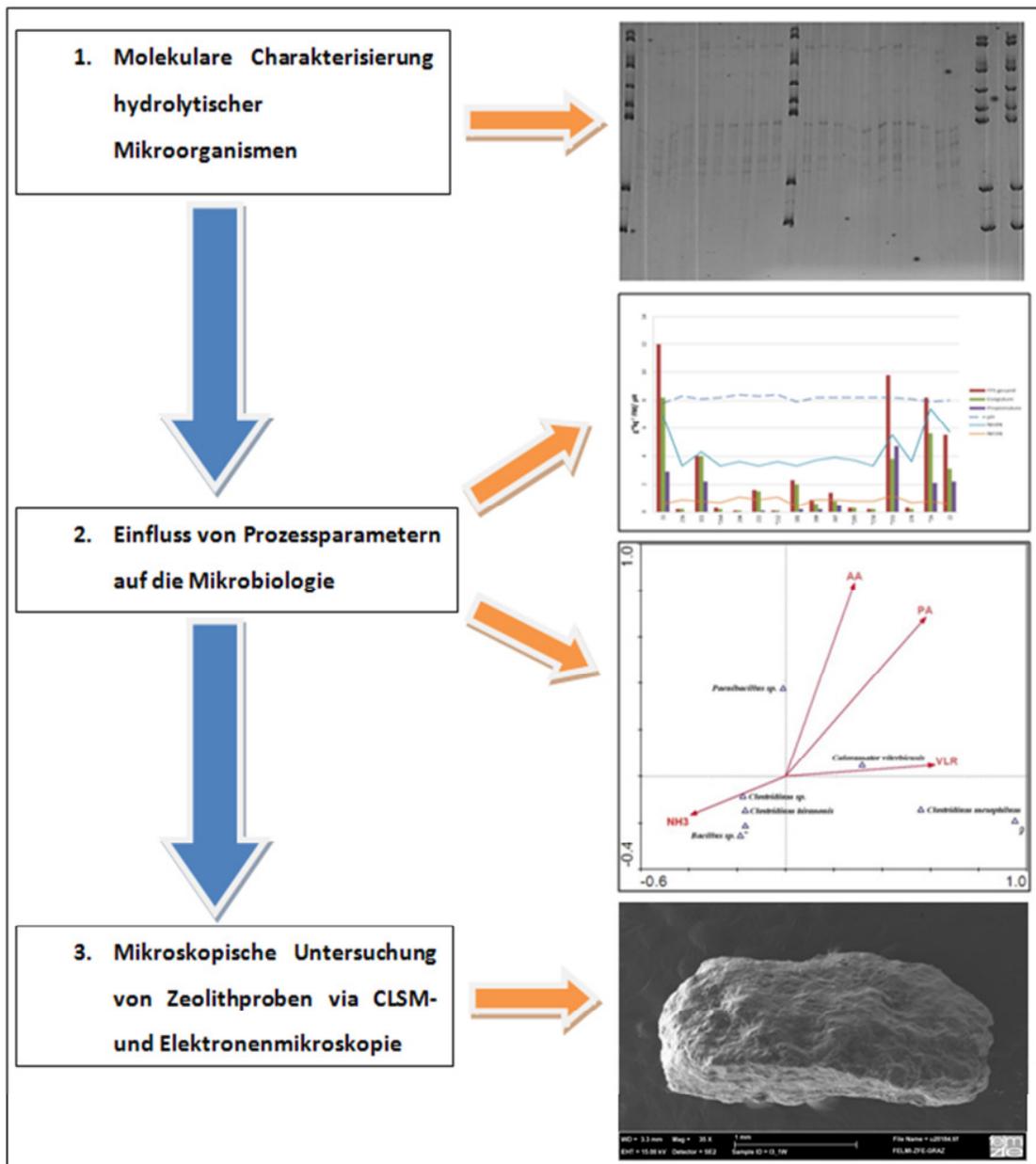


Abb.1: Methodenübersicht zur Erstellung der Masterarbeit

1.3 Biologie der Biogasformation

Die Biologie der Biogasformation und die damit verbundenen chemischen Vorgänge bilden den Hintergrund für diverse Arbeiten auf dem Gebiet der Biogascforschung, so auch für diese Masterthese. Dieser Teil soll erläutern, welche Vorgänge für den Prozess des anaeroben Abbaus von Biomasse wichtig sind. Der anaerobe Abbau von natürlichen Polymeren erfolgt in vier Phasen (Weiland, 2003). Diese sind:

Phase 1: Hydrolyse

Phase 2: Acidogenese

Phase 3: Acetogenese

Phase 4: Methanogenese

Wie *Abbildung 2* zeigt, werden in der hydrolytischen Phase (der Hydrolyse) Makromoleküle wie Polysaccharide zu Monosacchariden, Proteine zu Polypeptiden und Aminosäuren und Fette zu Fettsäuren abgebaut. In der zweiten Stufe, der acidogenen Phase (der Acidogenese), werden die hydrolysierten Produkte zu Carbonäuren, Alkoholen, Wasserstoff und Kohlendioxid metabolisiert und es kommt mittels der 3. Stufe, der acetogenen Phase (der Acetogenese), zur Bildung von Acetat. In der letzten Phase, genannt Methanogenese, werden Acetat bzw. zuvor entstandenes H^+ und CO_2 als Substrate zu Biogas (CH_4/CO_2) umgewandelt. Verglichen mit dem oxidativen Endabbau organischer Verbindungen, der Mineralisierung, fungieren beim anaeroben Abbau zu Biogas divergente Bakterienspezies miteinander. Jede dieser Spezies ist für einen speziellen Bereich des Prozesses notwendig (Janke et. al., 2008).

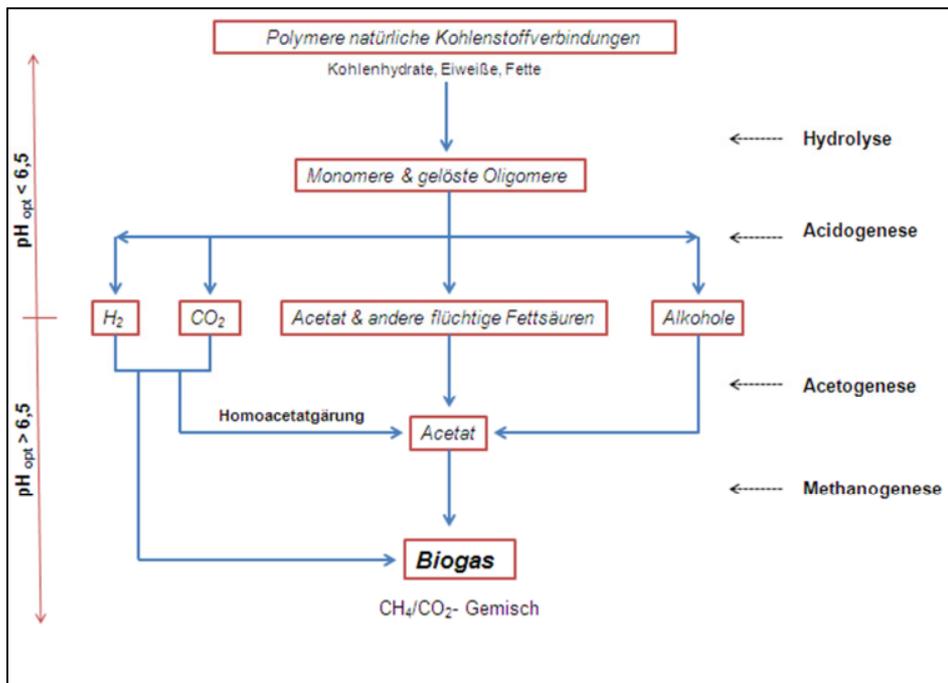


Abb.2: Die vier Phasen des anaeroben Biomasseabbaus verändert nach Janke et al. (2008)

Aus *Abbildung 3* ist ersichtlich, dass beim vollständigen Abbau von Kohlenstoffverbindungen unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen ein großer Unterschied besteht. So können unter anaeroben Bedingungen nur knapp 10 % des zugeführten Kohlenstoffs für den Biomasseaufbau der Mikroorganismen verwendet werden (Weiland, 2003). Das ist im Vergleich zum aeroben Abbau, dem oxidativen Endabbau, bei dem 50 % des Kohlenstoffs zum Aufbau von Biomasse genutzt werden, sehr gering. (Janke et al., 2008; Weiland 2003).

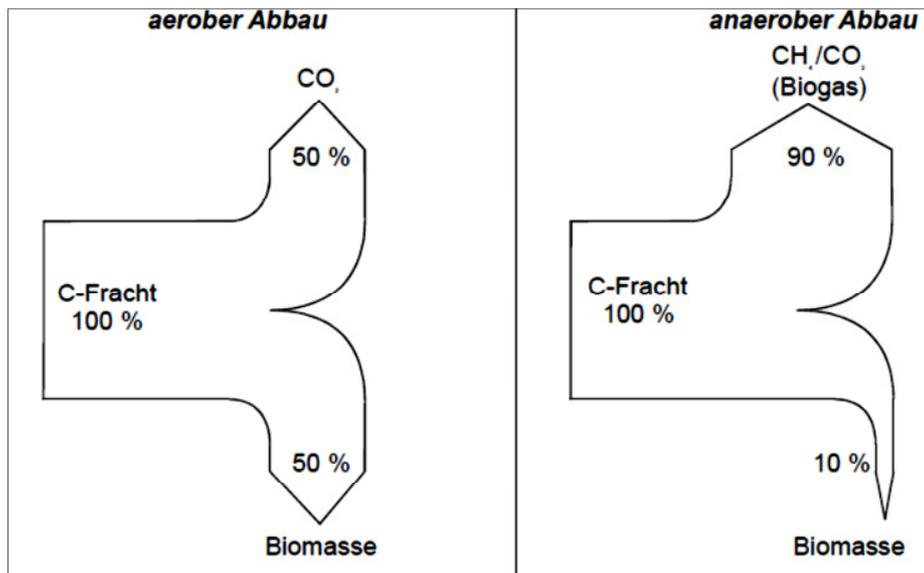


Abb.3: Kohlenstoffbilanz bei vollständigem Abbau der Kohlenstofffracht (Weiland, 2003)

1.3.1 Phasen der Biogasbildung

Diese Kapitel geht auf die einzelnen Phasen des anaeroben Abbaus von Biomasse zur Gewinnung von Biogas (CH₄/ CO₂) ein.

1.3.1.1 Die Hydrolyse

Chemisch gesehen ist die Hydrolyse die Spaltung von Molekülen, Polysacchariden, Fetten und Proteinen durch Reaktion mit H₂O, wobei kürzere Oligomere und Monomere als Spaltprodukte entstehen (Bauer et al., 2009). So werden Kohlenhydrate in Monosacharide, Proteine in Aminosäuren und kurzkettige Peptide und Fette in langkettige Fettsäuren

umgesetzt (Aschmann et al., 2007). Die Hydrolysephase, in der H_2 , CO_2 und der Großteil der Säuren und Alkohole gebildet werden, ist verfahrenstechnisch nicht mit der chemischen Hydrolyse gleichzusetzen. Betrachtet man die Produkte der Hydrolysephase, so zeigt sich, dass diese Phase auch die Acidogenese umfasst bzw. von dieser nicht klar zu trennen ist (Bauer et al., 2009). Im Gesamtprozess der Biogasbildung können zum einen die Hydrolyse und zum anderen die Methanogenese je nach Abbaubarkeit der Substrate den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Müssen schwer hydrolysierbare Ausgangssubstrate durch die Mikroorganismen gespalten werden, wird die Hydrolyse zum verlangsamen Schritt im Prozess der Biogasformation (Kaltschmitt et al., 2009). So ist eine umfangreiche Kontrolle des Gesamtprozesses notwendig, um zu erkennen, wann und ob die Hydrolyse bzw. die Anlaufphase einen kritischen Punkt erreicht. Schlechte Performance eines Bioreaktors führt zu einem unzureichenden Abbau von Substrat bzw. Kohlenhydraten etc. (Leclerc et al., 2001). Bei der Hydrolyse von proteinreichen Substraten wie Hühnermist, Kleegrassilage, Industrieausschuss, Viehdung und auch Grassilage entstehen Aminosäuren, Ammonium und Ammoniak. Der zelltoxische Ammoniak kann zu einer Entkoppelung der ATP-Synthese (vgl. Kapitel 1) führen (Ahring et al., 1992; Bauer et al., 2009). Aufgrund des hohen Stickstoffgehalts wurde Grassilage (= Nachwachsender Rohstoff, NawaRo) bis jetzt hauptsächlich als Co-Substrat eingesetzt, wobei eine Monofermentation bei einem angepassten System möglich ist (Koch et al., 2009). Auch können organische Abfälle z.B. aus Bereichen der kommunalen Abfallwirtschaft oder Industrie für eine Fermentation zur Biogaserzeugung herangezogen werden. Bei diesen Substraten ist zu beachten, dass sie mit Schadstoffen wie Dioxin und Schwermetallen, aber auch pathogenen Mikroorganismen, belastet sein können. Diese Belastungen können zum einen zu einer Hemmung des Biogasprozesses und damit zur Erniedrigung des Methanertrages führen und zum anderen besteht bei Düngung von Gärresten die Gefahr, dass pathogene Mikroorganismen in den Mensch-Tier-Kreislauf eingebracht werden (Aschmann et al., 2007).

Abbildung 4 zeigt die enzymatische Spaltung von Stärke durch bakterielle α -Amylase und 1,6-Glucosidase als ein Beispiel der Hydrolyse:

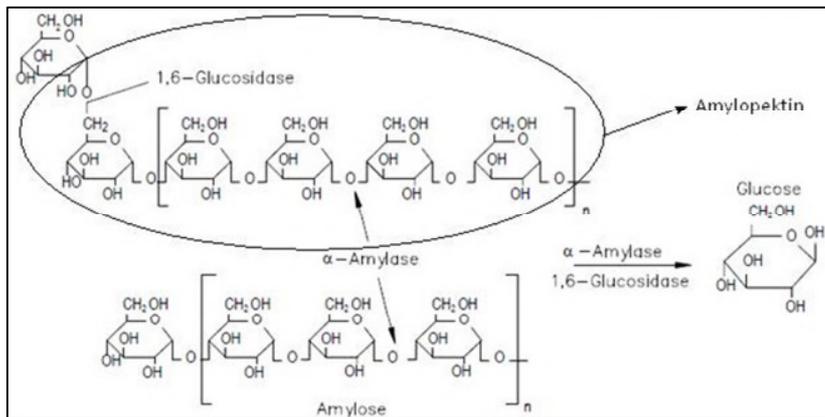


Abb. 4: Hydrolyse von Stärke durch bakterielle Amylase und Glucosidase (verändert nach Bauer et al., 2009)

1.3.1.2 Die Acidogenese

Aus den hydrolytisch gespaltenen Produkten entstehen in der Acidogenese, auch „Versäuerungsphase“ genannt, Wasserstoff, Kohlendioxid, Fettsäuren, Alkohole, Ammoniak, Ketone und Aldehyde (Aschmann et al., 2007). Durch Umsetzung von veresterten Ölen bzw. Schwefelverbindungen (z.B. Proteinen), kann es zur vermehrten Bildung toxischen Schwefelwasserstoffs (H_2S) und Ammoniaks (NH_3) kommen. Ein Ansteigen der freien Fettsäuren wie Propionsäure, Iso-Buttersäure, Isovaleriansäure oder auch Capronsäure deutet auf einen instabilen Prozessablauf hin (Bauer et. al., 2009).

1.3.1.3 Die Acetogenese

Produkte der Acidogenese wie die niedermolekularen Säuren und Alkohole werden während der Essigsäurebildung, der Acetogenese, in noch kleinere Moleküle gespalten und es entstehen Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat (Aschmann et al., 2007). Durch weitere Hydrolyse werden Fettsäuren mithilfe von syntrophen und acetogenen Bakterien weiter abgebaut (Bauer et al., 2009). In *Abbildung 5* werden freie Energien von Reaktionen ausgewählter Fettsäuren und Ethanol der Acetogenese gezeigt:

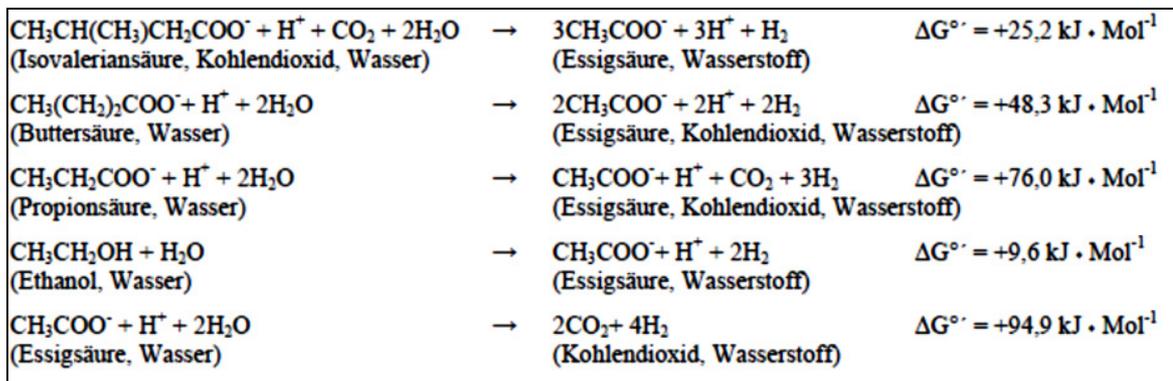


Abb. 5: Reaktionen der Acetogenese ausgewählter Fettsäuren und Ethanol und die jeweils zugehörigen freien Energien (Bauer et al., 2009)

1.3.1.4 Die Methanogenese

Die vierte Phase, die Methanogenese, als letzter Schritt der Biogasbildung, beinhaltet sowohl die Umsetzung von Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid durch methanogene Archaeen zu Methan. In landwirtschaftlich genutzten Biogasanlagen geschieht der Vorgang bei höherer Raumbelastung hauptsächlich über den hydrogenotrophen (H_2 -verbrauchenden) Reaktionsweg

und bei geringer Raumbelastung über den acetoclastischen (Acetat-verbrauchenden) Weg (Bauer et al., 2009).

Da die Acetogenese ein endergoner Prozess ist, läuft sie nicht spontan ab. Die H₂-formierenden acetogenen Bakterien leben in räumlicher Gemeinschaft mit H₂-verbrauchenden Methanogenen, wobei die dadurch auftretende H₂-Übertragung (Interspecies-Hydrogen-Transfer) die momentane H₂-Konzentration auf einen niedrigen stationären Level bringt (Janke et al., 2009). Der energieliefernde Prozess der Methanogenese ermöglicht die energieverbrauchende Reaktion der Acetogenese. Weiters kann die freie Energie, wenn sie -20 kJ übersteigt, von beiden Partnern zur Bildung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) genutzt werden. Wenn die Prozesskette durchgehend effizient funktioniert, bleibt ein ausgefallter Gärrest zurück, welcher bei hohen Anteilen von Spurenelementen und Stickstoff als landwirtschaftlicher Dünger verwendet werden kann. *Abbildung 6* zeigt die zwei wichtigsten Reaktionswege der Methanogenese (Bauer et al., 2009).

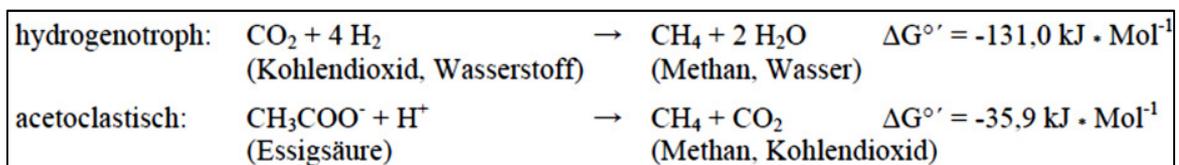


Abb. 6: Die zwei Reaktionswege der Methanogenese (Bauer et al., 2009).

1.3.2 Mikroorganismen der Biogasformation

Die nicht klar zu trennenden Vorgänge der Hydrolyse und der Acidogenese werden überwiegend von Bakterien und nur zu einem kleinen Anteil von Archaeen durchgeführt. Als Vertreter hydrolytischer/acidogener Bakterien sind hier jene der grampositiven *Firmicutes* zu nennen, wie Clostridien und Bacillen, wobei erstere als cellulolytische Bakterien für die Biogasproduktion aus „Nachwachsenden Rohstoffen“ (NawaRo) von großem Interesse sind. Clostridien (u.a. *Clostridium*) führen primäre Abbauschritte der Lignocellulose-Komplexe in

der herbalen Biomasse besonders effizient durch. Auch finden sich hydrolytische/acidogene Bakterien in den Gattungen *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Acetovibrio*, *Pseudomonas* u.a. welche mit Hilfe von extrazellulären Enzymen Fette, Proteine und Zuckerverbindungen zersetzen. Gegenüber syntrophen Bakterien und Archaeen wachsen sie üblicherweise schneller (Bauer et al. 2009). So benötigen anaerobe säurebildende Bakterien Generationszeiten (d) von < 24 h bis 36 h und im Falle acetogener Bakterien 90 h. Archaeen brauchen mit Generationszeiten von 5 bis 15 Tagen wesentlich länger (Weiland, 2003). Die strikt anaeroben syntrophen Bakterien sind schwer kultivierbar, kaum erforscht und können nur in Gesellschaft mit anderen Mikroorganismen wachsen, auf deren Stoffwechselleistung sie angewiesen sind. Ihr langsames Wachstum ist auf ihre thermodynamisch eingeschränkte Energiegewinnung zurückzuführen. Die Syntrophen oxidieren zur Energiegewinnung Verbindungen mit mehr als 2 C-Atomen. Dabei wird schnell eine hohe Konzentration an H₂ ausgebildet, welcher in Folge von hydrogenotrophen methanogenen Archaeen unter Energiegewinnung entzogen wird. So tritt keine Endprodukt hemmung durch H₂ auf. Die Syntrophen und Methanogenen wachsen demnach, wie zuvor schon erwähnt, sehr eng assoziiert (Inter-Species-Elektronentransfer). Zu den zur Ausbildung von resistenten Überdauerungsformen befähigten syntrophen Bakterien zählen z.B. Vertreter der Gattungen *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Propionibacter* oder auch *Thermoanaerobium* u.a.. Archaeen zählen zwar zu den Prokaryoten (Mikroorganismen ohne echten Zellkern), sind aber dennoch keine Bakterien. Nur gewisse archaeale Spezies des Phylums *Euryarchaeota* sind in der Lage Methan zu bilden (Bauer et al., 2009). Neben den anderen Archaeen haben auch die *Euryarchaeota* eine ubiquitäre Verbreitung, wie z.B. die Klassen *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci* und *Methanopyri*. Methanogene Archaeen bilden bei einem pH-Wert von 6,8 bis 7,5 das meiste Biogas, wobei sie auch selbst durch acetoclastische und hydrogenotrophe Methanogenese ein alkalisches Milieu schaffen. Beispiele für acetoclastische-methanogene Archaeen sind in den Gattungen *Methanosaeta* oder auch *Methanosarcina* zu finden, letztere können auch auf hydrogenotrophe Weise Methan bilden. Rein hydrogenotrophe methanogene Archaeen finden sich neben anderen in den Gattungen *Methanobacter*, *Methanobacterium* und *Methanococcus*. Wie auch *Methanosarcina* verfügen unter anderem *Methanomicrococcus* und *Methanohalophilus* über acetoclastische und hydrogenotrophe Methanbildungswege (Bauer et al., 2009).

1.4 Dotierter Zeolith als bioregulatorisches Additiv in der Biogasproduktion

Zeolith, als ein bioaktives Mineral, unterstützt den Prozess der Biogasproduktion nicht nur aufgrund seiner großen spezifischen Oberfläche, sondern fungiert auch als Regulator in biologischen Vorgängen. Sogenannte mineralische Bioregulatoren zeichnen sich eben durch die zuvor genannten Eigenschaften aus und werden auch als „Regulatoren“ (nach Somitsch/IPUS, 2010) bezeichnet. Grundsätzlich liegt eine Bioregulation dann vor, wenn die Eigenschaften bzw. das Verhalten eines biologischen Systems hauptsächlich über rückkoppelnde Wechselwirkungen von außen gesteuert werden. Primär geschieht dies durch Aufnahme und Abgabe von Stoffen des mikrobiellen Primär- und Sekundärstoffwechsels. Typische Beispiele der Regulation sind die Veränderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration durch Stabilisierung bei vorgegebenen Werten. Eine zweite Art der Wechselwirkung tritt durch den Kontakt des biologischen Systems mit der Oberfläche des Minerals auf: So fördert der Kontakt die vor allem bei einzelligen Systemen relevante Aggregatbildung und eine Erschaffung von mikroklimatischen Zonen an den Kontaktstellen, wobei die Bedingungen in dieser Zone gering von der Umgebung beeinflusst werden (nach Somitsch/IPUS, Austria, 2010).

Die Zeolith-Grundstruktur ist ein Tetraeder mit einem Aluminium- oder Siliziumkation. Neben diesen gibt es auch silikatfreie Zeolithe mit Beryllium, Phosphor und Zink als Zentralatom. Flankiert wird das Kation von vier Sauerstoffatomen und bildet einen Tetraeder $[(Al, Si)O_4]$. Mehrere Tetraeder können dann als Vierer-, Sechser- oder Achterringe auftreten. Erst die Verkettung der einzelnen Tetraeder bildet einen Zeolith. Aus dem Zusammenbau der drei Ringvarianten zeigen sich drei Typen von Zeolithen: Der Faserzeolith, der Würfelzeolith und der Blätterzeolith. Es gibt eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Zeolithen und ihr Vorkommen reicht von vulkanischen Seesedimenten, Lavaergüssen bis zu subthermalen Quellen (Scheinpflug, 2010). Natürlicher Zeolith ist unbehandelt und besitzt die Summenformel $Na, Ca, K, Na (Al_2 Si_{30} O_{72}) 24 H_2O$. Er kann zusätzlich modifiziert und als Additiv für ein Gärsubstrat zur Biogasgewinnung eingesetzt werden. Aufgrund ihrer

Kristallstruktur werden hierfür die Zeolithe Klinoptilolith, Chabasit, Philipsit oder ähnliche verwendet (Holper et al., 2005).

Zeolithe haben in ihrer Alumosilikat-Gerüststruktur eine mobile, austauschbare Fraktion von Kationen, Wasser und kleinen polaren Molekülen. So haben natürliche Zeolithe gegenüber synthetischen die Vorteile, dass sie bereits bioregulative Eigenschaften wie z.B. die Pufferung des pH-Wertes oder die Bildung von Biofilmen aufweisen. Eine weitere Befähigung, nämlich die Wirksamkeit gegenüber Basizität durch gleichzeitige Brönsted-Säure- und Basenfunktion, geht beim natürlichen Zeolith, dem Klinoptilolith, mit der Präsenz von Lewis-Säure- und Basenstellen einher. Diese Basenstellen sind maßgeblich für die elektrische Ladungsverteilung an der Oberfläche verantwortlich (nach Somitsch/IPUS, 2010). Klinoptilolith hat außerdem die Fähigkeit die CO_2/CH_4 – Rate auf einem Level zu halten. Dies ist bedingt durch die hohe CO_2 -Adsorptionsfähigkeit und Regenerierbarkeit des Materials als auch durch die Stabilität während wiederholter Adsorptions- und Desorptionsphasen. Höhere Methanausbeuten bei der Biogasproduktion mit Zeolith als Additiv zeichnen dieses Mineral aus (Weiß et al., 2011). Aus verfahrenstechnischer Sicht ist zu beachten, dass natürliche Zeolithe mit Quarzkristallen vorkommen, welche zu leichten Abrasionen im Fermentationssystem führen können. Durch aktivierte Zeolithe (z.B. natriumaktivierte) ist es möglich eine Ionenaustauschkapazität zu erhalten, was innerhalb der Fermentation den pH-Wert stabilisiert oder auch die Ammoniumtoxizität herabsetzt. Stickstoffaktivierte Zeolithe besitzen die Eigenschaft durch den Austausch von Erdalkalitionen das Nährstoffverhältnis im Gärsubstrat zu stabilisieren (Holper et al., 2005).

2. Material und Methoden

Das Kapitel „Material und Methoden“ geht auf die Versuchs- und Untersuchungsmethoden ein, welche notwendig waren, um die vorliegende Masterthese zu verfassen.

2.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung der LfL-Bayern

In Zusammenarbeit mit der LfL-Bayern, der IPUS GmbH (Austria) und der TU Graz wurden verschiedene Untersuchungsmethoden ausgewählt, die darauf abzielten, die Anpassung der Mikrobiologie auf thermophile Bedingungen und hohe Ammoniakkonzentration zu untersuchen. Es wurden auch andere Prozessparameter wie freie Fettsäuren und die Raumbelastung und deren Einfluss auf die Mikrobiologie betrachtet.

Die Versuchsdauer erstreckte sich über ein Jahr mit Start am 13.02.2009. Als Inokulum wurde mesophiler Graspärrest eingebracht. Die drei Bioreaktoren (Spezifikationen siehe *Tabelle 1*) wurden bei Raumbelastungen von 0,5-2 [kg oTS m⁻³ d⁻¹] mit Grassilage (Zusammensetzung siehe *Tabelle 2*) und unter thermophilen Bedingungen (44 °C) betrieben. *Tabelle 1* zeigt alle Eigenschaften der betriebenen Bioreaktoren.

Tab. 1: Spezifikationen der Bioreaktoren zu Vergärung von Grassilage mittels kontinuierlicher und einstufiger Prozessführung und die Eigenschaften des Reaktorensystems (nach Andrade und Lebuhn, 2009)

Eigenschaften	
System	kontinuierlich, einstufig
Inokulation	mesophiler Gras- Gärrest
Gesamtvolumen	36 l
Arbeitsvolumen	28 l
Anzahl der Bioreaktoren	3 (I1, I2, I3)
Raumbelastung (kg ots m⁻³ d⁻¹)	>1
Betriebstemperatur	regelbar/ mesophil-thermophil (41 °C–44 °C)
Gasvolumen	Milligascounter (Präzision 1,0 ml)
Gasqualität	CH ₄ , CO ₂ , O ₂ , H ₂ und H ₂ S

Um eine Anpassung der Mikroorganismen auf thermophile Bedingungen und hohe Ammoniakkonzentrationen zu erreichen wurde den Bioreaktoren feinkörnige Migulatorpartikel als bioregulatorisches Suspensions-Additiv zugegeben. Die Konzentration lag anfänglich bei Werten von 5,0 bis 5,4 g l⁻¹ und wurde später auf Werte von 7,0 bis 8,0 g l⁻¹ erhöht. Das Ausgangsmaterial für die hier dargestellten Versuche bildete der Bioreaktorschlamm aus den Reaktoren I1, I2 und I3. Aus jedem Reaktor wurden wöchentlich zwei unabhängige Proben genommen. Zusätzlich wurden bei den Bioreaktoren I2 und I3 eigens verpackte Migulatorpartikel über 12 Wochen eingehängt („In Sacco“-Verfahren), um die Besiedelung von Migulatorpartikeln durch Mikroorganismen untersuchen zu können. *Tabelle 2* verdeutlicht die Zusammensetzung der Grassilage. Besondere Beachtung im Vergleich mit den anderen Bestandteilen der Grassilage verdienen die erhöhte Konzentration an Essigsäure (2884 mg kg⁻¹) und die erhöhte Konzentration an Ammonium (mg N l⁻¹):

Tab. 2: Zusammensetzung der Grassilage; TS = Trockensubstanz, oTS = organische Trockensubstanz, NH₄ = Ammoniumstickstoff (nach Andrade und Lebuhn, 2009)

TS	oTS	Essigsäure	Propionsäure	iso-Buttersäure
[%]	[% TS]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]	[mg kg ⁻¹]
50,3	92,1	2884	54	0

Iso-Valeriansäure	Valeriansäure	Capronsäure	Oenanthsäure	NH ₄
[mg kg ⁻¹]	[mg N L ⁻¹]			
45	20	0	0	972

2.2. Bioreaktoren - Aufbau und Eigenschaften

Insgesamt wurde mit den drei Bioreaktoren I1, I2 und I3 kontinuierlich und im einstufigen Verfahren Grassilage fermentiert bzw. anaerob zu Biogas umgesetzt. Bioreaktor I1 diente als Negativkontrolle. Er wurde ohne Migulatoren als Suspensions-Additiv gelaufen.

Die Vorteile einer kontinuierlichen Prozessführung sind die Möglichkeit der stufenweisen Fütterung, die verbesserte Kontrolle der Fermentationsbedingungen durch Online-Messmethoden und das Laufen bei höheren Verdünnungsraten. Die höheren Verdünnungsraten resultieren aus der erhöhten Raumbelastung (Chmiel, 2006). Die notwendigen analytischen Untersuchungen wurden kontinuierlich von der LfL-Bayern durchgeführt und die Daten ans Institut für Umweltbiotechnologie, TU Graz, weitergeleitet.

Die Probennahme geschah zweimal in der Woche mit einem Volumen von je 100 ml pro Bioreaktor. Diese Proben wurden uns auf 4 °C gekühlt zur Untersuchung geschickt. Der in *Abbildung 7* dargestellte Bioreaktor (Schema der Bioreaktoren nach Andrade und Lebuhn, 2009) wird mit einem Gitterrührer betrieben. Dieser wird bei einer mittleren Viskosität von

$0,5 \text{ [Pa s]} \geq \eta \leq 5 \text{ [Pa s]}$ eingesetzt und verursacht ein tangenciales bzw. radiales Strömungsverhalten der Fermentationsbrühe (vgl. *Abbildung 8*) (Chmiel, 2006).

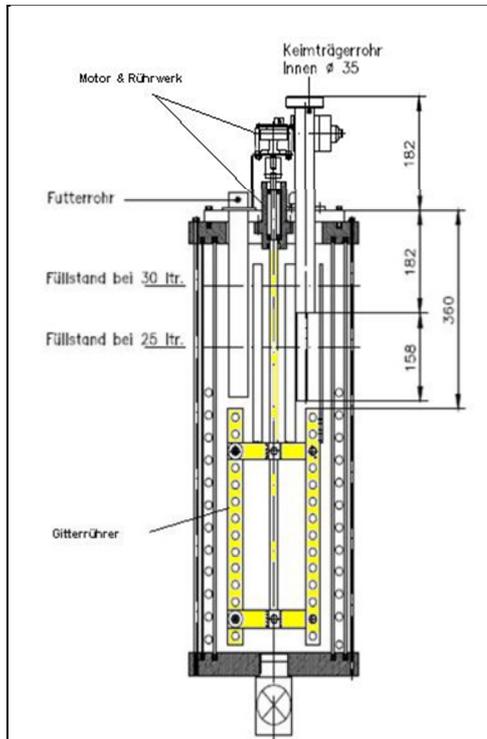


Abb. 8: Reaktoraufbau-Querschnitt (verändert nach Andrade und Lebuhn, 2009)

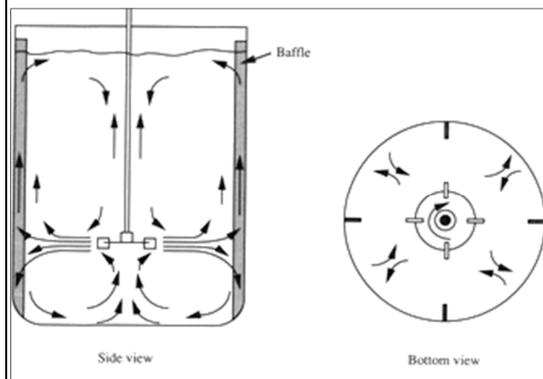


Abb. 7: Prinzip eines Radialrührers (nach Doran, 1995)

2.2.1 Probenvorbereitung

Jede Woche wurden ca. 100 ml Fermentationsbrühe pro Reaktor ans Institut für Umweltbiotechnologie (TU Graz) geschickt. Dort wurde die Probe für die folgenden Versuche fraktioniert. Das Schema der Fraktionierung ist in *Abbildung 9* zu erkennen: Von 100 ml Probe (Fermentationsbrühe) pro Reaktor wurden 2 g der Probe (je 1 g pro Eppendorf-Gefäß) abgewogen und bei 4 °C für Enzymtests eingekühlt. Weitere 2 g der Probe (je 1 g pro Eppendorf-Gefäß) wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen bei -20 °C

tiefgefroren. Die restliche Menge an Fermentationsbrühe wurde als „Backup“ ebenfalls bei -20°C tiefgefroren.

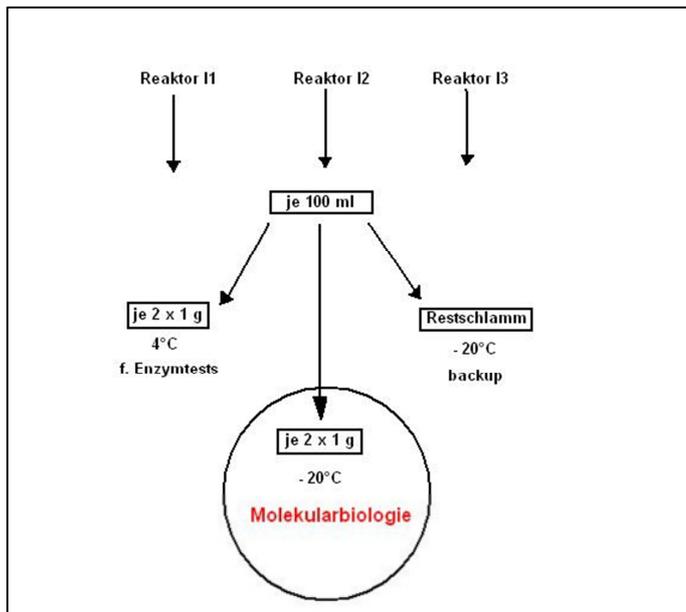


Abb. 9: Schema der Fraktionierung der Reaktorschlämme

Tab. 3: Gesamte fraktionierte Proben des Fermentationslaufs von 12.2.2009 bis 08.01.2010

Probennamen	Datum Probenahme	Probennamen	Datum Probenahme
1,2,3	14.07.2009	40,41,42	19.10.2009
4,5,6	21.07.2009	43,44,45	26.10.2009
7,8,9	28.07.2009	46,47,48	02.11.2009
10,11,12	13.08.2009	49,50,51	09.11.2009
13,14,15	21.08.2009	52,53,54	16.11.2009
16,17,18	24.08.2009	55,56,57	23.11.2009
19,20,21	31.08.2009	58,59,60	12.02.2009
22,23,24	07.09.2009	61,62,63	16.02.2009
25,26,27	14.09.2009	64,65,66	23.02.2009
28,29,30	21.09.2009	67,68,69	30.11.2009
31,32,33	28.09.2009	70,71,72	07.12.2009
34,35,36	08.10.2009	73,74,75	14.12.2009
37,38,39	12.10.2009	76,77,78	08.01.2010

Tabelle 3 zeigt alle von der LfL-Bayern gelieferten Proben, welche am Institut wie zuvor beschrieben fraktioniert wurden. Jede Probenahme umfasste 100 ml Fermentationsbrühe von

I1, I2 und I3. Nur am 16. 2. 2009 wurde keine Probe von I3 geliefert, deshalb wurde der Probenname 63 in der Tabelle durchgestrichen.

2.2.2 Vollständige Probenbezeichnungen

Tabelle 4 dient zur vollständigen Probenbezeichnung und zeigt die Probennamen, den dazugehörigen Bioreaktor, das Datum der Probenahme und den Versuchstag innerhalb der Fermentation. Ersichtlich ist, dass zwischen den Versuchstagen 33 und 174 keine Proben zur Untersuchung geschickt wurden und diese demnach nicht molekularbiologisch untersucht wurden. Es wurden nur Proben jener Phasen der Fermentation untersucht, die Schwankungen in der freien Fettsäurezusammensetzung, veränderte Ammoniumkonzentrationen oder auch Schwankungen in der Biogasbildung zeigten. Ebenso wurde die Mikrobiologie bei relativ konstanten Fermentationsparametern untersucht, um so etwaige Einflüsse der variablen Ammoniumkonzentration oder auch die Bildung freier Fettsäuren erkennen zu können.

Tab. 4: Probenamen aus dem jeweils zugehörigen Bioreaktor und den Versuchstagen

Probenname	Reaktor	Datum	Versuchstage (d)	Probenname	Reaktor	Datum	Versuchstage (d)
58	I1	12.02.2009	22	27	I3	14.09.2009	250
59	I2			31	I1	28.09.2009	
60	I3			32	I2		
61	I1	16.02.2009	26	33	I3	12.10.2009	264
62	I2			37	I1		
64	I1	23.02.2009	33	38	I2		
65	I2			39	I3		
66	I3			46	I1		
1	I1			47	I2		
2	I2	14.07.2009	174	48	I3	16.11.2009	300
3	I3			52	I1		
4	I1			53	I2		
5	I2	21.07.2009	181	54	I3	23.11.2009	307
6	I3			55	I1		
10	I1			56	I2		
11	I2	13.08.2009	204	57	I3	30.11.2009	314
12	I3			67	I1		
13	I1			68	I2		
14	I2	21.08.2009	212	69	I3	07.12.2009	321
15	I3			70	I1		
19	I1			71	I2		
20	I2	31.08.2009	222	72	I3	08.01.2010	353
21	I3			76	I1		
25	I1			77	I2		
26	I2	14.09.2009	236	78	I3		

2.2.3 Proben für die „Confocal-Laser-Scanning-Microscopy“ (CLSM)

Die Proben für die CLSM-Mikroskopie stammten aus Batch-Versuchen (nach Weiß et al., 2011). Die Batch-Versuche dienten der Untersuchung Grassilage-abbauender bzw. Migulator-assoziiertes Mikroorganismen im Labormaßstab und in Analogie zu den kontinuierlichen betriebenen Bioreaktoren I1, I2, I3. Die kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren stellen eine Art „Up-Scaling“ der Batchversuche dar. Alle Eigenschaften und der Betrieb der Batchansätze finden sich in folgenden Punkten:

- Batchbehälter: 1000 ml Schliffflaschen
- Ansatzvolumen: 500 ml Impfslamm (9,5 % Trockensubstanzgehalt [TS], 6,45 % Organische Trockensubstanzgehalt [OTS] und $OTS/TS = 97,39 \%$) Anaerobe Bedingungen wurden durch eine Stickstoffbegasung für 20 min l⁻¹ Volumen erreicht.
- Substrate: Zermahlene Grassilage (TS: 56,13) und Modellsubstrat (Zusammensetzung modifiziert nach Wiselogel et al., 1996)
- Versuchsbedingungen: Mesophil bei 35 °C und 45 °C für 6 Wochen
- Migulorkonzentration: 0,01 g ml⁻¹ Die Partikelgröße lag zwischen 1,0 mm und 2,5 mm.

2.2.4 Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Migulatorproben aus dem „In-Sacco Verfahren“ des Fermenters I3 wurden nach einer Woche und nach 12 Wochen Inkubation untersucht.

„In-Sacco Verfahren“: Im Zuge der Grasfermentation der LfL-Bayern war es auch das Ziel die Auswirkungen von einem Migulator (dotierter Zeolith) auf die Prozessstabilität zu untersuchen. So wurden Migulatorpartikel mit Durchmessern von 1,0 mm bis 2,5 mm im sogenannten „In Sacco- Verfahren“ in 6 Fraktionen zu je 0,4 g portioniert und über Stutzen der Bioreaktoren I2 und I3 in die Fermentationsbrühe eintauchend positioniert. *Abbildung 10* und *11* zeigen die Migulatorfraktionen des „In-Sacco“ Verfahrens im Größenvergleich und ihre Positionierung in den Befestigungsstutzen (Keimträgerrohre) der kontinuierlichen Bioreaktoren I2 und I3:



Abb. 10: „In Sacco“-Migulatorsäckchen (6 Fraktionen zu je 0,4 g Migulator [nach Andrade und Lebuhn, 2009])



Abb. 11: Befestigungsstutzen für „In Sacco“-Gewebe mit Migulator zur Positionierung in den Bioreaktoren I2 und I3 (nach Andrade und Lebuhn, 2009)

2.3 Molekulare Charakterisierungen hydrolytischer Mikroorganismen

Dieses Kapitel zeigt die für die molekulare Charakterisierung hydrolytischer Mikroorganismen notwendigen Methoden auf.

2.3.1 Die Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA)

Der erste Schritt der molekularbiologischen Untersuchungen war die Isolierung der bakteriellen und der archaealen gDNA. Das Ziel war, möglichst große Mengen an gDNA aus den in der Fermentationsbrühe auftretenden Mikroorganismen zu isolieren. In weiterer Folge konnten mit der isolierten gDNA Polymerasenkettenreaktionen (PCR), auf PCR-basierende

„Single-Strand-Confor- Polymorphism“-Analysen (SSCP), Cluster-Analysen und „Canonische Korrespondenzanalysen“ durchgeführt werden.

Als Initialschritt der gesamten Untersuchung wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden versucht hohe und reine Ausbeuten an gDNA zu isolieren.

Die Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Extraktion als Standardmethode ist eine im Gegensatz zur zweiten Extraktionsmethode, der Isolierung mittels „FastDNA[®] SPIN Kit for Soil“ (MP-Biomedicals, Germany), eine relativ günstige, wenn auch arbeitsintensivere Methode zur Isolierung von DNA.

Die *Abschnitte 2.3.1.1* und *2.3.1.2* geben protokollarisch die Vorgangsweise bei den beiden erwähnten Methoden wieder:

2.3.1.1 Protokoll Methode 1 - Phenolische DNA-Extraktion

Die „Phenolische DNA-Extraktion“ zur Isolierung von gDNA aus Fermentationsschlämmen wurde leicht verändert nach dem Protokoll von Martin Laurent et al. (2001) durchgeführt und folgte den unten angeführten Schritten:

- a) Vorbereiten von 2 ml großen Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss und Zugabe von Glaskugeln (200 mg Glaskugeln von 0,25 bis 0,5 µm, 200 mg Glaskugeln von 0,15 bis 0,21 µm und zwei Glaskugeln mit einem Durchmesser von 1,7 bis 2,0 mm);
- b) 1 g Probenschlamm für 15 min mit 16.000 g zentrifugieren;
- c) Pellet mit 1 ml Extraktionspuffer vermischen und in vorbereitete 2 ml große Reaktionsgefäße überführen;
- d) 2 x 30-sekündiger Zellaufschluss mit „FastPrep[®]-Ribolyser“ (Qbiogene, Inc. Europe) bei Level 5 - währenddessen Proben auf Eis lagern;
- e) mit 16.500 g und bei 4 °C für eine Minute zentrifugieren;

- f) Überstand in sterile Eppendorfgläser überführen;
- g) Zugabe von 100 µl 5 M Natriumacetat zur Proteinpräzipitation auf Eis für 15 min (optional wäre eine Wiederholung);
- h) mit 16.500 g und bei 4 °C für 5 min zentrifugieren;
- i) Überstand in steriles Eppendorfglas pipettieren;
- j) ein Volumen (ca. 500 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (vorgemischt im Verhältnis 25 : 24 : 1) zugeben und für eine Minute schütteln;
- k) mit 16.500 g und bei 4 °C für 10 min zentrifugieren;
- l) wässrige obere Phase in steriles Eppendorfglas überführen;
- m) mit 1 Volumen Chloroform vermischen, eine Minute schütteln;
- n) mit 16.500 g und bei 4 °C für 10 min zentrifugieren;
- o) wässrige obere Phase in steriles Eppendorfglas überführen;
- p) 1 Volumen Isopropanol zugeben, um Chloroformspuren zu entfernen und auf Eis 20 bis 60 min oder auch über Nacht präzipitieren,
- q) mit 16.500 g bei 4 °C für 15 min zentrifugieren;
- r) Überstand verwerfen und Pellet mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol waschen;
- s) erneut 15 min mit 16.500 g und bei 4 °C zentrifugieren;
- t) Überstand verwerfen und Pellet in Cleanbench trocknen;
- u) Pellet in 35 µl sterilem, UV-reinem H₂O auflösen.

Die Zusammensetzung der Chemikalien ist im Anhang genau nachzulesen.

Aufgrund des hohen Risikos durch toxisches Phenol wird die „klassische Methode“ allerdings immer weniger angewendet und vermehrt auf Säulenisolierung etc. zurückgegriffen (Mühlhardt, 2006).

2.3.1.2 Protokoll Methode 2- Isolierung mit DNA-Extraktions-Kit

Die zweite Methode, die zur Extraktion von DNA verwendet wurde, war die DNA-Isolierung mittels „FastDNA[®] SPIN Kit for Soil“ (MP-Biomedicals, Germany).

Das folgende Protokoll für die schnelle Isolation zeigt die erforderlichen Arbeitsschritte auf:

- a) 1000 µl Probe abzentrifugieren (15 min /16.000 g);
- b) Pellet in 978 µl Natrium-Phosphat-Puffer lösen und in das „Lysing Matrix E tube“ überführen;
- c) 122 µl „MT“-Puffer (im Kit enthalten) hinzupipettieren;
- d) mit einem „Ribolyser“ für 40 sec bei Stufe 6 homogenisieren;
- e) mit 14.000 g für 5 bis 15 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugieren (um Zellbruchstücke zu eliminieren);
- f) Überstand in ein neues 2 ml großes Eppendorfgefäß überführen und 250 µl Protein-Präzipitationslösung („PPS“) hinzugeben und 10-mal mit der Hand schwenken; mit 14.000 g für 5 min zentrifugieren und den Überstand wieder in ein neues 2 ml großes Eppendorfgefäß überführen;
- g) Binde-Matrixlösung zubereiten, d.h. die Matrixlösung resuspendieren und 1 ml davon zu dem Überstand hinzugeben und 2 min mit der Hand schwenken, dann 3 min warten, bis sich die Silikamatrix abgesetzt hat;
- h) 500 µl des Überstandes verwerfen (vorsichtig, um das Sediment nicht aufzunehmen);
- i) die Binde-Matrix nun resuspendieren und ca. 600 µl der Mischung in einen SPIN-Filter überführen und mit 14.000 g für 1 min bei RT zentrifugieren;
- j) 500 µl der „SEWS-M-Lösung“ auf die Filtermembran geben und vorsichtig resuspendieren;
- k) mit 14.000 g für 1 min zentrifugieren und das Auffanggefäß leeren;
- l) erneut mit 14.000 g für 2 min bei RT zentrifugieren und die Filtermembran (Matrix) für 5 min bei Raumtemperatur trocknen lassen;

- m) die Binde-Matrix nun auf der Filtermembran entweder mit 50 bis 100 μl DNase-freiem Wasser (DES) oder UV-sterilisiertem Wasser resuspendieren;
- n) für die Erhöhung der Ausbeute an DNA die Suspensionen für 5 min bei 55 °C in einem Thermoblock inkubieren;
- o) Filtermembransäule in ein neues 1,5 ml großes Eppendorfgefäß überführen und mit 14.000 g für 1 min zentrifugieren;
- p) bei 4 °C für baldige Nutzung oder für eine dauerhafte Aufbewahrung bei -20 °C lagern.

Die Kit-Methode wurde wie folgt abgeändert: Bei Punkt h) des Protokolls wurde 1 ml statt 500 μl verworfen und für die spätere DNA-Elution wurden 50 μl ddH₂O (Roth) verwendet. Diese Methode liefert Template-DNA mit höherer Reinheit bzw. weniger PCR-inhibierenden Stoffen (Lebuhn et al., 2003). Auch die frisch isolierte DNA wurde im Verhältnis 1 : 10 (2 μl isolierte DNA auf 18 μl ddH₂O) verdünnt, um die PCR beeinflussenden Verbindungen in geringer Konzentration vorliegen zu haben.

Anmerkungen:

Falls die Probeschlämme zu fest waren bzw. eine zu hohe Viskosität hatten und so der Aufschluss mit Glaskugeln nicht die gewünschten Ergebnisse lieferte, wurde nicht 1 g Probeschlamm, sondern es wurden 300 mg Probeschlamm genommen und mit 700 μl „PBS-Puffer“ aufgeschlämmt. Diese Vorbehandlung war bei den Proben 58 bis 66 nötig, um eine niedrigere Viskosität und einen besseren Aufschluss zu erreichen. Grundsätzlich isolierte man von allen Proben die DNA, jedoch zeigt *Tabelle 5* nur jene, mit welchen weitergearbeitet wurde. Ausgewählt wurden jene Proben der Versuchstage, an denen einerseits relativ konstante Prozessbedingungen herrschten und andererseits schwankende Prozessparameter festgestellt wurden. Geachtet wurde darauf, dass der gesamte Fermentationslauf durch die untersuchten Proben abgedeckt war.

Schlämme, die nach dem Aufschluss noch eine zu geringe Menge an DNA oder gar keine isolierte DNA zeigten, wurden mittels der kitbasierenden Methode erneut aufgeschlossen (siehe *Tabelle 5*).

Tab. 5: Extraktionsmethoden der ausgewählten Proben (P/C/I = Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)

Probenamen	Extraktionsmethoden	Probenamen	Extraktionsmethoden
58	P/C/I	27	P/C/I
59	P/C/I	31	P/C/I
60	P/C/I	32	P/C/I
61	P/C/I	33	P/C/I
62	P/C/I	37	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil
64	P/C/I	38	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil
65	P/C/I	39	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil
66	P/C/I	46	P/C/I
1	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	47	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil
2	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	48	P/C/I
3	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	52	P/C/I
4	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	53	P/C/I
5	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	54	P/C/I
6	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	55	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil
10	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	56	P/C/I
11	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	57	P/C/I
12	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	67	P/C/I
13	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	68	P/C/I
14	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	69	P/C/I
15	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	70	P/C/I
19	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	71	P/C/I
20	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	72	P/C/I
21	FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	76	P/C/I
25	P/C/I	77	P/C/I
26	P/C/I	78	P/C/I

2.3.1.3 Die Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der isolierten DNA aus den Ganzschlammproben und der in Folge PCR-amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente wurden Gelelektrophoresen durchgeführt.

Zur Kontrolle der DNA-Isolierung wurden 0,8%ige Agarosegele gelaufen. Die Zusammensetzung der 0,8%igen Agarosegele war: 0,8 g Agarose (peqlab, Germany) auf 100 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA).

Zur Kontrolle der 16s rRNA-Genfragmente und Banden-DNA der SSCP Gele wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet: Die Zusammensetzung der 1,5%igen Agarosegele war: 1,5 g Agarose (peqlab, Germany) auf 100 ml TAE-Puffer.

Die Mischungen wurden per Mikrowelle zur Schmelze gebracht und nach kurzem Abkühlen in die Gelkammer gegossen, um dort auszupolymerisieren.

Unabhängig von den verwendeten Geräten wurden folgende Einstellungen für die Elektrophorese gewählt (*Tabelle 6*):

Tab. 6: Einstellungen der Elektrophorese für DNA-Isolate und 16s rRNA Amplifikate (V = Volt; mA = Milliampere; min = Minuten)

Einstellungen der Gelelektrophorese zur Kontrolle der DNA				
DNA-Typ	Spannung	Stromstärke	Leistung	Dauer
gDNA-Isolate	100 V	300mA	50 Watt	60 min
16s rRNA Amplifikate	120 V	300mA	50 Watt	25 min

Es wurden 5 bis 10 µl DNA-Lösung je Probe mit je 3 µl Ladepuffer versetzt und in die Gelslots pipettiert. Die Kontrolle der Größe erfolgte mittels „GeneRuler™ 1 kp DNA Ladder, ready-to-use“ (Fermentas, Germany) für die DNA-Isolate und mittels „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use“ (Fermentas, Germany) für die amplifizierte Genfragmente. Die Sichtbarmachung der DNA geschah durch 10- oder 20-minütiges Einlegen in ein Ethidiumbromidbad (bestehend aus 60 µl Ethidiumbromid in 600 ml destilliertem H₂O) und einer Betrachtung unter UV-Licht.

2.3.2 Polymerasenkettenreaktion

Die „Polymerasenkettenreaktion“, kurz PCR, gilt als DIE Methode der Molekularbiologie. Bei deren anfänglicher Anwendung (1985) wusste jedoch noch niemand, welche Möglichkeiten sich durch dieses molekularbiologische „Tool“ ergeben würden. Die Anzahl der Reagenzien für eine PCR ist überschaubar: So braucht man eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) mit passendem Puffer, ein DNA-Template, zwei passende Oligonukleotidprimer, die richtige Menge an Oligonukleotiden und einen PCR-Cycler (Mühlhardt, 2006). Das Prinzip der PCR siehe wird in *Tabelle 7* dargestellt:

Tab. 7: Die prinzipiellen Schritte der Polymerasenkettenreaktion (PCR) nach Mühlhardt (2006)

Das Prinzip der PCR	
Schritt 1	Denaturierung der Ausgangs- DNA (Template-DNA) bei 94 °C; Dabei trennt sich der DNA-Doppelstrang.
Schritt 2	Annealing der Primer (Hybridisierung): Primer binden an DNA-Einzelstränge.
Schritt 3	Elongation durch Erhöhung der Temperatur auf das Arbeitsniveau der Polymerase, um die Zweitstrangsynthese zu gewährleisten (Elongation in 5'-3'- Richtung): In diesem Schritt wird die DNA verdoppelt.
Schritt 4	Wiederholung der Schritte 1-3: 20 - 30 Wiederholungen werden benötigt, um genügend PCR-Produkte zu erhalten.
Schritt 5	Ein finaler Elongationsschritt längerer Dauer.

Folgende Punkte sind bei Vorbereitung für eine PCR zu beachten, um richtig amplifizierte Genfragmente zu erhalten:

- a) *Annealingtemperatur*: Die Primer benötigen eine optimale Hybridisierungstemperatur, welche mit unterschiedlichsten Gleichungen oder Computerprogrammen errechnet werden kann. Bis zu einer Primerlänge von 20 bp kann man folgende Gleichung anwenden: Schmelztemperatur Primer $T_m = 4 \times (\text{Anzahl G-Basen bzw. C-Basen}) + 2 \times (\text{Anzahl A-Basen bzw. T-Basen})$. Um nun eine Bindung an die DNA zu ermöglichen, wird die Annealingtemperatur um 5 bis 10 °C niedriger gewählt.
- b) *Die Elongationszeit* sollte der Produktlänge angepasst werden, um die Fehlerquote der Polymerase niedrig zu halten. Die Polymerase sollte genügend Zeit haben, um das

Genstück amplifizieren zu können. Eine zu kurze Elongationszeit führt zu unvollständigen Genamplifikaten.

- c) *Reinheit der Template-DNA*: Je hochwertiger die Qualität der Ausgangs-DNA ist, desto leichter lassen sich richtige PCR-Produkte erzeugen.
- d) *Puffer*: Die Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von über 8, deshalb ist es nötig den pH-Wert des Puffers dementsprechend anzupassen. Erhältlich sind auch Taq-Polymerasen, welche in einem optimalen konzentrierten Puffer geliefert werden. Die Pufferzusammensetzung kann die Fehlerrate (Rate des Falscheinbaus von Basen) der Polymerase (Taq-Polymerase) verändern.
- e) *MgCl₂*: Die Konzentration an freien Magnesiumionen ist so zu wählen, dass weder das Primerannealing noch die Produktspezifität beeinflusst wird. Meist ist man mit einer Konzentration von 2 mM (millimolarer) MgCl₂ erfolgreich.
- f) *Primerkonzentration*: Die Konzentration an Primern ist für die Ausbeute erheblich. Meist verwendet man bei einem 50 µl-Ansatz durchschnittlich ca. 10 pmol je Primer.
- g) *Zyklenzahl*: Zu einem Plateau-effekt kommt es, wenn eine Produktmenge erreicht wird, bei der die Vermehrungsrate stark abnimmt. Dann erhöht sich die Möglichkeit einer Fehlhybridisierung und es kommt zu einer Fehlproduktbildung. Für die besten Ergebnisse passt man die PCR so an, dass sie bei Erreichen des Plateaus beendet wird.
- h) *Temperaturabhängigkeit der Polymerasen*: Jede Polymerase hat eine optimale Arbeitstemperatur. Polymerasen sind jedoch auch unter ihrem Temperaturoptimum aktiv, wenn auch nur schwach. Bei zu hoher Temperatur kann es zur vollständigen Inaktivierung bzw. Denaturierung der Polymerase kommen. Eine Lagerung unter ihren Temperaturoptima (hier arbeitet das Enzym mit verminderter Aktivität) kann bei Polymerasen mit Korrekturfähigkeit (z.B. „proofreading“ der „pfu-Polymerase“ aus *Pyrococcus furiosus*) zu Problemen führen. Längere Stehzeiten bewirken, dass Polymerasen mit „proofreading“ nach der fertigen PCR die Produkte teilweise abzubauen beginnen. Deshalb soll man die Reaktionsgefäße nach abgeschlossener Reaktion in Eis kalt stellen (Mühlhardt, 2006).

2.3.2.1 Amplifizierung der 16S rRNA Genfragmente aus der isolierten genomischen DNA

Die Amplifizierung der DNA mittels PCR hat den Sinn spezielle DNA-Fragmente für molekularbiologische Untersuchungen zu amplifizieren. Aus der evolutionär sehr konservierten Region der DNA für die ribosomale Untereinheit 16 S, der 16S rRNA, wurde über die Polymerasenkettenreaktion mit den Primern „COM1f“ (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3' [Schwieger and Tebbe, 1998]) und „927r“ (5'-CCCGTCAATTYMTTGGAGTT-3' [Lieber et al., 2002]) ein 412 Basenpaar (bp) langes Genfragment amplifiziert und gleichzeitig phosphoryliert (siehe *Abbildung 12*). Diese Phosphorylierung diente zum späteren Einzelstrangverdau durch Lambda-Exonuclease. Der für die PCR notwendige Thermocycler war ein „TPersonal Thermocycler“ (Biometra, Germany). Zusätzlich wurde zur Amplifizierung der 412 bp langen bakteriellen 16S rRNA Fragmente in Folge auch eine Amplifizierung archaealer 16S rRNA mit einer Länge von 272 bp mittels Primerpaar „787f“ (5'-ATTAGATACCC(G/C)(G/T/C)GTAGTCC-3' [Yu et al., 2005]) und „1059r“ (5'-GCCATGCACC(A/T)CCTCT-3' [Yu et al., 2005]) durchgeführt.

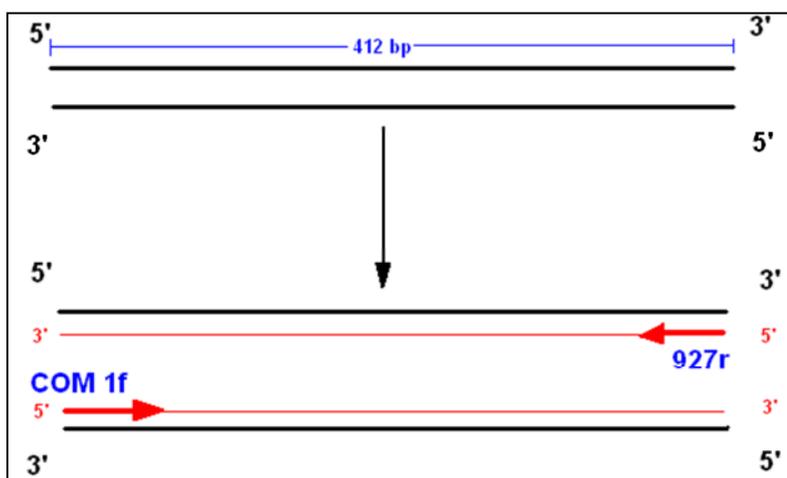


Abb. 12: Schema der amplifizierten bakteriellen 16s rRNA-Gen Region und der verwendeten Primer „Com1f“ (f = forward) und „927r“ (r = reverse)

Abbildung 12 und 13 zeigen Schemata der Bindungen der Primer „Com1f“, „927r“ und „787f“, „1059r“ an die DNA-Einzelstränge. Die Elongation erfolgt in 5′-3′-Richtung, gekennzeichnet durch die roten Pfeile in der Abbildung. Die blauen Linien zeigen die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente.

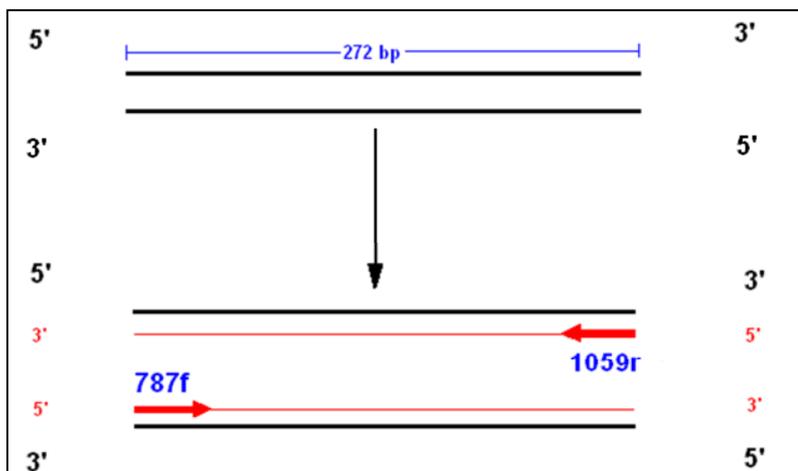


Abb. 13: Schema der amplifizierten archaealen 16S rRNA Region und der verwendeten Primer „787f“ (f=forward) und „1059r“ (r=reverse)

Die archaealen Primer „787f“ und „1059r“ (Yu et al., 2005) wurden bisher im Zuge quantitativer PCRs bzw. DGGE-Gele (mit GC-Klammer) verwendet, jedoch nicht in Verbindung mit SSCP-Gelen.

2.3.2.2 PCR des bakteriellen 16S rRNA Genfragments

Vorerst wurden 20 µl Ansätze gemacht und bei positiver Amplifizierung ein erneuter 40 µl Ansatz durchgeführt. Dies war vor allem bei den DNA-Isolaten aus der klassischen

Phenol-Chlorophorm-Isolierung ratsam, da diese nicht immer positiv waren und es in der Folge zu teilweise negativen PCR-Ergebnissen kam.

In *Tabelle 8* werden die Reagenzien für die Amplifizierung des bakteriellen Genfragments aufgelistet. Man erhält einen Überblick, welche Volumina des jeweiligen Reagenzes benötigt wurden.

Tab. 8: Komponenten und Menge der angewendeten „COM I“ - PCR-Ansätze

Reagenzien	20 µl Ansatz (µl)	40 µl Ansatz (µl)	60 µl Ansatz (µl)
Taq & Go Polymerase	5	10	15
MgCl 50 mM	0,6	1,2	1,8
Com I forward Primer	0,8	1,6	2,4
927 reverse Primer	0,8	1,6	2,4
ddH ₂ O	11,8	25,6	37,4
DNA- Lösung	1	1	1

Das in *Tabelle 8* aufgelistete Reagenz „Taq-&GO™ Ready-to-use PCR Mix“ (MP Biomedicals, Germany) enthielt die Taq-Polymerase.

Tabelle 9 zeigt die auch schon in *Tabelle 4* aufgelisteten Proben, aus denen die bakteriellen Genfragmente amplifiziert wurden.

Tab. 9: „COM I“- amplifizierte Proben

Probenbezeichnung			
58	6	31	56
59	10	32	57
60	11	33	67
61	12	37	68
62	13	38	69
64	14	39	70
65	15	46	71
66	19	47	72
1	20	48	76
2	21	52	77
3	25	53	78
4	26	54	
5	27	55	

Tab. 10 zeigt die Einzelschritte des „COM I“-Thermocyclerprogramms nach Pobeheim et al. (2010), ausgehend von der Initial-Denaturierung bis zur finalen Elongation.

Tab. 10: Thermocyclerprogramm „COM I“ (Pobeheim et al., 2010)

Com I- Programm	Temp. (°C)	Zeit (s)	
Initial Denaturierung	94	180	
Denaturierung	94	60	35 Zyklen
Annealing	50	60	
Elongation	72	70	
Final Elongation	300	72	

2.3.2.3 PCR des archaealen 16S rRNA Genfragments

Als Ausgangs-DNA für die Amplifizierung wurden die gleichen Isolate wie bei der „COM I“-PCR verwendet. Im Vergleich zum „COM I“-Programm änderte sich beim PCR-Programm „272“ für archaeale Primer sowohl die Zyklenzahl, die einzelnen Laufzeiten der Programmschritte variierten.

In der nachfolgenden *Tab. 11* werden die verwendeten Volumina der benötigten Reagenzien für die verschiedenen PCR-Ansätze aufgelistet.

Tab. 11: Komponenten und Menge der angewendeten archaealen „272“-PCR-Ansätze

Reagenzien	20 µl Ansatz (µl)	40 µl Ansatz (µl)	60 µl Ansatz (µl)
Taq & Go Polymerase	5	10	15
MgCl 50 mM	0,6	1,2	1,8
787 forward Primer	0,8	1,6	2,4
1059 reverse Primer	0,8	1,6	2,4
ddH ₂ O	10,8	24,6	36,4
DNA- Lösung	2	2	2

Die Proben 27 bis 58 wurden in jeweils 60 µl PCR-Ansätzen amplifiziert. Die Proben 32 bis 78 mussten mehrmals amplifiziert werden, um positive Ergebnisse zu erhalten.

Da angenommen wurde, dass archaeale DNA in der gesamten gDNA nur in geringer Menge vorhanden ist, wurden für die PCR der archaealen 16S rRNA Genfragmente 2 µl Template DNA (1 : 100) eingesetzt.

Das „272“-Thermocyclerprogramm für eine archaeale PCR kam nach der Isolierung zur Anwendung (siehe *Tabelle 12*):

Tab. 12: Thermocyclerprogramm “272”

272- Programm	Temp. (°C)	Zeit (s)	
Initial Denaturierung	94	180	
Denaturierung	94	60	30 Zyklen
Annealing	55	60	
Elongation	72	70	
Final Elongation	300	72	

Zur Kontrolle der Amplifikate wurden Gelelektrophoresen durchgeführt, siehe *Kapitel 2.3.1.3, Gelelektrophorese*.

Die Erstanätze mit jeweils 60 µl Gesamtvolumen zeigten auch nach längerem Bad in Ethidiumbromidlösung kein positives Ergebnis bzw. keine sichtbare Amplifikation. Anfänglich wurden nur Ansätze mit kleinen Volumina (20 µl) angesetzt. Erst bei erfolgreichem Ergebnis wurden Ansätze mit einem Volumen von 40 µl angesetzt und nach vollendeter PCR mit den fertigen 20 µl gepoolt. Proben, welche keine Amplifikation zeigten, wurden verworfen und die DNA nochmals frisch mit Kit isoliert.

2.3.2.4 PCR-Produkt-Aufreinigung

Um für den Einzelstrangverdau gereinigte DNA vorliegen zu haben, wurden die fertig amplifizierte PCR-Ansätze mit dem „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“-Kit (Promega, Germany) aufgereinigt und bis zur Konzentrationsbestimmung kühl bei 4 °C aufbewahrt oder für längere Lagerung bei -20 °C gelagert.

2.3.2.5 Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte

Für das Beladen des SSCP-Gels mit DNA war es zwecks der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse notwendig, die Konzentration an DNA in den gereinigten PCR-Ansätzen zu kennen. So wurden die aufgereinigten PCR-Ansätze mit einem UV/VIS-Spektrophotometer, in diesem Fall mit einem „NanoDrop1000“ (Thermo Scientific, Germany), gemessen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Spektrophotometrie benötigte man hier nur 1 µl an DNA-Lösung bzw. 1 µl an PCR-Produkt. Dies verursachte keinen Zeitverlust durch Hantieren mit Küvetten und lieferte reproduzierbare Ergebnisse. Als Blindwert wurde ddH₂O (Roth, Germany) verwendet (aus „Applicationnote“-NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Germany).

2.3.3 Einzelstrangverdau mittels λ-Exonuklease und Einzelstrangfaltung

Bei der Lambda-Exonuklease (NEW ENGLAND Biolabs, Germany) handelt es sich um ein sehr prozessives rekombinantes Enzym, welches bevorzugt phosphorylierte doppelsträngige DNA (dsDNA) in 5'-3' Richtung zum Einzelstrang abbaut. Neben phosphorylierter DNA baut

die Exonuklease auch einzelsträngige DNA (ssDNA) und nicht phosphorylierte DNA ab, wenn auch mit sehr geringer Prozessivität (Little, 1981).

Die Exonuklease mit einer spezifischen Aktivität von 100.000 Units/mg wurde mit dazugehörigem 10-fachem Exonuklease-Puffer (NEW ENGLAND Biolabs, Germany) verwendet.

Folgende Punkte zeigen die Vorgehensweise für den Einzelstrangverdau und die anschließende Faltung der einzelsträngigen DNA:

- Inkubation der DNA mit Nuklease (12 U pro Ansatz) bei 37 °C für 60 min im Eppendorf Thermoblock;
- Zugabe von 30 µl Ladepuffer und Strangdenaturierung bei 95 °C für 2 min;
- Faltung im Ladepuffer auf Eis für mindestens 5 min.

Tabelle 13 führt die Reaktionsmischung für den Einzelstrangverdau auf und *Tabelle 14* zeigt die Zusammensetzung des Gel-Ladepuffers.

Tab. 14: Zusammensetzung des λ-Exonukleasereaktionsgemisches pro zu verdauender DNA- Probe

Reaktionsgemisch	Volumina (µl)
DNA	30
λ- Exonuclease	2,4
Nuclease- Puffer	3,6
Gesamtvolumen	36

Tab. 13: Zusammensetzung des Gel-Ladepuffers (NaOH = Natriumhydroxid 2, 5 molar)

Ladepuffer	Vol. µl
Formamid	950
NaOH 2,5 M	4
Bromphenolblau 5 %	5
dd.H ₂ O	41
Gesamtvolumen	1000

2.3.4 Die Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP)

Das Konzept des SSCP nutzt die Neigung von einzelsträngiger DNA mit sich selbst eine Basenpaarung einzugehen und dadurch eine komplexe Konformation zu bilden. Die Basenpaarung hängt hauptsächlich von der Temperatur und der Sequenz des DNA-Fragments ab. So bietet sich diese Methode zur Untersuchung von Mutationen bis zu einer Varianz von einem Basenpaar an. In diesem Fall wurde die Methode zur Untersuchung verschiedener Organismen aufgrund ihrer nur leicht variablen 16S rRNA-Genfragmente verwendet. Im Gegensatz zu Geräten für Agarosegele ist bei SSCP-Elektrophoresegeräten eine konstante, definierte Temperatur notwendig (Mühlhardt, 2006). SSCP-Gele sind nicht-denaturierende Polyacrylamidgele (PA-Gele) aus polymerisiertem Acrylamid. Die Konzentration der PA-Gele wird über die Menge an eingesetzter Acrylamidlösung (2 x MDE-Lsg.) bestimmt.

Tabelle 15 zeigt die Zusammensetzung der SSCP-Gele mit 8%iger bzw. 9%iger Acrylamidkonzentration:

Tab. 15: Zusammensetzung der SSCP-Gele

8% iges Acrylamidgel für bakterielle Genfragmente		
Reagenzien	Volumina	Eigenschaften
5 x TBE-Puffer	12,1 ml	Puffer
2 x MDE Lsg.	18,2 ml	beinhaltet Acrylamid
H ₂ O	21,4 ml	-
10%iges APS	243 µl	Radikalstarter
TEMED	24,5 µl	Reaktionskatalysator
9% iges Acrylamidgel für archaeale Genfragmente		
Reagenzien	Volumina	Eigenschaften
5 x TBE-Puffer	10,4 ml	Puffer
2 x MDE Lsg.	20,5 ml	beinhaltet Acrylamid
H ₂ O	20,8 ml	-
10%iges APS	275 µl	Radikalstarter
TEMED	27,5 µl	Reaktionskatalysator
(nach Schwieger und Tebbe, 1998)		

Der in der *Tabelle 15* aufgeführte **Tris-Borat-EDTA-Puffer** (kurz TBE-Puffer) dient in einfacher Konzentration als Laufpuffer für die Elektrophorese. Nach Vermengen der

Reagenzien setzt die Polymerisation sofort ein. Deshalb ist es nötig, die Mischung so schnell wie möglich gleichmäßig in die vorbereitete Gelkammer zu gießen. Hierzu dient eine einfache 50-ml-Spritze mit dünner Nadel. Die Glasplatten sollten nach mehreren Anwendungen frisch mit einer Silikonlösung beschichtet werden, um das Lösen des polymerisierten Gels von der Glasplatte zu gewährleisten. *Abbildung 14* zeigt die vorbereitete Gelkammer ohne Frontalplatte mit Probenspacern, Gummidichtung, Klammern, rückseitiger Glasplatte und das Schema des Gelgießens:

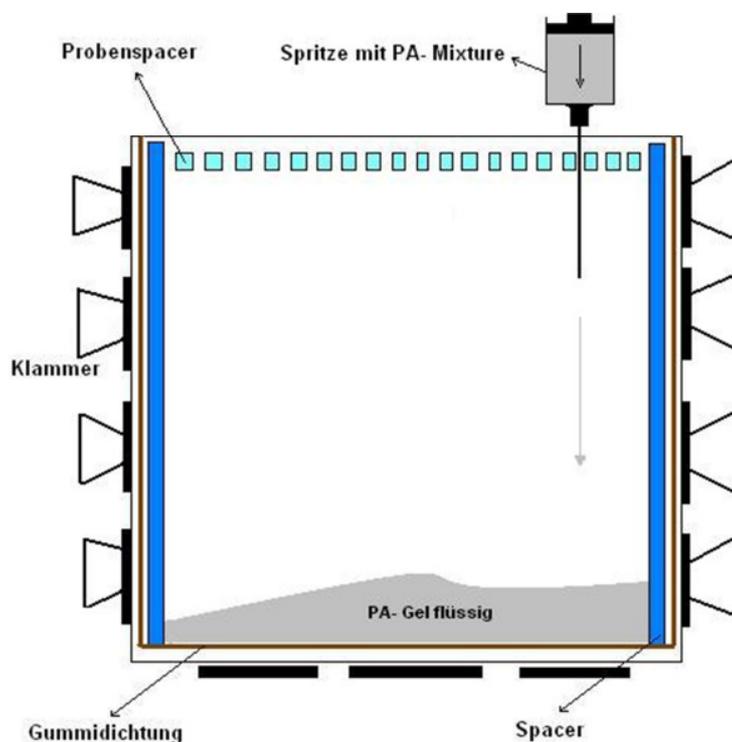


Abb. 14: Schema der SSCP-Gelkammer (ohne Frontalglasplatte)

Das flüssige Gel wird, wie in *Abbildung 14* angedeutet, mit der Spritze gleichmäßig und unter Vermeidung von Blasenbildung bis ca. 1 cm unter die Probenspacer gegossen, mit ein wenig Ethanol überschichtet und zur Polymerisation mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach fertiger Auspolymerisation wird das auf einer Nylonfolie fixierte Gel in

die Kammer des Elektrophoresegerätes („TGGE Maxi“, Biometra, Germany) eingelegt und zur Elektrophorese vorbereitet. Dies zeigt *Abbildung 15*:

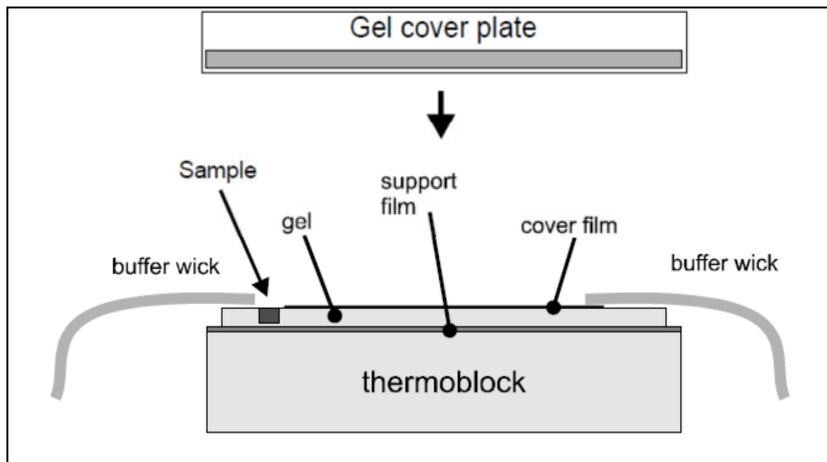


Abb. 15: „Set-up“ des Gels für die Elektrophorese („Instruction Manual“ TGGE-MAXI, Biometra, Germany, 2009)

Es wurde eine 10-minütige Vorlaufzeit bei 400 V, 50 mA und 20 °C gewählt. Für die eigentliche Laufzeit von 26 Stunden verwendete man eine Temperatur von 26 °C. Von der bakteriellen DNA wurden für Gel 1 je 100 ng DNA pro Probe und Gelslot und für Gel 2 je 200 ng DNA pro Probe und Gelslot aufgetragen. Die archaealen DNA-Proben wurden für Gel 1 jeweils mit 200 ng DNA und für Gel 2 mit 300 ng DNA eingesetzt.

Kurze DNA-Fragmente haben die Eigenschaft aus dem Gel zu laufen. Dazu zählen auch die amplifizierten archaealen 272 bp DNA-Fragmente. Deshalb wurde für diese Gele die Laufzeit auf 17 Stunden verkürzt (nach persönlicher Kommunikation mit Florian Schmid, wissenschaftlicher Assistent am Institut für Umweltbiotechnologie an der TU Graz).

2.3.4.1 Nachweisen von DNA–Silberfärbung nach Bassam et al. (1991)

DNA lässt sich durch verschiedene Methoden nachweisen. So wurde sie ursprünglich radioaktiv markiert und mittels Autoradiographie nachgewiesen. Eine schnellere, aber ein wenig arbeitsaufwändigere, nicht radioaktive Alternative ist die Färbung mit Silbernitrat, da hier die Gele zuerst getrocknet und dann aufbewahrt werden können (Mühlhardt, 2006). Die Färbung erfolgte mittels Silbernitrat nach Bassam et al. (1991).

Folgende Arbeitsschritte bilden das Protokoll zur Färbung von SSCP-Gelele mit Silbernitrat:

- a) Gel aus der Gelkammer nehmen, in Färbeschale überführen und mit 10%iger Essigsäure überschichten, um die DNA im Gel zu fixieren;
- b) 3 x mit Wasser waschen;
- c) 300 ml 0,1%ige Silbernitratlösung zugeben und 30 min (auf Schüttler) inkubieren;
- d) Silbernitratlösung verwerfen und einmal mit wenig Wasser waschen und abgießen;
- e) mit 200 ml 3%iger NaOH-Lösung kurz waschen und abgießen und mit 300 ml 3%iger NaOH-Lösung dunkel (abgedeckt) entwickeln lassen, bis Banden sichtbar sind (dabei schwenken lassen) und danach NaOH-Lösung verwerfen;
- f) Reaktion nach 30 min mit 10%iger Essigsäure stoppen, danach 30 min lang mit Wasser waschen – nun können Banden zur Sequenzierung ausgeschnitten werden;
- g) das Gel mit Konservierungsflüssigkeit [10 % Ethanol (98,9 %), 13 % Glycerin und 77 % Wasser] konservieren.

Nach Punkt f) und vor Ausschneiden der Banden ist es möglich das Gel für die folgende Cluster-Analyse einzuscannen. Um eine unregelmäßige Trocknung des Gels zu verhindern, wurde es mit einer Cellulosemembran bedeckt und horizontal getrocknet.

2.3.4.2 Bandenelution aus PA-Gelen

Die Bandenelution wurde nach Pobeheim et al. (2010) durchgeführt und beinhaltet folgende Schritte zur Herstellung des Elutionspuffers:

- a) Ausschneiden der Banden mit Skalpell (mit Ethanol gewaschen), Transfer in sterile 1,5 ml große Eppendorf-Gefäße und Lagerung über Nacht bei -70 °C;
- b) Zugabe von 150 µl Elutionspuffer je Bande und Zerteilen der Banden mit sterilen Pipettenspitzen;
- c) 15 min bei -70 °C; 5 min bei 50 °C und 10 min bei 95 °C erhitzen (mit dem Thermomixer Comfort, Eppendorf, Germany);
- d) 3 h bei 37 °C und 500 rpm schütteln lassen (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Germany);
- e) für 3 Tage im Gefrierschrank bei -20 °C lagern;
- f) für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren (Hermle Z300K, Germany) ;
- g) 120 µl des Überstandes in frische, sterile 1,5 ml große Eppendorf-Gefäße überführen, je 300 µl 70%igen Ethanol zugeben und für 3 h bei -20 °C inkubieren;
- h) für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen;
- i) Pellet trocknen (Cleanbench) und in 30 µl sterilem PCR-Wasser (Roth, Germany) aufnehmen.

Folgende Änderungen wurden vorgenommen: Um für die PCR sehr reine DNA-Fragmente zu haben, wurde bei Punkt g) das Protokoll wie folgt geändert: Je Bande wurde ein Volumen von 60 µl des 120 µl Überstandes nicht nach Protokoll mit 70%igem Ethanol präzipitiert, sondern aufgereinigt („Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“- Kit, Promega, Germany) und davon je Probe 1 µl für die PCR verwendet.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Banden-Elution wurden 1,5%ige Agarosegele gelaufen, siehe *Kapitel 2.3.1.3, Gelelektrophorese*.

2.3.4.3 Amplifikation der Banden-DNA

Die Amplifikation der Banden-DNA war nötig, um für die folgende Sequenzierung genügend DNA zur Verfügung zu haben. PCR-Reagenzien und PCR-Programm sind in *Kapitel 2.3.2.2, PCR des bakteriellen 16S rRNA Genfragments* in *Tabelle 8* und *10* beschrieben.

2.3.4.4 Aufreinigung

Eine Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“-Kit (Promega, USA) durchgeführt und die DNA in je 30 µl ddH₂O (Roth, Germany) eluiert.

2.3.4.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Eurofins (Deutschland) durchgeführt. Die Sequenziervorbereitungen nach den Anweisungen der MWG Eurofins geschahen am Institut.

2.4 Cluster-Analyse und Canonische Korrespondenzanalyse

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchung der mikrobiellen Populationen der Fermentationsproben mithilfe der Cluster-Analyse und der Canonischen Korrespondenzanalyse.

2.4.1 Cluster-Analyse

Nach dem Einscannen der Gele wurde eine Cluster-Analyse mit dem Programm „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) durchgeführt. Ein durch das Programm ermittelter Ähnlichkeits-Koeffizient – der *Pearson*-Koeffizient – gibt die prozentuelle Ähnlichkeit der Bandenmuster zueinander an und bildet den ersten Schritt der Cluster-Analyse. Die Gruppierung der Bandenmuster erfolgte mittels UPGMA („unweighted pairwise grouping method using arithmetic means“). Die Clusteranalyse wurde noch mit den Prozessparametern Essigsäure, Propionsäure, Ammoniak und Raumbelastung verglichen. Für jeden Bioreaktor wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine Cluster-Analyse durchgeführt.

2.4.2 Canonische Korrespondenzanalyse

„Canoco for Windows“ (Version 4.5, Biometris, Netherlands) ist ein Programm, das organismische Gemeinschaften und den Zusammenhang mit ihrer Umwelt zu verstehen hilft. Diese Art der Analyse gibt einen Einblick in eine biologische Gesellschaft und zeigt die Zusammenhänge von Umweltparametern mit dieser Gesellschaft (ter Braak und Smilauer,

2002). Die mit dem Programm „Canoco for Windows“ (Version 4.5) durchgeführte „Canonische Korrespondenzanalyse“ ist eine multivariate Methode, um die Anzahl von Spezies und Umweltparametern in Zusammenhang zu bringen (ter Braak und Verdonschot, 1995). Im Zuge dieses Projektes wurden die Bandenintensitäten der SSCP-Gele 1 und 2 der bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente aus der zuvor durchgeführten Cluster-Analyse extrahiert. Diese SSCP-Gele repräsentierten die „Anlaufphase“ und die „stabile Phase“. Die Bandenintensitäten wurden mittels „Canoco for Windows“ mit den Werten der Prozessparameter Essigsäure, Propionsäure, Ammoniak und Raumbelastung korreliert. Zusätzlich wurde die Signifikanz der Prozessparameter mittels „Monte-Carlo-Permutations“-Test ermittelt. Für jeden Bioreaktor und für jede Phase wurden mit dem Programm „CanoDraw“ (Biometris, Netherlands) Graphen erstellt. Jeder Prozessparameter wurde dabei als Ordinate dargestellt und die Banden korrelierten umso mehr mit dem jeweiligen Prozessparameter, je näher sie der zugehörigen Ordinate waren bzw. sich an der Verlaufsrichtung orientierten. Über die Sequenzanalysedaten konnte ein Teil der SSCP-Banden als Spezies bzw. Gattung identifiziert und im Graphen gekennzeichnet werden.

2.5 CLSM-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Parallel zur molekularbiologischen Charakterisierung der Fermenter I1, I2 und I3 der LfL-Bayern wurden Migulatorpartikel und Grassilagefasern aus Batchversuchen mit der „Konfokalen Laser Raster Mikroskopie“ oder der „Confocal Laser Scanning Microscopy“ (Mikroskop: Leica TCS SPE) mit Unterstützung von Massimiliano Cardinale (Assistenzprofessor am Institut für Umweltbiotechnologie der TU Graz) untersucht. Bei dieser Untersuchung standen der sichtbare Grassilageabbau und die um die Silagefasern assoziierten Mikroorganismen im Mittelpunkt. *Kapitel 2.5.1* zeigt überblicksmäßig die Methode hinter der „Confocal laser Scanning Microscopy“ und die *Kapitel 2.5.2 bis 2.5.7* die Arbeitsschritte, die zur Erstellung von mikroskopischen Bildern mit dem Konfokalmikroskop nötig waren.

2.5.1 Methode „Confocal Laser Scanning Microscopy“

Die Erstellung eines Bildes mit einem Rastermikroskop (CLSM) resultiert aus der Beleuchtung der Proben mit einem fokussierten Lichtpunkt. Die Proben werden gerastert, d.h. Zeile für Zeile gescannt. Meist verwendet man dazu einen Argon-Ionenlaser und einen Helium/Neon-Laser und erlaubt so das Erstellen wichtiger Aufnahmemodi wie z.B. die „Konfokale Bildaufnahme“ (Halbhuber, 2002). Die CLSM-Mikroskopie bietet im Vergleich zur herkömmlichen Mikroskopie einige Vorteile. Das Grundkonzept des konfokalen Mikroskops beruht auf dem Entfernen von „Out-of-Focus“-Lichtstrahlen (diese führen zu unscharfen Bildern bzw. zu Hintergrundrauschen) durch eine im Strahlengang des Lichtes eingebaute konfokale Lochblende. Diese Art der Bildaufnahme bringt eine höhere Auflösung in der lateralen als auch axialen Richtung mit sich. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit optisch in verschiedene Tiefenebenen zu wechseln, ohne das Objekt physikalisch zu bewegen und 3D-Rekonstruktionen zu erstellen (Park und Kihm, 2006; Halbhuber, 2002).

2.5.2 Probenvorbereitung-Zellfixierung

Die Zellfixierung (Cardinale et al., 2008) diente der Konservierung bakterieller und archaealer Zellen in den Proben. Die Vorgangsweise wird in der folgenden Aufzählung beschrieben:

- Mit 3 x PBS waschen;
- jede Probe mit 800 µl eiskaltem, 4%igem Paraformaldehyd (PFA/PBS 4:1) mixen;
- bei 4 °C für 12 h inkubieren;
- die fixierten Proben (5 min, bei 4 °C, 13.000 g) zentrifugieren und den Überstand mit eiskaltem 1 x PBS austauschen; diesen Schritt 2-3mal wiederholen;
- die Proben in 1 Vol. eiskaltem PBS und in 1 Vol. eiskaltem 96%igem Ethanol resuspendieren;
- die Proben können nun für einen längeren Zeitraum bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.5.3 Protokoll: „Fluorescent *in situ* hybridization” (FISH) auf Objektträger

Um Mikroorganismen wie Bakterien und Archaeen auf Migulatorpartikel/Grassilagefasern zur Untersuchung mittels CLSM-Mikroskop sichtbar zu machen bzw. eine hohe Signalstärke zu erreichen, mussten die mit Paraformaldehyd fixierten Proben nach folgendem Protokoll (verändert nach Cardinale et al., 2008) mit Fluorochromen hybridisiert werden:

- Ca. 10 μ l der PFA-fixierten Proben mit ca. 200 μ l 1 x PBS suspendieren, auf adhäsive Objektträger (Thermo Scientific, Germany) bringen und bei 36 °C im Inkubator evaporieren;
- je 10 μ l 1 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, Austria) auf Proben bringen und 10 min bei RT inkubieren, um die Zellwand permeabel zu machen;
- mit 1 x PBS abspülen;
- 3-mal in 1 x PBS (eingefüllt in ein Falcontube) waschen und anschließend mit Druckluft trocknen, um den Vorgang zu beschleunigen.
- Ethanolreihe: Je 3 min in vorbereitete Falcontubes mit Ethanolkonzentrationen von 50 %, 80 % und 96 % tauchen und anschließend lufttrocknen;
- je Probe 1 ml Hybridisierungspuffer (siehe *Tab.16*) bei 36 °C vorwärmen und davon ca. 20 μ l (beinhalten die FISH-Sonden mit einer Endkonzentration von 2,5 ng/ μ l) direkt auf die Probe bringen;
- Objektträger mit Proben in die mit ein wenig Papier gefüllten Falcontubes überführen, den restlichen Hybridisierungspuffer (*HB*) auf das Papier pipettieren und die Falcons verschließen;
- bei 36 °C in der Dunkelkammer für 90 bis 180 min inkubieren;
- *HB* mit ca. 1 ml Waschpuffer (*Tab.17*) wegspülen und Proben in mit Waschpuffer gefüllte Falcontubes im Wasserbad bei 38 °C für 15 min inkubieren (alternativ Proben mit 500 μ l Waschpuffer überschichten);
- Objektträger für 3 sec in eiskaltes ddH₂O tauchen und mit Druckluft trocknen;

- mit ca. 10–20 µl „Prolong® Gold Antifadent“ (Invitrogen, Germany) beschichten, mit Deckglas bedecken und mit Nagellack versiegeln;
- bis zu 5 Tage bei 4 °C lagern.

Tab. 16: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers

Reagenzien	1000 µl Ansatz (µl)
Formamid	100 µl
NaCl 5M	180 µl
Tris-HCl 1M	20 µl
ddH ₂ O	690 µl
FISH Sonden	je 1 µl

Tab. 17: Zusammensetzung des Waschpuffers

Reagenzien	50 ml Ansatz (ml)
NaCl 5M	4,5 ml
TrisHCl 1M	1 ml
ddH ₂ O	44,5 ml

In *Tabelle 18* ist zu erkennen, dass jeweils 3 FISH-Sonden in 20 µl Hybridisierungspuffer pro Probe hinzugegeben wurden. Um sicherzustellen, dass es zu keiner unspezifischen Hybridisierung der Sonden an die DNA gekommen ist, wurde parallel mit Negativsonden hybridisiert.

2.5.4 FISH- Sonden

Die „Fluoreszenz In-Situ-Hybridisierung“ verwendet DNA-Sonden (FISH-Sonden), die an passenden Stellen von bestimmten rRNA-Regionen hybridisieren und durch ein angehängtes Fluorochrom mikroskopisch sichtbar gemacht werden können (Cardinale et al. 2008).

Tab. 18: FISH-Sonden (beinhalten Fluorochrome) und ihre Eigenschaften

FISH-Sonden (plus Fluorochrom)	Sequenz (5'-3')	Anregung/Emission (nm)	Ziel	Referenz
EUB338-Cy3	gctgcctcccgtaggagt	548/562	Eubak.	Amann et al. (1990)
ARCH915-FITC	gtgctccccccaattct	490/525	Arc.	Stahl & Amann (1991)
Univ-1390-Cy5	gacggcggtgtgtacaa	650/670	Alle Org.	Zheng et al. (1996)
NONEUB-Cy3/-Cy5/-FITC	actctacgggagcagc	—	Alle Org.	Wallner et al. (1993)

Die in *Tabelle 18* beschriebenen Sonden wurden für die CLSM-Mikroskopie zur Hybridisierung herangezogen. Die „NONEUB“-Sonden mit den Fluorochromen „Cy3“, „Cy5“ und „FITC“ dienten der Negativfärbung (Wallner et al., 1993) und zeigten unter Anregung mit der jeweiligen Wellenlänge keine Fluoreszenz.

2.5.5 CLSM-Aufnahmen

Zusätzlich zur Anregung mit der Fluorochrome-spezifischen Wellenlänge wurden auch Durchlicht- bzw. Hellfeldaufnahmen mit einer Vergrößerung von 400 bzw. 1000 (plus digitaler Vergrößerung) gemacht. Um eine Emission der Fluorochromen zu erreichen, wurden die Proben mit bestimmten Wellenlängen angeregt (vgl. *Tab.18*: „Anregungs- und Emissionswellenlänge der Fluorochrome“). Die Filtereinstellungen wurden den spezifischen Emissionswellenlängen der Fluorochrome angepasst, um eine maximale Signalstärke der Fluorochrome zu erreichen. Zusätzlich zu Hellfeldaufnahmen konnten bis zu drei Sonden gleichzeitig beobachtet werden.

2.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Dieses Kapitel zeigt die Vorgehensweise für die elektronenmikroskopische Untersuchung ausgewählter Fermentationsproben.

2.6.1 Methode der Rasterelektronenmikroskopie

Um Migulatorpartikel mit den Durchmessern von 1,0 mm bis 2,5 mm zu untersuchen, wurde das Rasterelektronenmikroskop (REM) „Zeiss Ultra 55“ verwendet. Die Aufnahmen der biologischen Proben lieferte ein hoch effizienter „In-Lens SE Detektor“ für Sekundärelektronen, welcher einen topographischen Kontrast zeigt (Goldstein et al., 2003). Zusätzliche Aufnahmen konnten mit einem AsB-Detektor für Rückstreuelektronen gemacht werden, was eine Darstellung von Materialunterschieden ermöglicht (Goldstein et al., 2003). Das Mikroskop wurde von Armin Zankel, einem wissenschaftlichen Mitarbeiter am „Institut für Elektronenmikroskopie“ der TU Graz, bedient. Im Fall der SE-Aufnahmen wurde eine Beschleunigungsspannung der Primärelektronen von 5kV und im Falle des AsB-Detektors eine Spannung von 15 kV eingestellt.

2.6.2 Zellfixierung und Dehydrierung der Proben

Die Zellfixierung und Dehydrierung der Proben wurden nach Anleitung bzw. persönlicher Kommunikation mit Dr. Ingolic, Institut für Elektronenmikroskopie (TU Graz), durchgeführt.

Die Migulatorproben mussten vor der Untersuchung in Glutaraldehyd (2,5 % in 0,1 M Phosphatpuffer, pH-Wert 7,4) fixiert, mittels einer Ethanolserie dehydriert und anschließend lyophilisiert (mit Labconco Freeze Dry System Free Zone 4.5, USA) werden. Die Zellfixierung und die Dehydrierung folgten diesen Punkten:

- Mixen der Proben mit eiskaltem 3%igem Glutaraldehyd, pH-Wert 7,4; Inkubation bei 4 °C für mindestens eine Stunde;
- Waschen mit 500 µl Na-Cacodylatpuffer;
- Zentrifugieren der fixierten Proben (5 min, bei 4 °C, 13.000 g) und Abheben des Überstandes;
- Ethanolreihe → 30 % → 50 % → 80 % → 90 % → 100 % für je 15 bzw. 20 Minuten bei 100 % Ethanol;
- 2-mal waschen mit Propylenoxid je 20 min.

Für die Mikroskopie wurden die Proben mit doppelseitigem Carbonband auf einer Aluminiumhalterung fixiert. Den fixierten Proben wurde mittels Hochvakuum-Evaporation ein dünner Carbonfilm auf die Oberfläche „gesputtert“ (aufgetragen).

2.6.3 Aufnahmen

Die Aufnahmen wurden wie in *Kapitel 2.6.1 Methode der Rasterelektronenmikroskopie* mit einem „Zeiss Ultra 55“- Elektronenmikroskop durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung mikrobieller Populationen des anaeroben Grassilageabbaus

Die Ergebnisse der Charakterisierung der mikrobiellen Populationen werden in diesem Kapitel präsentiert.

3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Ganzschlammproben

Zuerst wurde bei allen Proben die klassische Extraktion (auch Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Extraktion genannt) nach Martin-Laurent et al. (2001) angewendet. Falls es jedoch zu einer unzureichenden DNA-Isolierung kam, versuchte man die Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Extraktion (P/C/I) zu wiederholen. War auch das zweite Ergebnis nicht wie erwünscht, wiederholte man die Extraktion mit dem „FastDNA[®] SPIN Kit for Soil“ (MP Biomedicals, Germany). Angemerkt sei hier, dass sich bei manchen Proben eine unzureichende Qualität der Extraktion durch Negativergebnisse der später durchgeführten „Polymerase-chain-reaction“ (PCR) der 16SrRNA Fragmenten zeigte. Mit der Kit-Methode konnte wesentlich mehr DNA erhalten werden, erkennbar durch intensivere und kräftigere „Schmier“ (= isolierte genomische DNA) im Gel. *Abbildung 18* zeigt den direkten Vergleich der zwei Extraktionsmethoden.

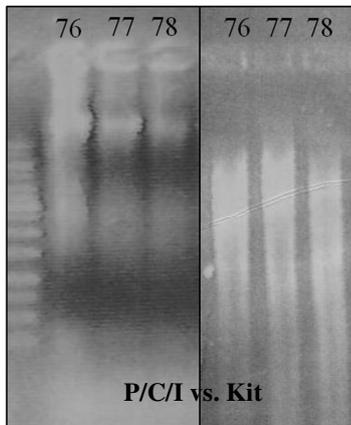


Abb. 16: Vergleich der zwei Extraktionsmethoden- P/C/I-Extraktion vs. „FastDNA® SPIN Kit for Soil“ (MP Biomedicals, Germany) zur Isolierung von gDNA anaerober Populationen aus Fermentationschlamm.

Die isolierte gDNA diente als Template-DNA für die darauffolgende PCR und SSCP-Analyse.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung der 16S rRNA Genfragment-Amplifikate

Der Isolierung von gDNA und der anschließenden Polymerasenkettenreaktion (PCR) folgte die Konzentrationsbestimmung der amplifizierten Genfragmente mittels „NanoDrop 1000“ UV/VIS-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Germany). Die *Tabellen 19* bis *20* zeigen die Konzentrationen der aufgereinigten PCR-Produkte. Komplette Probenbezeichnung siehe *Kapitel 2.2.2, Tabelle 2*.

Tab. 19: Bakterielle PCR-Amplifikatkonzentrationen der Proben 58-27 und 31-78

PCR-Amplifikatkonzentrationen für Bakterien SSCP 1				PCR-Amplifikatkonzentrationen für Bakterien SSCP 2			
Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)
58	98,73	6	79,74	31	115,48	54	109,07
59	118,21	10	81,55	32	102,14	55	128,91
60	93,22	11	73,09	33	100,61	56	96,14
61	102,25	12	89,03	37	101,24	57	112,13
62	99,98	13	92,88	38	95,78	70	116,28
64	96,23	14	91,18	39	95,07	71	109,36
65	81,96	15	91,24	46	84,15	72	114,78
66	78,82	19	91,09	47	98,39	76	109,88
1	86,1	20	89,59	48	89,95	77	110,77
2	79,84	21	92,03	52	100,19	78	98,81
3	93,21	25	77,36	53	97,79		
4	98,17	26	97,34				
5	81,54	27	105,17				

Tab. 20: Archaeale PCR-Amplifikatkonzentrationen der Proben 58-27 und 31-78

PCR-Amplifikatkonzentrationen für Archaeen SSCP 1				PCR-Amplifikatkonzentrationen für Archaeen SSCP 2			
Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)	Probe	Konzentration (ng/μl)
58	108,9	6	113	31	85,85	54	82,12
59	120,01	10	104,56	32	99,99	55	76,84
60	128,97	11	116,14	33	84,66	56	93,68
61	129,8	12	113,13	37	80,71	57	90,76
62	115,52	13	108,94	38	118,28	70	64,4
64	136,84	14	118,52	39	88,69	71	80,72
65	124,84	15	109,2	46	82,16	72	88,13
66	118,84	19	106,57	47	67,01	76	73,86
1	116,48	20	114,11	48	81,85	77	77,51
2	117,59	21	114,23	52	108,06	78	76,7
3	129,35	25	107,51	53	92,64		
4	111,52	26	100,79				
5	104,25	27	115,03				

3.1.3 Analyse der bakteriellen und archaealen Gemeinschaft (SSCP-Analyse)

Die *Abbildungen 17* und *18* zeigen SSCP-Gele archaealer bzw. bakterieller 16S rRNA-Genfragmente.

Es wurden die Proben der Bioreaktoren I1, I2 und I3 nach aufsteigenden Versuchstagen auf das Gel gebracht. Die blaue Linie der Bilder trennt die Versuchstage (d22 bis d353) und die drei Bioreaktoren voneinander. Jede Bande stellt im Idealfall ein bestimmtes Bakterium an einem Versuchstag und einem Bioreaktor dar. *Abbildung 17* zeigt die SSCP-Gele bakterieller 16S-rRNA Genfragmente von Tag 22 bis Tag 236 und von Tag 250 bis Tag 553.

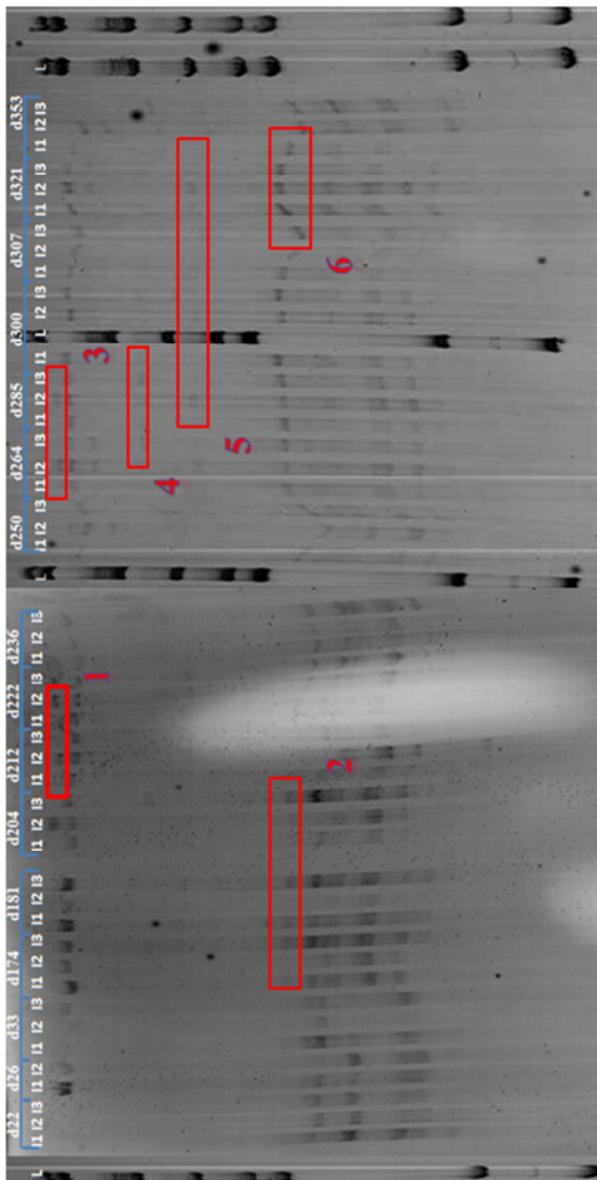


Abb. 17: SSCP-Gele-Bakterien

Die roten Markierungen bzw. Kästchen in den *Abbildungen 17* und *18* heben jene Banden hervor, welche kein durchgehendes Auftreten über den gesamten Fermentationszeitraum zeigten. Die Bande der *Markierung 1* trat erst ab Tag 204 und vorerst nur in Bioreaktor I2 auf, später an Tag 222 war sie in allen drei Bioreaktoren feststellbar. Auch während der stabilen Phase des Fermentationslaufs (Tag 250 bis 353) zeigte sie sich nur in Reaktor I2 im Zeitraum der Versuchstage 250 bis 285 (*Markierung 3*, *Abbildung 17*). Die Kästchen 2 und 6 kennzeichnen die Bande, welche innerhalb der „Anlaufphase“ nur an den Tagen 173 bis 222 auftraten, sich jedoch in der stabilen Phase über den ganzen Fermentationslauf präsentierten. *Markierung 4* weist auf die Banden hin, die sporadisch in Bioreaktor I3 auftraten (Tage 264 bis 300 und Tag 353). Eine auch sehr selten in Erscheinung getretene Bande zeigt *Markierung 5* (Tag 285 und Tage 321 bis 353).

Abbildung 18 zeigt den Verlauf archaealer DNA-Banden über den gesamten Fermentationslauf:

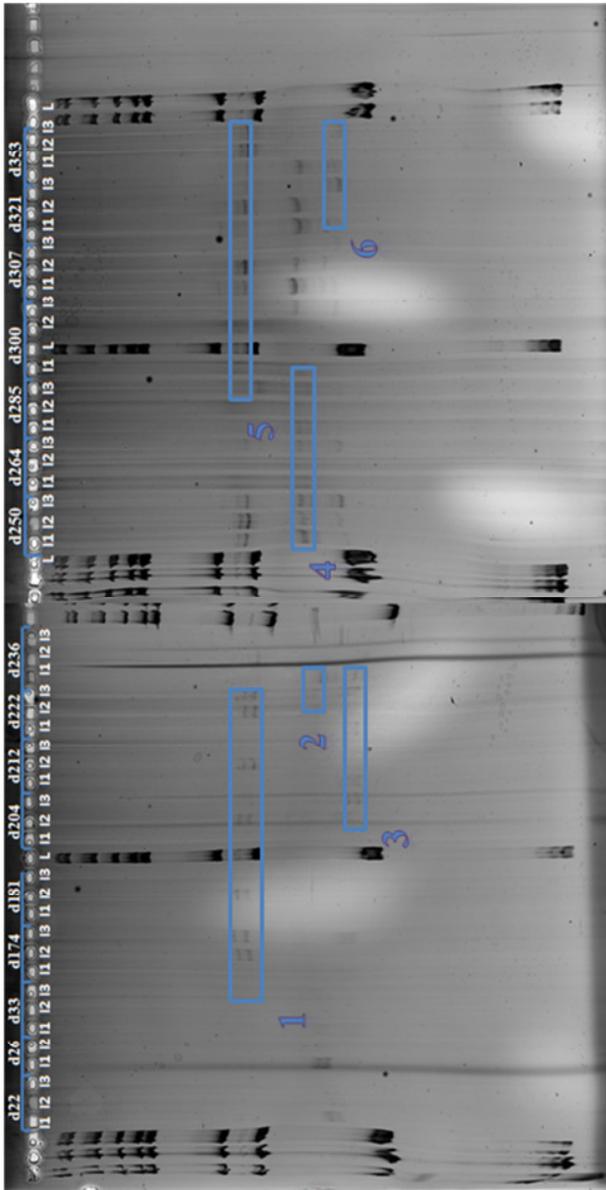


Abb. 18: SSCP-Gele Archaeen

Im Vergleich zu den ersten beiden SSCP- Gelen (Abbildung 17) sind in Abbildung 18 weniger Banden sichtbar. Dies lässt auf eine geringere Biodiversität in Bezug auf Archaeen schließen. Die blauen Markierungen 1 und 5 heben jeweils zwei Banden hervor, welche an den Tagen 174 bis 222 durchgehend in Bioreaktor I2 auftraten, in Bioreaktor I3 jedoch nur an den Tagen 174 und 222. In der stabilen Phase zeigten sich die zwei Banden jeweils mit unterschiedlicher Intensität an Versuchstag 250 und an den Versuchstagen 307 bis 353 in allen drei Bioreaktoren. Markierung 3 und 4 präsentieren zwei Banden, welche erst in der stabilen Phase ausgeprägter in Erscheinung traten. Ähnlich verhielt es sich mit den zwei Banden innerhalb der Markierungen 2 und 6, welche erst gegen Ende der Anlaufphase auftraten, dann aber, wenn auch mit unterschiedlichen Intensitäten, während der ganzen stabilen Phase.

Ergänzung zu den Ergebnissen: Nachfolgende Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Untersuchung der bakteriellen Genfragmente. Die Untersuchung der archaealen Gemeinschaft übernahm der Projektpartner LfL-Bayern. Aus diesem Grund werden hier im Anschluss nur die Ergebnisse der Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft aufgezeigt.

3.2 Gruppenanalyse der bakteriellen Gemeinschaft

Nach dem Einscannen der Gele wurde eine „Cluster-Analyse“ mit dem Programm „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) durchgeführt.

Für jeden Bioreaktor wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt und mit den prozessrelevanten Parametern an den jeweiligen Versuchstagen (d) verglichen. Die senkrechten, gestrichelten Pfeile zeigen die Prozentanzahl der *Pearson*-Korrelation und die waagrechten Pfeile unterteilen die Cluster.

3.2.1 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor II

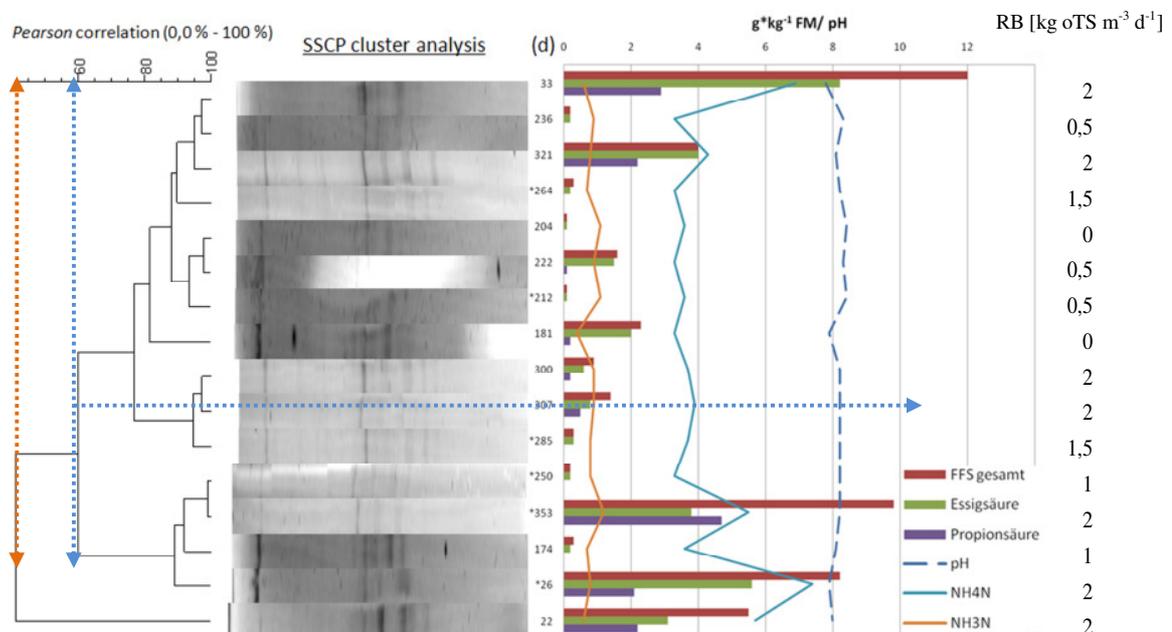


Abb. 19: Cluster-Analyse des Bioreaktors II und die dazugehörigen Prozessparameter

Nach der *Pearson*-Korrelation mit „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) zeigen sich zwei Cluster mit einer sehr geringen Ähnlichkeit von 40%, wobei ein Cluster (siehe *Abbildung 19*) aus DNA-Banden eines Versuchstages besteht. Der erste Cluster lässt sich in zwei weitere Untercluster unterteilen, die sich zu 60% ähneln. Auffällig ist, dass Versuchstage mit sehr unterschiedlichen Prozessparametern eine sehr enge Korrelation besitzen, wie z.B. Tag 250 und Tag 353. Die Prozessparameter beider Tage waren sehr divers, so zeigte Tag 353 eine Konzentration von freien Fettsäuren von knapp $10 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$, wobei an Versuchstag 250 nur ca. $0,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$ gemessen wurden. Ähnlich verhielt es sich mit den Fettsäurekonzentrationen an den Versuchstagen 33 ($12 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$) und 236 (ca. $0,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$). Mit einer Korrelation von 95% wiesen die knapp aufeinander folgenden Versuchstage 300 und 307 eine hohe Ähnlichkeit auf. Jene Tage waren auch durch leicht variierende Fettsäurekonzentrationen von 1 bis $1,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$ gekennzeichnet. Diese zwei Tage bilden die einzigen Versuchstage bei Bioreaktor II mit ähnlichem Bandenmuster und ähnlichen Prozessparametern. Die Ammoniumkonzentration zeigte bei Versuchstagen mit hohen Fettsäurekonzentrationen ebenso erhöhte Werte von ca. $4,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$ bis $7,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$. Die Konzentration an Ammoniak erreichte maximale Werte über $1 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$.

3.2.2 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor I2

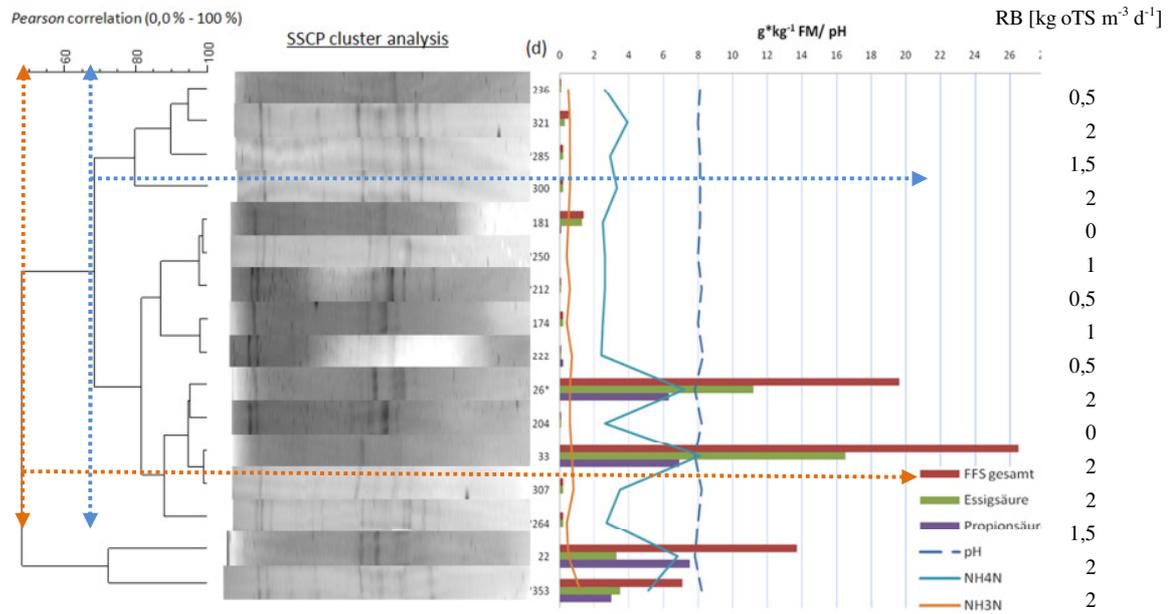


Abb. 20: Cluster-Analyse des Bioreaktors I2 und die dazugehörigen Prozessparameter

Bei 50 % *Pearson*-Korrelation bildeten sich zwei Cluster (*Abbildung 20*), wobei ein Cluster aus nur zwei Versuchstagen (22 und 353) mit einer Korrelation von ca. 70 % besteht. Diese zwei Versuchstage zeigten eine sehr ähnliche Konzentration an Essigsäure ($> 3 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$) und Raumbelastung ($2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), jedoch unterschiedliche Werte an Propionsäure. Eine sehr enge Korrelation (95 %) wiesen die Versuchstage 174 und 222 auf, außerdem zeigten sie sehr ähnliche Prozessparameter. Wie auch schon bei Bioreaktor I1 präsentiert sich hier eine Gruppierung von Versuchstagen mit hoher Korrelation, aber unterschiedlichen Prozessparametern, z.B. Versuchstag 33 und Versuchstag 307 und Tag 26 und 204. Im Unterschied zu I1 waren mehrere Tage durch niedrige Prozessparameter gekennzeichnet (in *Abbildung 22*: Tag 236 und Tag 222). Hier erreichten die freien Fettsäuren nur Konzentrationen von max. $1,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$. Hohe Fettsäurekonzentrationen korrelierten an den Versuchstagen 22, 26, 33 und 353 mit einer Raumbelastung von $2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Die Ammoniumkonzentration variierte während des Fermentationslaufs von $2,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$ bis

8 g kg⁻¹ FM, wobei die Spitzen an den Tagen mit hohen Fettsäurekonzentrationen lagen (Tage 22, 26 und 33). Die Ammoniakkonzentration war über den gesamten Fermentationslauf sehr niedrig und erreichte max. 1 g kg⁻¹ FM.

3.2.3 Cluster-Analyse der Bakterien aus Bioreaktor I3

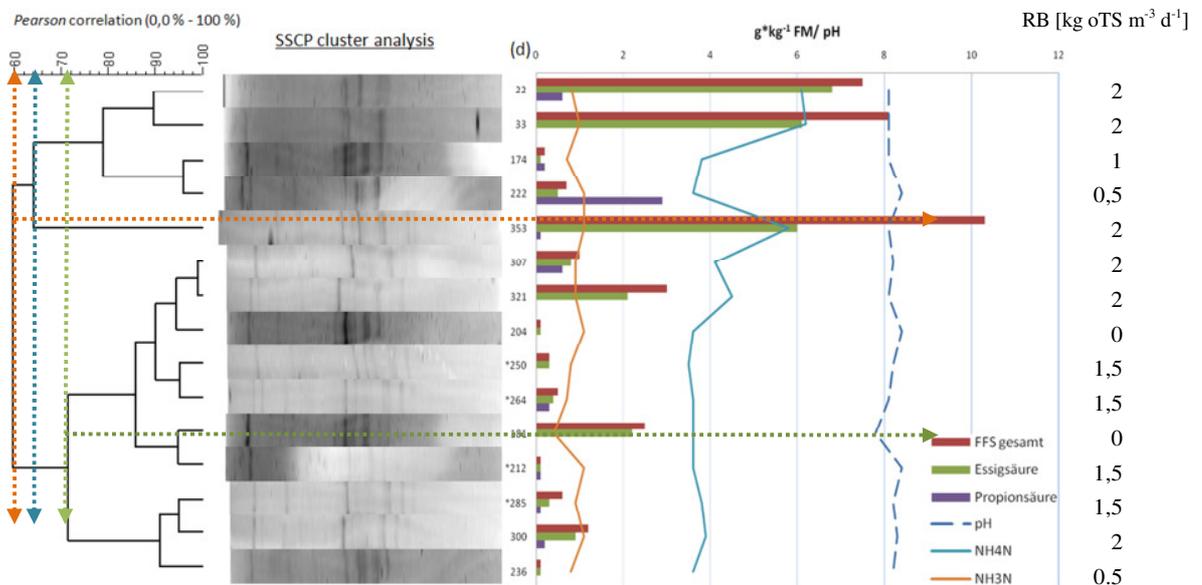


Abb. 21: Cluster-Analyse des Bioreaktors I3 mit Labormesswerten und die dazugehörigen Prozessparameter

Bei Bioreaktor I3 erfolgte eine Trennung in zwei Cluster bei 60 % Korrelation (Abbildung 21). Die Cluster-Analyse zeigte hier im Gegensatz zu den Bioreaktoren I1 und I2 einen Subcluster bei 64 %, welcher aus Versuchstagen mit den höchsten Fettsäurekonzentrationen und der maximalen Raumbelastung zusammengesetzt ist. Dabei erreichte vor allem die Konzentration der Essigsäure an Versuchstag 353 den höchsten Wert mit über 10 g kg⁻¹ FM. Dieser Versuchstag korrelierte am wenigsten mit den übrigen Tagen des Subclusters. Ein sehr ähnliches Bandenmuster und eine Korrelation von 90 % präsentierten die Versuchstage 22 und

33. Beide Tage wiesen nur geringe Unterschiede in ihren Fettsäuremustern und in der Ammoniumkonzentration ($> 6 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$) auf. Der zweite Subcluster entstand bei einer Korrelation von 72 % und beinhaltet die meisten Versuchstage mit relativ niedrigen Prozessparametern. Sogenannte „Ausreißer“ waren dabei Tag 181 und Tag 321 mit einer Konzentration der freien Fettsäuren von 2 bis $3 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$. Obwohl an beiden Tagen ähnliche Fettsäurekonzentrationen auftraten, erreichte die Raumbelastung Werte von $0 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ an Tag 181 und $2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ an Tag 321 und war damit sehr divers. Insgesamt betrachtet zeigte sich bei Bioreaktor I3, dass Versuchstage mit ähnlichen Prozessparametern hohe Korrelationen miteinander (z.B. die Tage 285 und 300 oder 250 und 264) aufweisen. Mit der Ammoniumkonzentration verhielt es sich gleich wie bei den zwei anderen Bioreaktoren - sie stieg mit steigender Fettsäurekonzentration. Wie bei den Bioreaktoren I1 und I2 war die Ammoniumkonzentration in Bioreaktor I3 bei ca. $0,5\text{--}1 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$.

3.3 Canonische Korrespondenzanalyse

Das Programm „Canoco for Windows-Vers. 4.5“ (Biometris, Netherlands) ermöglichte eine „Canonische Korrespondenzanalyse“. Dabei handelt es sich um eine multivariate Methode, mit der man das Auftreten von bestimmten Spezies und den Einfluss ihrer Umwelt auf die Spezies ermitteln bzw. interpretieren kann. Mit dem Zusatzprogramm „CanoDraw“ (Biometris, Netherlands) wurden die Daten graphisch dargestellt (ter Braak und Verdonschot, 1995).

Abbildung 22 zeigt die SSCP-Gele der Anlaufphase (d22 bis d236) und der stabilen Phase (d250 bis d353) sowie die zur Sequenzierung eluierten bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente. Die Buchstaben „A“ bis „N“ kennzeichnen die Banden, die innerhalb beider Gele an der gleichen Position vorkommen, unabhängig davon, ob sie durchgehend oder nur an einzelnen Versuchstagen auftreten. Diese Banden bzw. ihre relativen Intensitäten waren essentiell für die

„Canonische Korrespondenzanalyse“. Die Bandenintensitäten konnten im Cluster-Analyse-Programm „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) angezeigt werden und für „Canoco“ eingesetzt werden. Laut den Laborergebnissen der LfL-Bayern war die Anlaufphase durch schwankende Prozessparameter gekennzeichnet. Die Prozessparameter waren die Essigsäure, die Propionsäure, der Ammoniak und die Raumbelastung.

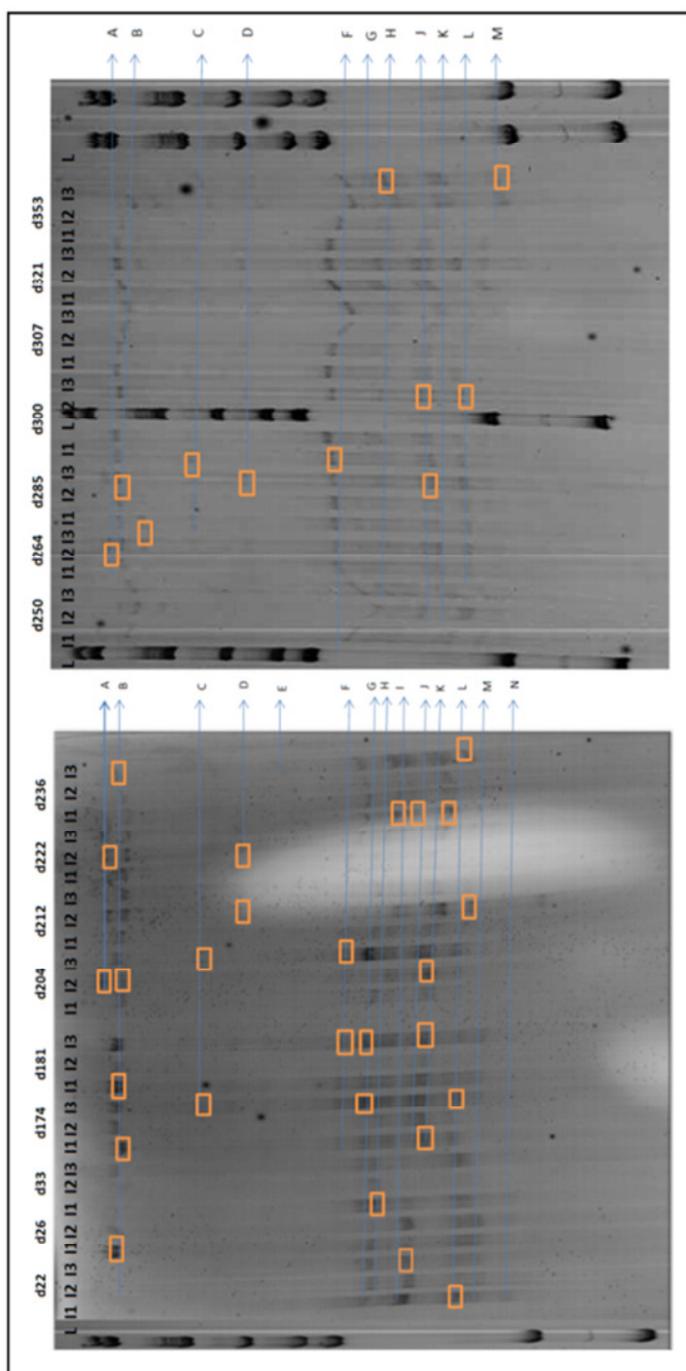


Abb. 22: SSCP-Gele 1 und 2 der Bioreaktoren II, I2 und I3 (Versuchstage d22–d353) mit den eluierten Banden (orange Markierung) und der Kennzeichnung der Banden (A–M)

Tabelle 21 gibt einen Überblick über die Banden, und zwar zu welchem Zeitpunkt sie während des Fermentationslaufs auftraten, in welchem Bioreaktor und in welcher Phase des Fermentationslaufs sie gefunden wurden. Zusätzlich gibt die Tabelle die positiven Sequenzierergebnisse inklusive Angabe der Spezies, der Ordnung und der „Accessionnummer“ der *NCBI*-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) an. Der rechte Teil der Tabelle zeigt, mit welchen Parameter die Bakterien in den jeweiligen Phasen korrelierten (Anlaufphase versus stabile Phase). Dies führte zur Vergleichbarkeit der Bioreaktoren untereinander.

3.3.1 Besonderheiten des Fermentationslaufes

An Tag 22 stellte die LfL-Bayern fest, dass es zu einem Anstieg der freien Fettsäuren kam: So waren die freien Fettsäuren bei Bioreaktor I2 mit $13,7 \text{ g kg}^{-1}$ FM doppelt so hoch wie bei den Bioreaktoren I1 und I3. Die Propionsäurekonzentration des Bioreaktors I2 war mit $7,5 \text{ g kg}^{-1}$ FM doppelt so hoch wie die Konzentration der Essigsäure. Auch kam es zu einem Rückgang von Ammoniak von ca. 1200 mg l^{-1} auf ca. 800 mg l^{-1} . Der Methangehalt sank insgesamt von 55 Volumenprozent (Vol.-%) auf ca. 50 Volumenprozent (Vol.-%). Anders war es am Versuchstag 26, hier ergab die Messung des Methangehalts für Bioreaktor I1 noch 50 Vol.-%, bei I2 und I3 sank der Methangehalt knapp unter 50 Vol.-%. Am Tag 33 des Versuches war das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure innerhalb aller Bioreaktoren bei einem Verhältnis von 2 : 1. I3 erreichte einen Methangehalt von über 50 Vol.-%, I2 lag lediglich bei 42 Vol.-% und I1 zeigte einen Methangehalt von ca. 49 %. An Tag 174 hatten alle Bioreaktoren gemeinsam, dass Propionsäure nur in Spuren nachzuweisen war und die Ammoniakkonzentration großen Schwankungen unterlag. Die Labormessungen ergaben an Tag 181 einen Methangehalt bei I2 knapp unter 50 Vol.-% und bei I1 und I3 unter 45 Vol.-%. Die Essigsäurekonzentration stieg insgesamt an und erreichte Werte von 1200 mg l^{-1} bis 2000 mg l^{-1} , während die Ammoniakkonzentration mit ca. 400 mg l^{-1} auf dem niedrigsten Stand war. An Tag 188 wiederum sank die Essigsäure auf eine Konzentration von unter 100 mg l^{-1} und Propionsäure war nur in Spuren festzustellen. Auffällig an Tag 204 war, dass die Ammoniakkonzentration bei Bioreaktor I2 mit 600 mg l^{-1} knapp die Hälfte der Ammoniakkonzentrationen von I1 und I3 war. Gleichzeitig sank der Gesamtgasertrag, der Methangehalt jedoch stieg bei allen Bioreaktoren auf ca. 58 Vol.-%. Dieser Trend kehrte sich an Tag 212 um, d.h. der Gasertrag stieg und der Methangehalt sank. Der Methangehalt an Tag 222 von I1 sank kurz unter den von I2 und I3. Der Methangehalt von I1 erholte sich in den darauffolgenden Tagen und ab Versuchstag 236 war der Methangehalt bei allen drei Bioreaktoren knapp unter 60 Vol.-%. Ab diesem Zeitpunkt konnte man von einem stabilen Prozess mit einem Methangehalt von über 50 Vol.-% bei I1, I2 und I3 sprechen. Die vorhergehende Phase (bis Tag 236) wurde als Anlaufphase definiert, welche durch

schwankende Prozessparameter und unterschiedlich hohe Methanausbeuten gekennzeichnet war. Die Bioreaktoren I2 und I3 hatten Migulatorpartikel als Additiv in der Fermentationsmasse. Bioreaktor I1 diente als Kontrolle und wurde ohne Migulatorpartikel gelaufen.

Ein Beispiel für schwankende Prozessbedingungen (hier die Ammoniakkonzentration) zeigt die von der LfL-Bayern erstellte Grafik (Abbildung 23) in der die Konzentration an Ammonium bis Versuchstag 33 auf maximal 8000 mg l⁻¹ anstieg und danach wieder auf maximal ca. 3600 mg l⁻¹ sank (mit Unterschieden zwischen den Bioreaktoren):

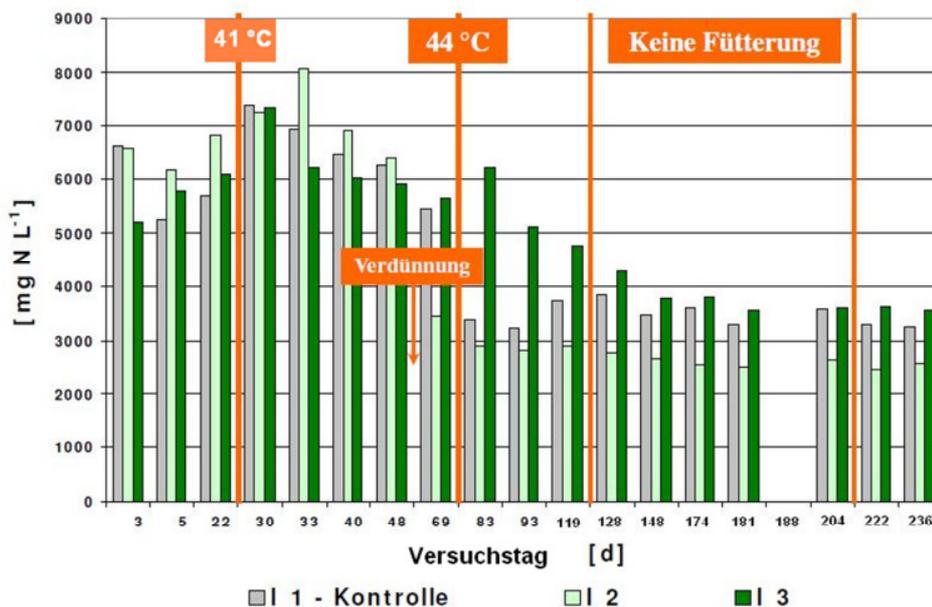


Abb. 23: Veränderung der Ammoniumkonzentration der Reaktoren I1, I2 und I3 innerhalb des Fermentationszeitraumes von Tag 0 bis Tag 236 (verändert nach Andrade und Leubhn, 2009)

Die folgenden Korrespondenzanalysen werden für jeden Bioreaktor und nach Phasen getrennt aufgezeigt:

Die Anlaufphase umfasste die Versuchstage 22, 26, 33, 174, 181, 204, 212 und 236. Die stabile Phase beinhaltete die Versuchstage 250, 264, 285, 300, 307, 321 und 353.

Die untersuchten Prozessparameter waren *Essigsäure (AA)*, *Propionsäure (PA)*, *Ammoniakstickstoff (NH₃)* und *Raumbelastung (VLR)*.

Die Konzentrationsbereiche der Prozessparameter zeigt *Tabelle 22*:

Tab. 22: Konzentrationsbereiche der Prozessparameter je Bioreaktor und Fermentationsphase

Konzentrationsbereiche der Prozessparameter					
Bioreaktor	Phase*	Essigsäure (AA)	Propionsäure (PA)	Ammoniak (NH ₃)	Raumbelastung (VLR)
		[g kg ⁻¹ FM]	[g kg ⁻¹ FM]	[g kg ⁻¹ FM]	[kg ots m ⁻³ d ⁻¹]
I1	A	0,1-8,2	0,0-2,9	0,4-1,1	0,0-2,0
	S	0,2-3,8	0,0-4,7	0,7-1,2	1,0-2,0
I2	A	0,1-16,5	0,0-7,7	0,4-0,7	0,5-2,0
	S	0,0-3,5	0,0-3,0	0,4-1,2	1,0-2,0
I3	A	0,1-6,8	0,0-2,9	0,8-1,1	0,0-2,0
	S	0,3-6,0	0,0-0,6	0,4-1,1	1,0-2,0

* A = Anlaufphase; S = stabile Phase

Die Korrelation der Bandenintensitäten und der Prozessparameter wird in den *Abbildungen 24* bis *29* dargestellt. Je mehr eine Bande (Spezies) mit einem Prozessparameter korreliert, desto näher befindet sie sich an der Ordinate eines Prozessparameters.

3.3.2 Bioreaktor I1 (Kontrolle) -Anlaufphase

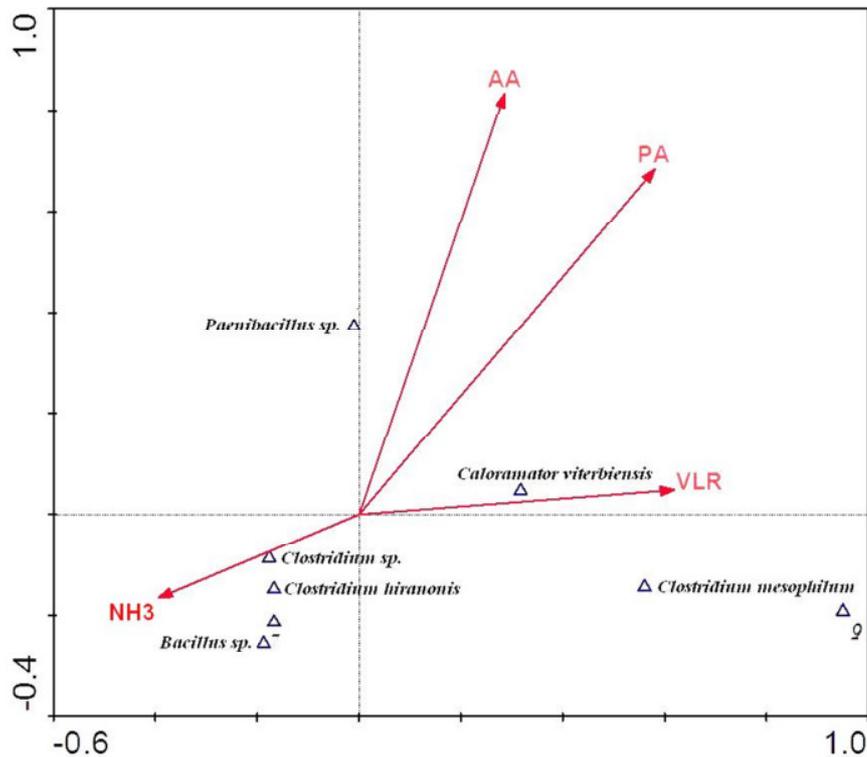


Abb. 24: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I1- „Anlaufphase“; P- value signifikant ($\leq 0,05$); AA: 0,1-8,2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FM; PA:0,0-2,9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FM; NH₃ (=NH₃): 0,4-1,1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FM; VLR: 0,0-2,0 kg ots m^{-3} d^{-1} .

Abbildung 24 zeigt auf, dass die bakteriellen Spezies *Clostridium sp.*, *Clostridium hiranonis*, *Bacillus sp.* und auch Spezies 7 (kein Sequenzierergebnis) von der ansteigenden Konzentration an Ammoniak (NH₃) beeinflusst wurden und sich deshalb in der Nähe der zugehörigen Ordinate sammeln. *Caloramator viterbiensis* korrelierte mit der Raumbelastung („Volumetric loading rate“ = VLR) und *Paenibacillus sp.* trat in Abhängigkeit von Essigsäure (AA) auf. Trotz des größeren Abstandes zur Ordinate dürfte *Clostridium mesophilum* mit der Raumbelastung korrelieren bzw. durch sie beeinflusst worden sein. Dies wird durch die Nähe zur Ordinate der Raumbelastung (VLR) deutlich. Bande 9 konnte nicht zugeordnet werden. Bis auf *Bacillus sp.* und *Paenibacillus sp.* (aus der Ordnung der *Bacillales*) sind die übrigen

Spezies bzw. Gattungen der Ordnung *Clostridiales* zuzuordnen. Beide Ordnungen gehören dem Phylum *Firmicutes* an. Alle aufgezeigten Korrelationsverteilungen sind signifikant (p -Wert $< 0,05$).

3.3.3 Bioreaktor II (Kontrolle) - *Stabile Phase*

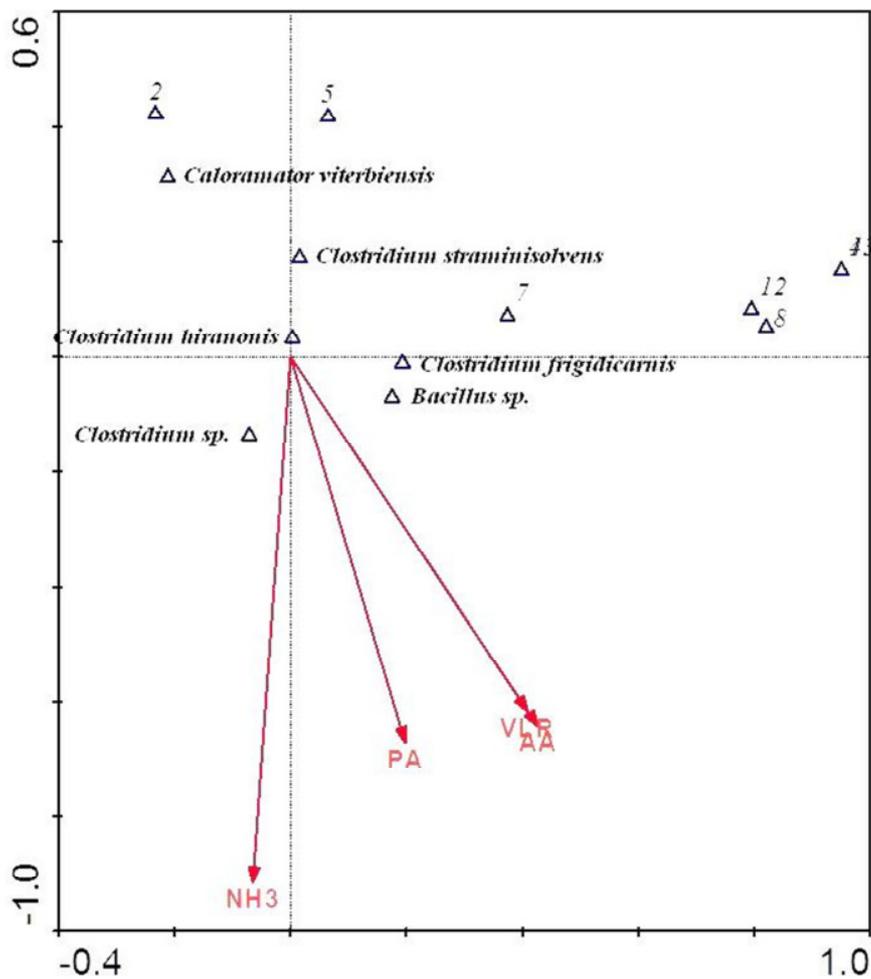


Abb. 25: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors II-stabile Phase ; AA: 0,2-3,8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ FM; PA: 0,0-4,7; NH_3 ($=\text{NH}_3$): 0,7-1,2; VLR: 1,0-2,0 [$\text{kg ods m}^{-3} \text{d}^{-1}$].

Abbildung 25 zeigt, dass nur *Clostridium sp.* mit der ansteigenden Ammoniakkonzentration und *Bacillus sp.* mit der ansteigenden Raumbelastung und der Essigsäurekonzentration korrelierten. Die hier sequenzierten Mikroorganismen werden dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet, wobei hier *Bacillus sp.* als einziger Vertreter der Ordnung *Bacillales* auftrat. Gefundene Vertreter der Ordnung *Clostridiales* entsprechen den Gattungen *Clostridium* und *Caloramator*.

3.3.4 Bioreaktor I2 (Migulator-Additiv) - Anlaufphase

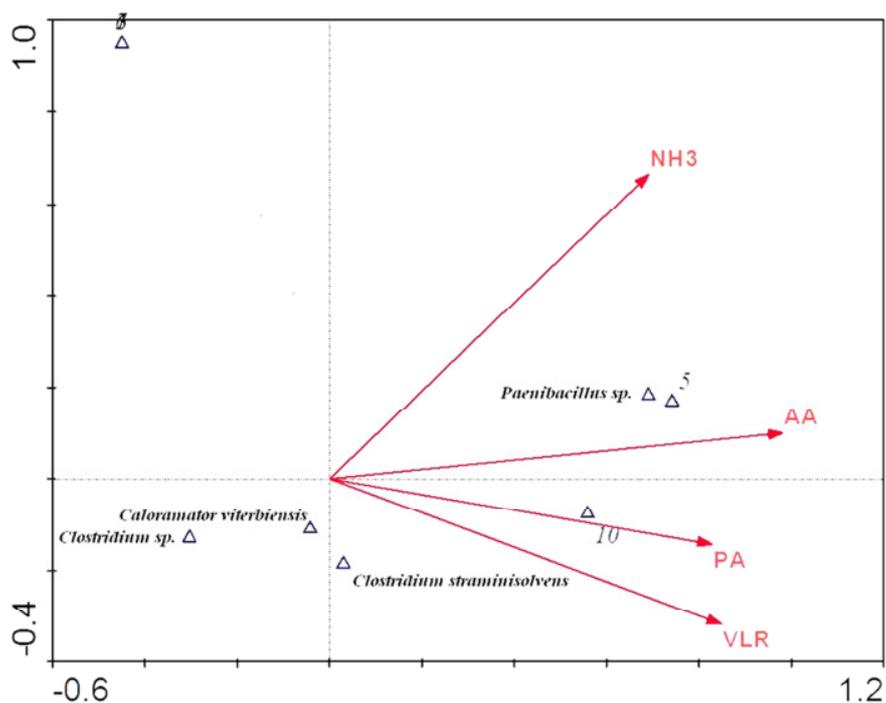


Abb. 26: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I2-„Anlaufphase“: AA: 0,1-16,5 g*kg⁻¹ FM; PA: 0,0-7,7 g*kg⁻¹ FM; NH₃(=NH₃): 0,4-0,7 g*kg⁻¹ FM; VLR: 0,5-2,0 [kg ods m⁻³ d⁻¹].

In der Anlaufphase des Bioreaktors I2 (siehe *Abbildung 26*) korrelierten sowohl die Gattung *Paenibacillus sp.* als auch die Bande 5 (nicht sequenziert) mit der Konzentration an Essigsäure

(AA). Die Bakterien *Clostridium sp.* und *Caloramator viterbiensis* sind keinem Prozessparameter zuzuordnen. *Clostridium straminisolvens* trat in Abhängigkeit von der Raumbelastung auf. Bande 10 (nicht sequenziert) trat in Korrelation mit der Konzentration an Propionsäure auf. Bande 6 und Bande 7 korrelierten mit keinem der Prozessparameter. Hier, in der stabilen Phase, traten zwar *Carboxydocella sp.* und *Clostridium hiranonis* auf, konnten aber nicht zugeordnet werden.

3.3.5 Bioreaktor I2 (Migulator-Additiv) - Stabile Phase

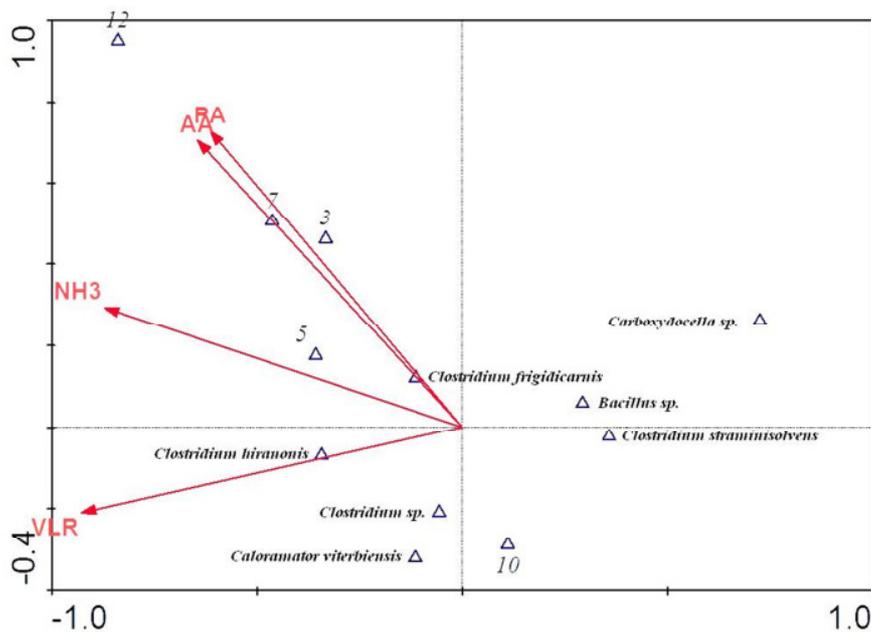


Abb. 27: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I2- „Stabile Phase“ = AA: 0,0-3,5 g*kg⁻¹ FM; PA: 0,0-3,0 g*kg⁻¹ FM; NH₃(=NH₃): 0,4-1,2 g*kg⁻¹ FM; VLR: 1,0-2,0[kg ods m⁻³ d⁻¹].

In der stabilen Phase des Fermentationsverlaufes des Bioreaktors I2 (Abbildung 27) nahmen folgende Parameter bzw. ihre ansteigenden Konzentrationen Einfluss auf mehrere Banden: So korrelierten Spezies 7, Spezies 3 und das Bakterium *Clostridium frigidicarnis* mit den

steigenden Konzentrationen an Essig- und Propionsäure. Spezies 5 korrelierte mit Ammoniak und *Clostridium hiranonis* mit der erhöhten Raumbelastung. Bande 10 (nicht sequenziert), *Carboxydocella sp.*, *Clostridium sp.*, *Clostridium straminisolvens*, *Caloramator viterbiensis* und *Bacillus sp.* korrelierten mit keinem der Prozessparameter eindeutig.

3.3.6 Bioreaktor I3 (Migulator-Additiv) – Anlaufphase

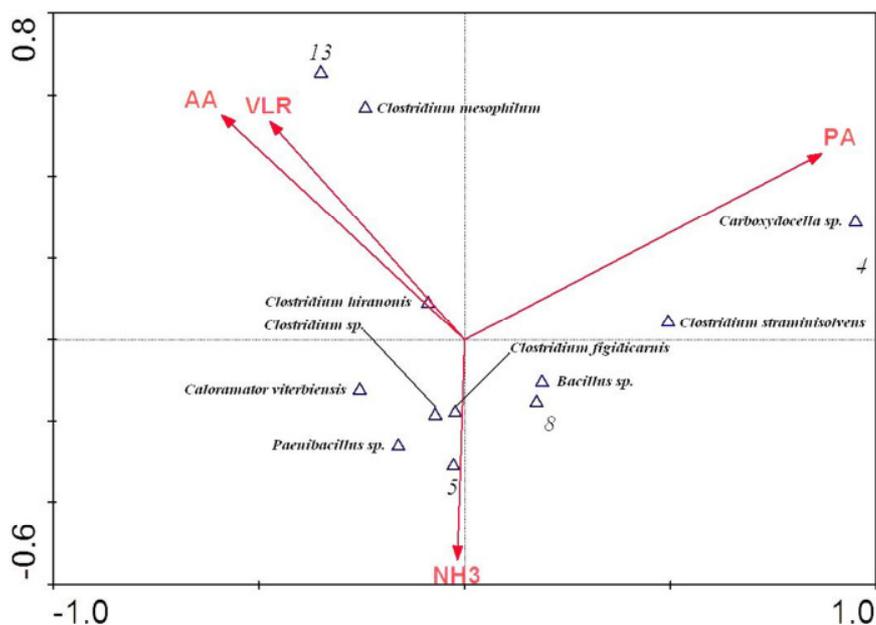


Abb. 28: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I3- „Anlaufphase“ (AA=Essigsäure, PA= Propionsäure, NH₃= Ammoniak, VLR= Raumbelastung); AA: 0,1-6,8 g*kg⁻¹ FM; PA: 0,0-2,9 g*kg⁻¹ FM; NH₃ (=NH₃): 0,8-1,1 g*kg⁻¹ FM; 0,0-2,0 [kg ods m⁻³ d⁻¹].

Abbildung 28 zeigt eine relativ breite Verteilung der Organismen über den gesamten Graphen. Hierbei korrelierten *Clostridium sp.*, *Clostridium frigidicarnis*, *Paenibacillus sp.* mit der ansteigenden Ammoniakkonzentration, die Bande 8 (nicht sequenziert) und *Bacillus sp.* traten in Abhängigkeit von der Propionsäurekonzentration auf. *Clostridium straminisolvens*, *Carboxydocella sp.* und Bande 4 (nicht sequenziert) verteilten sich um die Ordinate der

Propionsäure. Das Bakterium *Clostridium hiranonis* ordnete sich in Abhängigkeit von der Konzentration an Essigsäure und der Raumbelastung zwischen den zugehörigen Ordinaten an. Bande 13 (nicht sequenziert) und *Clostridium mesophilum* korrelierten mit hoher Raumbelastung.

3.3.7 Bioreaktor I3 (Migulator-Additiv) - Stabile Phase

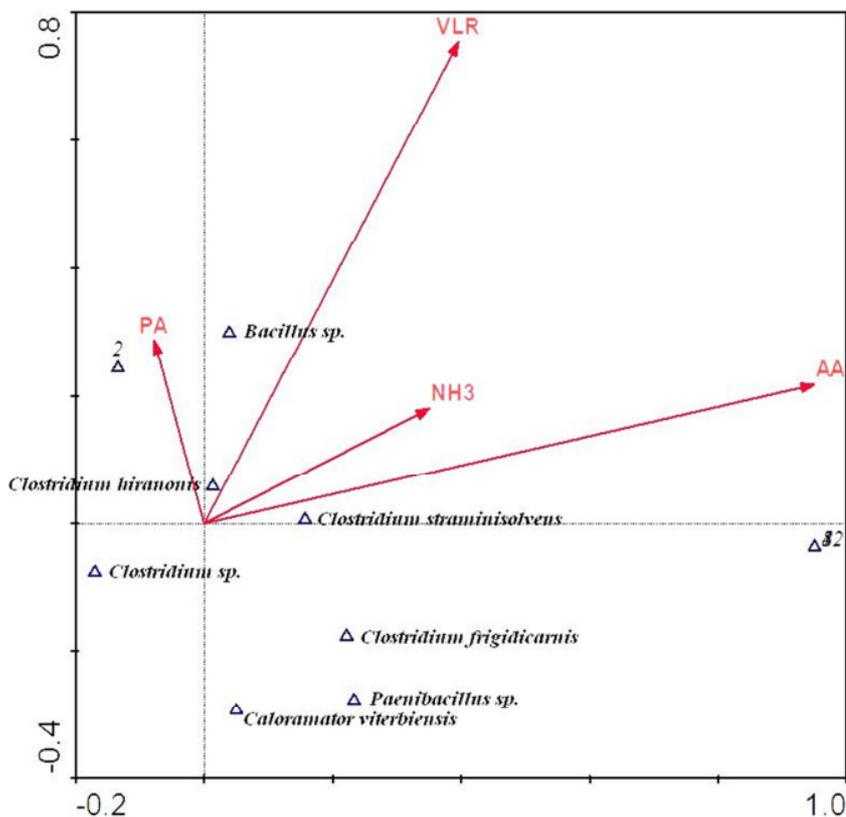


Abb. 29: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I3- „Stabile Phase“ ; AA: 0,3-6,0 g*kg⁻¹ FM; PA: 0,0-0,6 g*kg⁻¹ FM; NH₃ (=NH₃): 0,4-1,1 g*kg⁻¹ FM; VLR: 1,0-2,0 [kg ods m⁻³ d⁻¹].

Wie in der Anlaufphase des Bioreaktors I3 so ist der Graph auch in der stabilen Phase (Abbildung 29) durch eine breite Verteilung der Banden zu den Prozessparametern gekennzeichnet. So korrelierte Bande 2 (nicht sequenziert) mit der Propionsäure. *Clostridium*

hiranonis und *Bacillus sp.* korrelierten sowohl mit der Propionsäure als auch mit der Raumbelastung. *Clostridium straminisolvens* trat in Abhängigkeit von der Konzentration an Essigsäure auf. Die im unteren Drittel des Graphen sichtbaren Bakterien *Clostridium sp.*, *Clostridium frigidicarnis*, *Paenibacillus sp.* und *Caloramator viterbiensis* konnten keinem Prozessparameter zugeordnet werden.

3.3.8 Signifikanzprüfung der Canonischen Korrespondenzanalyse

Tab. 23: *p*-Werte der Bioreaktoren I1, I2, I3

p-Wert ($\leq 0,05$)	Bioreaktor I1	Bioreaktor I2	Bioreaktor I3
Anlaufphase (d22 - d236)	0,0140	0,6543	0,5035
Stabile Phase (d250 - d353)	0,1429	0,2368	0,1199

Tabelle 23 zeigt, dass nur bei Bioreaktor I1 die Populationsverteilungen in Abhängigkeit von den Prozessparametern signifikant (p -Wert = 0,0140) waren. Die Anlaufphase des Bioreaktors I1 war durch eine variierende Raumbelastung und schwankende Konzentrationen an freien Fettsäuren und Ammoniak gekennzeichnet. Bei Bioreaktor I1 ist zu beachten, dass es sich um die Kontrolle ohne Migulatorpartikel handelte.

Die Berechnung der *p*-Werte für die Bioreaktoren I2 und I3, welche mit Migulatorzusatz liefen, ergab keine Signifikanz.

3.4 Mikroskopische Identifizierung prozessbestimmender Mikroorganismen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der mikroskopischen Untersuchung von prozessbestimmenden Mikroorganismen.

3.4.1 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Abbildung 30 zeigt vier Aufnahmen von Migulatorpartikeln bzw. Flocken von Migulatorpartikeln mit organischem Material. Die Hellfeldaufnahmen zeigen erst bei einer 1000-fachen Vergrößerung des Bildes (siehe *Aufnahme 2*) eine ungefähre Definition der Flocken. Eine relevante Interpretation mikroskopischer Bilder lässt sich erst mittels CLSM-Aufnahmen erzielen, da erst durch die Fluoreszenzfärbung von Mikroorganismen und CLSM-Technik die Bildinformation richtig zu verstehen ist. So zeigen *Aufnahme 3* und *Aufnahme 4* an der Oberfläche der Migulatorflocken bzw. in deren Inneren Bakterien, die hier durch Doppelfärbung orange/gelb dargestellt sind. Es handelt sich dabei um Eubakterien. Die Färbung mit Sonden, die an archaeale rRNA binden, ergab kein Ergebnis bzw. kein Fluoreszenzsignal.

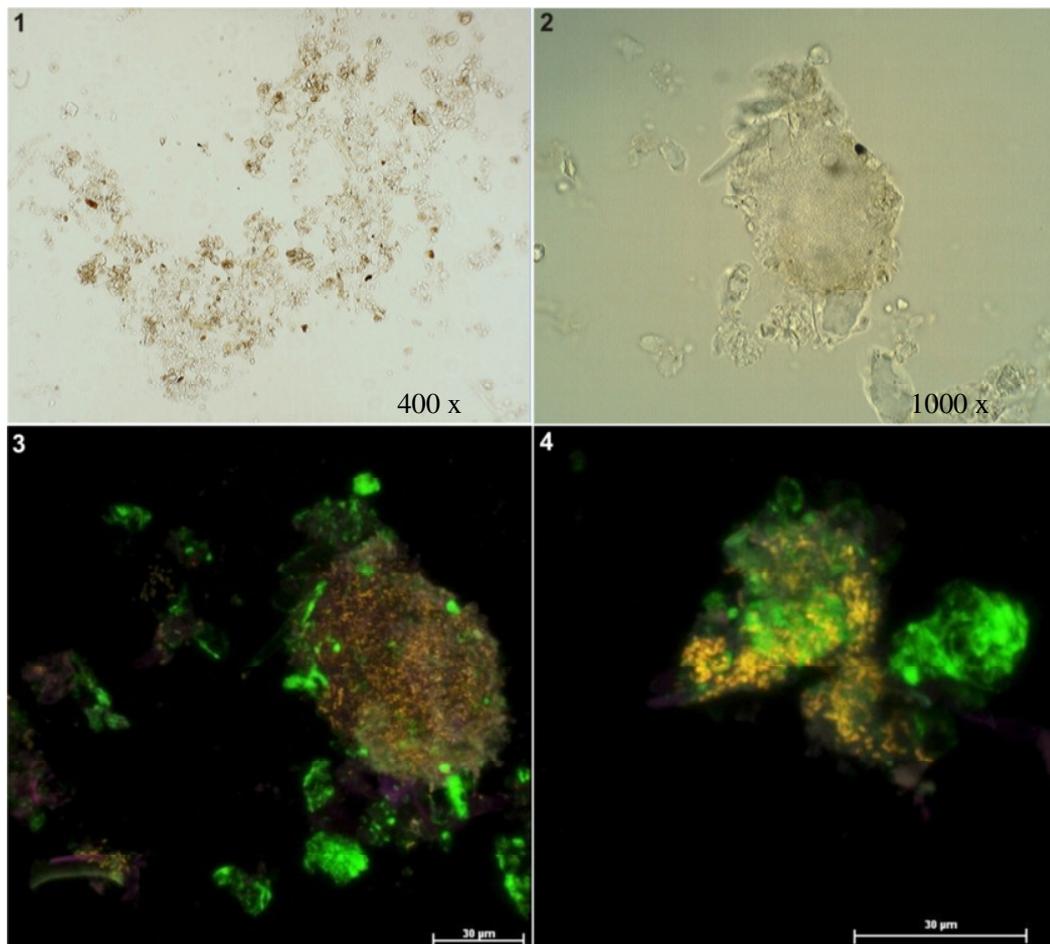


Abb. 30: CLSM-Aufnahmen: (1): Fermentationsschlamm, Hellfeldaufnahme 400 x Vergrößerung ; (2): Migulatorpartikel (<100 µm Ø), Hellfeldaufnahme 1000 x Vergrößerung (3): Migulatorpartikel (<100 µm Ø/orange) mit fluoreszenzmarkierter Eubakterienbesiedelung (gelb) und autofluoreszente pflanzliche Fragmente (grün) (4): Migulatorpartikel (<100 µm Ø/orange) mit fluoreszenzmarkierter Eubakterienbesiedelung (gelb) und autofluoreszente pflanzliche Fragmente (grün).

Die den Migulator kolonisierenden Bakterien wurden mittels „Point Picker“-Plugin gezählt. Bei der Zählung ergab sich eine Zelldichte von $7,22E+10$ Zellen cm^{-3} mit einer Standardabweichung von $3,92E+10$ und für die Grassilagefaser $4,02E+11$ Zellen cm^{-3} mit einer Standardabweichung von $7,79E+11$. *Abbildung 31* zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines von Bakterien kolonisierten Grassilagepartikels. Deutlich sichtbar sind die „Fraßspuren“ der Bakterien.

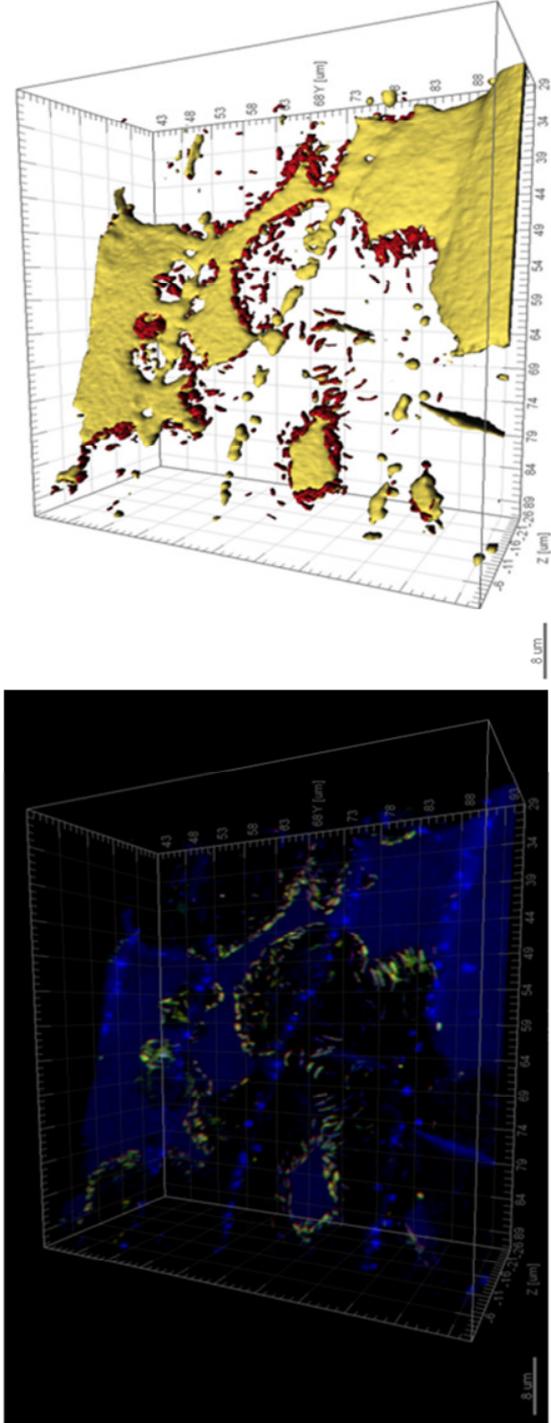


Abb. 31: 3D-Rekonstruktion und Rendering der Aufnahmeserie einer Grasslagefaser mit Bakterien und ihren Fraßspuren an den pflanzlichen Zellwänden/Partikeln

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Abbildung 32 zeigt rasterelektronische Aufnahmen von Migulatoroberflächen von Partikeln mit einem Korngrößendurchmesser von ca. 1,5 mm. Die Bilder 3 und 4 zeigen einen identischen Bildausschnitt: (Bild 3) Aufnahme mit einem In-Lens-Detektor und (Bild 4) Aufnahme mit einem AsB-Detektor. So konnte man feststellen, welche Strukturen zum Migulator gehören bzw. welche mikroorganismischen Ursprungs sind.

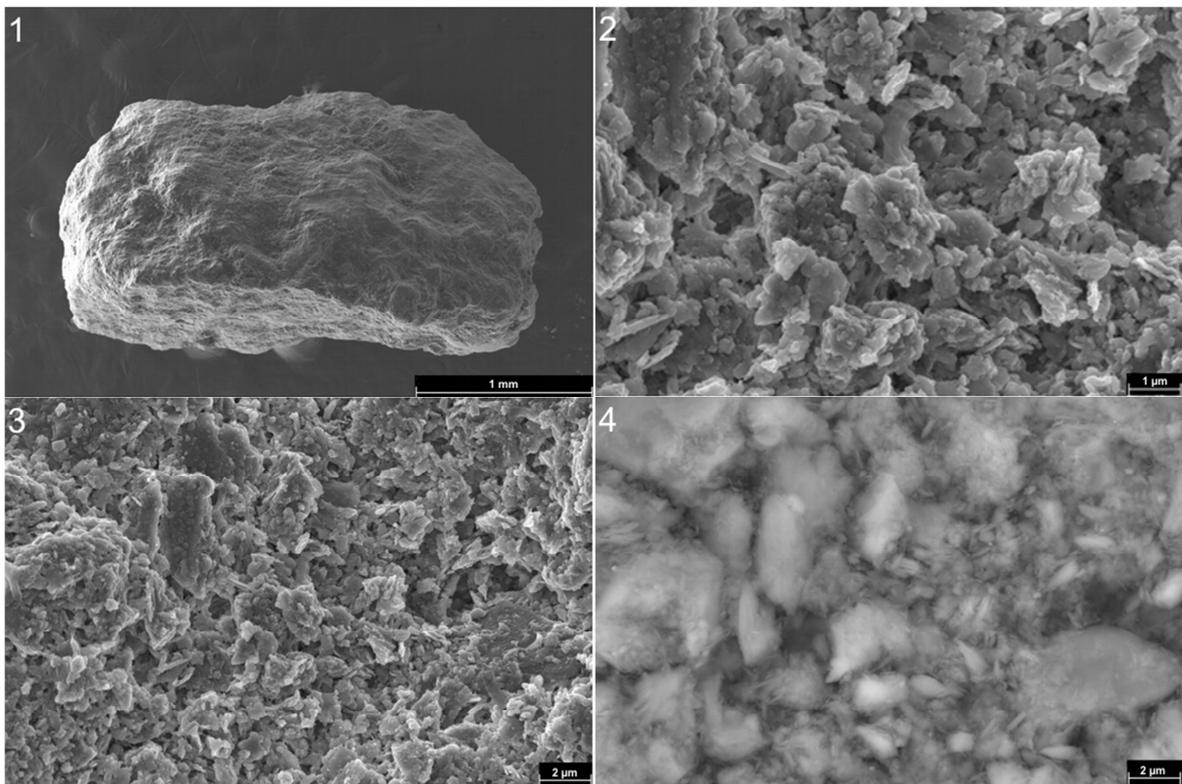


Abb. 32: Rasterelektronische Aufnahmen: Migulatorpartikel des Bioreaktors I3 nach einer Woche (Bild 1: Gesamtartikel In-Lens-Detektor, Bild 2: Detailaufnahme In-Lens- Detektor, Bilder 3 und 4: Vergleich einer Totalaufnahme mit In-Lens-Detektor bzw. mit AsB- Detektor)

Die mit Kohlenstoff „gesputterten“ Migulatorpartikel zeigen nach einer Woche „In Sacco-Verfahren“ (Abbildung 32) keine Besiedelung von Mikroorganismen. Dies wird durch die erneute Aufnahme des Bildes 3 mittels AsB-Detektor bestätigt (siehe Bild 4 in Abbildung 32), da hier ebenfalls keine Mikroorganismen feststellbar waren.

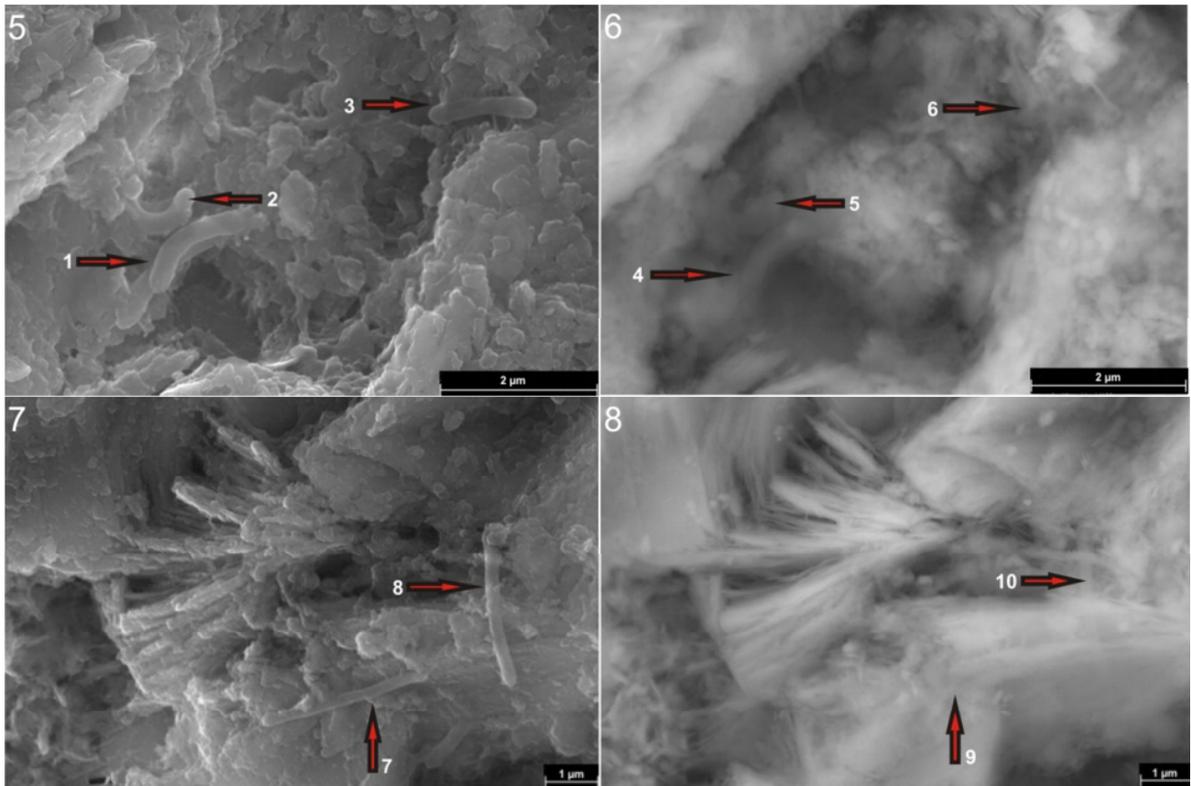


Abb. 33: Rasterelektronische Detailaufnahmen von Migulatorpartikeln des Bioreaktors I3 nach 12 Wochen: Bild 5 zeigt die In-Lens-Detektor Aufnahme und Bild 6 den gleichen Bildausschnitt mit AsB-Detektor aufgenommen. Bild 7 und Bild 8 zeigen die Aufnahmen des gleichen Bildausschnittes mit In-Lens-Detektor (links) und mit AsB-Detektor (rechts).

Im Vergleich zu den Aufnahmen der Migulatorpartikel nach einer Woche (*Abbildung 33*) zeigen sich nach 12 Wochen Inkubationszeit Strukturen, welche mittels AsB-Detektor als organisch zu identifizieren waren. Die Pfeile weisen auf als Mikroorganismen erkannte Strukturen hin. Zu sehen ist, dass die mit dem In-Lens-Detektor gefundenen Mikroorganismen im AsB-Detektor-Modus verblassen bzw. nicht mehr erkennbar sind. Diese Verblassung der Struktur gibt den Hinweis auf organisches Material bzw. Mikroorganismen. Die gefundenen Mikroorganismen wiesen eine Länge von 2 bis 4 μm und einen Durchmesser von 0,2 bis 0,5 μm auf.

4. Diskussion

Das Kapitel „Diskussion“ befasst sich mit der Interpretation und der Diskussion der Ergebnisse aus (*Kapitel 3*) dieser Masterarbeit. Es werden die Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden zur detaillierten mikrobiellen Charakterisierung von Populationen bei der anaeroben Monofermentation von Grassilage unter Zusatz von Migulatorpartikeln erläutert.

4.1 DNA- Extraktion

In dieser Arbeit ging die Extraktion der gDNA aus den Bioreaktorschlammproben der von der LfL-Bayern betriebenen Bioreaktoren I1, I2 und I3 der molekularen Analyse und weiteren Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaft voran. Anfänglich wurden alle fraktionierten Schlammproben mit einer klassischen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Methode behandelt, um amplifizierbare gDNA zu erhalten. Bei dieser Methode dürfte jedoch eine nicht unbedeutende Menge an PCR-inhibierenden Stoffen mit-aufgereinigt worden sein, da nur ein Teil der isolierten DNA im nächsten Schritt, der Polymerasekettenreaktion, amplifizierbar war. Bei der Isolierung der DNA können Huminstoffe mit den erwünschten DNA-Molekülen co-präzipitieren, kovalente Bindungen mit der DNA eingehen und so die darauffolgenden PCR-Reaktionen inhibieren bzw. die Sensitivität der PCR senken (Técher et al., 2010). War dies der Fall, so wurde die noch benötigte DNA erneut aus den Schlammproben extrahiert und in einem zweiten Durchgang mit einer auf Glasmilch basierenden Kit-Methode („FastDNA[®] SPIN Kit for Soil“, MP Biomedicals, Germany) isoliert. Der verwendete Kit lieferte amplifizierbare DNA größerer Ausbeute und sichtbar geringerer gelb-brauner Färbung, was auf eine geringere Menge an Inhibitoren schließen ließ (Lebuhn et al., 2003). Um das Risiko einer Inhibition der PCR noch weiter zu verringern, wurden die DNA-Isolate im Verhältnis

1 : 100 verdünnt. Die Verdünnung der DNA-Isolate dürfte die Menge an PCR-Inhibitoren weiter verringert haben. Wenn man die zwei Methoden vergleichend betrachtet, dann bietet die auf dem Kit basierende DNA-Isolierung, die mit relativ hohen Anschaffungskosten verbunden ist, bessere Ergebnisse als die klassische phenolische DNA-Extraktion nach Martin-Laurent et al. (2001). Eine vorhergehende Probenreinigung mit CaCO_3 oder auch eine Behandlung der Roh-DNA mit CaCl_2 könnte zu einer noch effizienteren Huminstoffentfernung und zu qualitativ hochwertigeren DNA-Isolaten führen (Sagova-Mareckova et al., 2008).

4.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse

Die molekulare Diagnostik behilft sich unter anderem mit dem „Single Strand Conformation Polymorphism“, kurz *SSCP*, um bakterielle Populationen zu untersuchen. Ursprünglich diente die Methode dazu, Mutationen im Erbmateriale zu entdecken (Hayashi et al., 1991). Bei der Untersuchung bakterieller Populationen wurden 412 bp Fragmente der bakteriellen 16S rRNA Gene aus der V4- und V5- Region amplifiziert, verdaut, denaturiert und über ein Acrylamidgel spezifische DNA-Bandenmuster erzeugt (Schwieger und Tebbe, 1998). Nach dem gleichen Prozedere wurde auch für die Untersuchung der Archaeengemeinschaft vorgegangen; jedoch wurden archaeale PCR-Primer verwendet. So lässt sich aus der Zahl und der Intensität der sichtbaren, d.h. dominanten Banden erkennen, dass sich die bakteriellen und archaealen Populationen über die Zeit und in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen und vom Bioreaktor ändern. In der Anfangsphase (Tag 22 bis Tag 236), in der die Raumbelastung und die Prozesstemperatur in den Bioreaktoren variierten, waren einige Banden sichtbar, die in der späteren stabilen Phase mit endgültig eingestellter Raumbelastung von $2 \text{ kg ots m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ nicht vorhanden waren.

Die digitalisierten SSCP-Gele wurden mittels „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) bearbeitet, um damit eine Cluster-Analyse nach der *Pearson*-Korrelation anzufertigen. Die daraus resultierenden Cluster stehen nicht eindeutig mit den dazugehörigen Prozessbedingungen, also mit den Konzentrationen an freien Fettsäuren, Ammoniak bzw. Ammonium und mit der Raumbelastung, in Zusammenhang.

Obwohl hohe Ammoniakkonzentrationen während der Fermentation der Grassilage entstanden, eignet sich Grassilage grundsätzlich sehr gut als Energieträger zur Biogaserzeugung. Hierzu wird beim anaeroben Abbau von Viehdung im Falle eines nicht angepassten Systems eine Inhibierung des Prozesses schon bei Ammoniakkonzentrationen von 80 bis 100 mg $\text{NH}_3 \text{ l}^{-1}$ erwähnt (Lethomäki et al. 2008; Nielsen und Angelidaki, 2008).

Eine Ammoniuminhibierung steht in Zusammenhang mit der Akkumulation der freien Fettsäuren. Der Ammoniumstickstoff ist für das Wachstum von Bakterien notwendig, inhibiert aber die anaerobe Zersetzung, wenn $\text{NH}_4\text{-N}$ in hohen Konzentrationen vorliegt. Die Konzentration freien Ammoniaks ist die Funktion der gesamten Stickstoffkonzentration ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), der Temperatur, des pH-Wertes und des Druckes. Steigt die Temperatur oder der pH-Wert, so verschiebt sich das Gleichgewicht von NH_4^+ in Richtung NH_3 , während es bei steigendem Gasdruck zu einem Sinken des pH-Wertes kommt und sich so auch die Menge an freigesetztem Ammoniak verringert (Nielsen und Angelidaki, 2008). Während der Fermentationen der Grassilage konnte die Wirkung eines erhöhten pH-Wertes auf die Ammoniakkonzentration beobachtet werden. Versuchstage mit erhöhten pH-Werten zeigten meist auch die höchsten Mengen an Ammoniakstickstoff.

Während des Projektes wurden wöchentlich Proben an die TU Graz geschickt und dort bearbeitet. Die Ähnlichkeit von Prozessbedingungen verschiedener Versuchstage war der Anlass die Methode des hierarchischen Clusterings (auch „molekulare Fingerprintmethode“ genannt) anzuwenden, durch die erhofft wurde, dass sich Cluster von Proben (jeweils mit eigenem DNA-Bandenmuster), die unter ähnlichen Prozessbedingungen entstanden sind, bilden. Das hierarchische Clustern wurde also angewendet, um eine Gruppierung von Proben (DNA-Banden) bei ähnlichen Prozessbedingungen zu erhalten. Die Dendogramme der Cluster generierten sich aus der „Unweighted pair-group method with arithmetic mean“-Methode,

kurz UPGMA (Talbot et al., 2007). Bei dieser Methode des Clusters vergleicht das Programm die relative Position der DNA-Banden. Erwartet wurde, dass die Proben der Versuchstage mit ähnlichen Prozessbedingungen (wie freien Fettsäuren, Ammoniak oder Raumbelastung) einen relativ einheitlichen Cluster (resultierend aus ähnlicher DNA-Banden Verteilung) bilden würden. Die DNA-Banden der verschiedenen Proben waren jedoch so unterschiedlich, dass die Cluster nur aus Proben unterschiedlichster Prozessbedingungen bestanden. Nahezu kein Cluster bestand nur aus Proben, welche aus Versuchstagen mit z.B. hoher Ammoniakkonzentration stammten. Zeolith hat eine hohe Kapazität freien Ammoniak zu binden und die inhibitorische Wirkung auf die Biogasbildung zu minimieren (Holper et al., 2008). Möglicherweise hatte in unserer Untersuchung der den Bioreaktoren I2 und I3 zugesetzte Migulator diese hohe Bindungsfähigkeit von Ammoniak, sodass die Bakteriengemeinschaft nicht ernsthaft durch diesen Prozessparameter beeinflusst wurde.

4.3 „Canonische Korrespondenzanalyse“

Da das hierarchische Clustering keine erwartete Gruppierung der untersuchten Probenbanden mit den jeweiligen Prozessparametern ergab, wurde nach einer geeigneteren Methode zur Analyse der Mikrobiologie unter bestimmten Prozessparametern gesucht. Hierzu bot sich die Methode der „Canonischen Korrespondenzanalyse“ zur Untersuchung von bakteriellen Gemeinschaften und ihrer Umwelt an. Diese kann mit dem Programm „*Canoco for Windows 4.5*“ (ter Braak and Šmilauer, 2002) durchgeführt werden. Die „Canonische Korrespondenzanalyse“ ist eine multivariate Methode, um die Beziehung zwischen der Anzahl an Spezies und ihrer Umgebung zu ermitteln. Aus den Umweltdaten werden Gradienten, in vorliegender Arbeit von Prozessparametern wie freien Fettsäuren (Essig- und Propionsäure), Ammoniak und Raumbelastung erstellt. Über ein Ordinaten-Diagramm lässt sich ermitteln, bei welchen Umweltgradienten die *Taxa* ihre Präferenzen haben (ter Braak und Verdonschot, 1995).

Es galt nun herauszufinden, inwieweit sich die Bandenintensitäten durch die Parameter des Grassilage-Fermentationsprozesses ändern. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten ist diese Methode quantitativ. Es wurde sowohl der Frage, ob es bei einer Steigerung der Prozessparameter zum vermehrten Aufkommen einer Spezies (nämlich zu einer Intensitätssteigerung der DNA-Banden) kam, als auch der Frage, ob aus diesem Aufkommen möglicherweise eine Anhebung eines Parameters resultiert, nachgegangen. Wenn ein bestimmter Organismus ein vermehrtes Auftreten bei erhöhten Prozessparametern zeigt, kann angenommen werden, dass der Organismus selbst diesen Prozessparameter beeinflusst bzw. eine Präferenz zu jenem hat. Würde der Mikroorganismus z.B. mit erhöhter Propionsäure korrelieren, kann er selbst für die erhöhte Konzentration verantwortlich sein, da er zuvor ein bestimmtes Substrat abbaute und Propionsäure erzeugte oder auch die Propionsäure das Wachstum des Mikroorganismus förderte. Ein vermehrter Abbau eines Ausgangssubstrates führt demnach auch zu einer Vermehrung des Mikroorganismus selbst, weshalb er sich dann in der graphischen Darstellung der „Canonischen Korrespondenzanalyse“ durch „CanoDraw“ (Biometris, Netherlands) in der Nähe einer bestimmten Ordinate wiederfindet. Die Rohdaten aus den Fingerprints stammten aus der SSCP-Analyse von Proben der Anlaufphase bzw. der stabilen-Phase des Fermentationsprozesses und mussten standardisiert werden. SSCP-generierte Banden wurden extrahiert, die zugrundeliegende DNA eluiert und sequenziert, um taxonomische Bezüge zu den Prozessparametern herzustellen. Um die Signifikanz der „Canonischen Korrespondenzanalyse“ zu bestimmen, war es notwendig mit Hilfe des Programmes „Canoco for Windows“ (Biometris, Netherlands) einen Monte-Carlo-Permutations-Test durchzuführen.

4.3.1 Aufgetretene Mikroorganismen

Die Sequenzierung ergab, dass alle gefundenen Mikroorganismen dem Phylum *Firmicutes* und den Ordnungen *Clostridiales* bzw. *Bacillales* zuzuordnen waren.

Das Phylum *Firmicutes*, welches mehrere Gattungen anaerober Mikroorganismen mit cellulolytischer Aktivität beinhaltet, wird hauptsächlich durch die Klasse *Clostridia*, aber auch durch die weniger abundanten Klassen *Mollicutes* und *Bacilli* repräsentiert (Krause et al., 2008). Mikroorganismen der Klasse *Mollicutes* waren jedoch in den untersuchten Bioreaktoren nicht zu finden. Ein Ergebnis war, dass ein paar der gefundenen Bakterien in der Anfangsphase und in der stabilen Phase mit einigen Prozessparametern korrelierten. Allerdings korrelierten in der Anfangsphase die Bakterien interessanterweise mit anderen Prozessparametern als in der stabilen Phase.

4.3.1.1 Bioreaktor I1 - Kontrolle

Bande 1 ließ sich als *Clostridium sp.* und Bande 6 als *Bacillus sp.* klassifizieren. Als gemeinsames Merkmal stellte sich heraus, dass die Häufigkeit dieser Bakterien in der Anlaufphase mit der ansteigenden Konzentration an Ammoniak korrelierte. Die Abundanz von *Clostridium sp.* korrelierte auch in der stabilen Phase mit der Höhe der Ammoniakkonzentration. Clostridien bzw. Vertreter aus der Gattung *Clostridium* sind strikt anaerobe grampositive sporenbildende Bakterien (Rainey und Stackebrandt, 1993). Clostridien sind unter anderem dafür bekannt, dass sie in der Hydrolyse-Phase der Biogasbildung Polysaccharide wie Cellulose und Stärke zu Monosacchariden abbauen (Zhang et al., 1994). Clostridien, wie z.B. *Clostridium thermocellum*, zählen zu den wichtigen Mikroorganismen in der Hydrolyse-Phase, da sie einen extrazellulären Multienzymkomplex aufweisen können, das Cellulosom. Dieser Multienzymkomplex beinhaltet verschiedene Cellulasen und Hemicellulasen (Guglielmi und Bèguin, 1998). Neben Cellulose bilden Hemicellulasen einen Hauptbestandteil pflanzlicher Biomasse, bei deren Abbau hemicellulolytische Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen (Kulkarni et al., 1999). Das Auftreten von *Clostridium hiranonis* korrelierte ebenso mit erhöhter Ammoniakkonzentration wie zuvor bei *Bacillus sp.* beschrieben. *Clostridium hiranonis* produziert beim anaeroben Abbau Wasserstoff, welcher von Wasserstoff konsumierenden Methanogenen entzogen wird.

Mit diesen sogenannten „hydrogenotrophen“ Methanogenen lebt *Clostridium hiranonis* in enger Gemeinschaft (Quéméneur et al., 2010). Die Spezies *Paenibacillus sp.* aus der Gattung *Paenibacillus* beinhaltet eine Vielzahl Stickstoff-fixierende Vertreter. Einige Spezies dieser Gattung sind befähigt Chitinasen, Amylasen und Proteasen zu bilden (Coelho et al., 2003). Die Gattung *Paenibacillus* ist grampositiv, sporenbildend und beinhaltet aerobe bzw. fakultativ anaerobe Vertreter (Lebuhn et al., 1997; Baek et al., 2010). *Paenibacillus sp.* kommt in der Anlaufphase der Fermentation vermehrt bei höheren Essigsäurekonzentrationen vor, wobei sein Vorkommen in der stabilen Phase in Bioreaktor II keine Korrelation mit einem der Prozessparameter zeigte. Im Fall der Essigsäure lässt sich vor allem in der Anfangsphase der Fermentation schwer voraussehen, ob nun der korrelierte Mikroorganismus für diese Erhöhung der Essigsäure verantwortlich war. Essigsäure kommt schon im Ausgangssubstrat der Grassilage in erhöhter Konzentration vor (Andrade und Lebuhn, 2009). *Bacillus sp.* ist neben *Paenibacillus sp.* auch ein grampositiver endosporenbildender Vertreter der Ordnung *Bacillales*. Innerhalb der Gattung *Bacillus* finden sich auch thermophile Vertreter mit einem Potenzial zur Produktion thermostabiler Enzyme, das sind unter anderem Proteasen, Amylasen, Pullanasen, Xylanasen und Lipasen (Rainey et al., 1994). Unter dem Gesichtspunkt der thermostabilen Enzymproduktion ist die Gattung *Bacillus* neben *Clostridium* auch für die Hydrolyse der Grassilage von Bedeutung und wäre somit befähigt sowohl Proteine als auch Hemicellulosen abzubauen. Da Grassilage einen nach Lethomäki et al. (2007) hohen Proteinanteil (10,4 % TS) hat und es infolgedessen bei der Hydrolyse zu einer erhöhten Bildung von Ammoniak kommen kann, wäre die erhöhte Ammoniakkonzentration mit dem verstärkten Auftreten von Protease bildenden Bakterien wie *Bacillus sp.* und *Clostridium sp.* erklärbar. *Bacillus sp.* korrelierte in der stabilen Phase zudem mit der Konzentration an Essigsäure bzw. mit der Raumbelastung. Das anaerobe Bakterium *Caloramator viterbiensis* ist grampositiv, moderat thermophil (33 bis 64 °C) und wächst bei einem pH-Wert von 5,0 bis 7,8. Es verstoffwechselt Glycerin, Glucose, Mono- und Polysaccharide (z.B. Cellobiose), aber auch Aminosäuren zu Essigsäure, 1,3-Propandiol, H₂, CO₂ und Ethanol, je nach Substrat und Stamm (Seyfried et al., 2002).

Caloramator viterbiensis vermehrte sich abhängig von der steigenden Raumbelastung. Dies könnte bedeuten, dass die Spezies aufgrund der Möglichkeit viele Bestandteile der Grassilage

zu fermentieren, optimale Wachstumsbedingungen gefunden hat. Beim gefundenen *Clostridium mesophilum* konnte keine eindeutige Korrelation mit der Raumbelastung nachgewiesen werden. Der über den Monte-Carlo-Permutationstest ermittelte p-Wert wies ausschließlich bei Bioreaktor I1 bezüglich der Proben aus der Anlaufphase auf eine signifikante Populationsverteilung hin. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Bioreaktoren I2 und I3 ist dieses Ergebnis auffällig und auch im Vergleich zum Ergebnis, das in der später folgenden stabilen Phase errechnet wurde. Aufgrund dieser Signifikanz lässt sich annehmen, dass im Bioreaktor I1, der ohne Migulatorpartikel als Additiv betrieben wurde, die Mikroorganismen in der Anlaufphase vermehrt von den Prozessparametern beeinflusst wurden oder umgekehrt die Prozessparameter ein Resultat der bakteriellen Stoffwechsellistung waren. Die erwähnte Signifikanz zeigt, dass in diesem Fall ein Zusammenhang zwischen Umwelt- bzw. Prozessparametern und Mikroorganismen, d.h. den Bakterien, bestand. Dass dotierter Zeolith als Additiv in der Biogasproduktion eingesetzt wird, um den Prozess zu stabilisieren, wurde schon von Walter Somitsch (2010) in einem Artikel über „Migulatoren“ erwähnt. Die kontinuierliche Fermentation von Grassilage unterlag in der frühen Phase, also bei fehlender Migulatorzugabe, deutlich instabileren Prozessverhältnissen und schwankenderen Populationsdynamiken als unter Verwendung von Migulatoren (meth-max®, IPUS-Österreich). Die „Canonische Korrespondenzanalyse“ der stabilen Phase des Bioreaktors I1 zeigte genauso wie in der Anlaufphase eine Korrelation der Ammoniakkonzentration mit *Clostridium sp.*. *Bacillus sp.* zeigte in der stabilen Phase ein vermehrtes Auftreten bei erhöhter Raumbelastung und erhöhter Essigsäurekonzentration. Dieses Ergebnis ist jedoch - wie schon bei *Clostridium mesophilum* - nicht signifikant. Zugehörige Banden orientierten sich nur tendenziell an den zwei Ordinaten. *Clostridium frigidicarnis* und *Clostridium straminisolvens* wurden in I1 während der stabilen Phase ermittelt. Während *Clostridium straminisolvens* von Prozessparametern unabhängig auftrat, zeigte *Clostridium frigidicarnis* eine sehr schwache Korrelation mit der Raumbelastung und der Essigsäurekonzentration. *Clostridium frigidicarnis* ist eine psychrotolerante Spezies aus der Ordnung der *Clostridiales* und spielt eine Rolle beim Verderb von vakuumverpacktem Fleisch. *Clostridium frigidicarnis* ist in der Lage Proteine und auch Zucker abzubauen (Broda et al., 2002). Ein weiterer Vertreter cellulolytischer Clostridien ist *Clostridium*

straminisolvens. Es ist ein aerotolerantes, unbewegliches, sporenformendes und mit *Clostridium thermocellum* verwandtes Bakterium, welches Kohlenhydratquellen wie Cellobiose, Laminarin oder andere cellulosehaltige Materialien für sein Wachstum nutzen kann (Kato et al., 2004).

4.3.1.2 Bioreaktor I2 - Migulator-Additiv

Bioreaktor I2 wurde in der Anlaufphase mit Migulatorpartikeln (meth-max®, IPUS, Österreich) als bioregulativem Additiv betrieben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Bioreaktor I1 zeigte die „Canonische Korrespondenzanalyse“ des Bioreaktors I2 keine Signifikanz. Auch sammelten sich nur wenige Banden in Abhängigkeit von den Prozessparametern an den zugehörigen Ordinaten. Dennoch waren tendenziell Korrelationen mit Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen zu beobachten. Der gefundene Organismus *Paenibacillus sp.* zeigte in der Anlaufphase wie in Bioreaktor I1 eine Abhängigkeit von der Essigsäurekonzentration. Aber anders als bei Bioreaktor I1 wurde hier zusätzlich *Carboxydocella sp.* identifiziert. *Carboxydocella sp.* ist ein grampositives, thermophiles Bakterium aus der Familie *Syntrophomonadaceae* und der Ordnung *Clostridiales*. Es ist dafür bekannt auf Kohlenmonoxid (CO) als alleinigem Substrat zu wachsen (= Carboxytrophie). „Carboxytrophile“ wachsen auf chemolithoautotrophen Weg durch Verstoffwechslung von Kohlenmonoxid und Wasser (CO + H₂O) zu Wasserstoff und Kohlendioxid (H₂ und CO₂) (Henstra et al., 2007).

Innerhalb der stabilen Phase des Bioreaktors I2, betreffend die Tage 250 bis 353, konnten zusätzlich zu *Carboxydocella sp.* zwei Spezies, nämlich *Clostridium frigidicanis* und *Bacillus sp.*, gefunden werden, auf deren Rolle im Fermentationsprozess schon eingegangen wurde. Das Vorkommen von *Clostridium frigidicarnis* erhöhte sich mit ansteigender Konzentration von Essig- und Propionsäure. Ein weiteres Bakterium, nämlich *Clostridium*

hirnonis, korrelierte mit erhöhter Raumbelastung. In der stabilen Phase von Bioreaktor I2 fiel weiters auf, dass drei Spezies, unter ihnen *Carboxydocella sp.*, *Bacillus sp.* und *Clostridium straminisolvens* auftraten, diese aber keine Abhängigkeiten von den Prozessparametern zeigten. Die beiden Spezies *Clostridium sp.* und *Caloramator viterbiensis* zeigten keinen eindeutigen Zusammenhang mit der Raumbelastung, obwohl auch sie sich in Richtung der Ordinate sammelten. Diese „Unabhängigkeit“ der Spezies von den Konzentrationen an Essigsäure, Propionsäure, Ammoniak und Raumbelastung kann ein Indiz für die regulative Wirkung des Migulators innerhalb des stabil laufenden Fermentationsprozesses sein.

4.3.1.3 Bioreaktor I3 - Migulator-Additiv

Durch die „Canonische Korrespondenzanalyse“ der Anlaufphase konnte gezeigt werden, dass *Clostridium sp.*, *Clostridium frigidicarnis* und *Paenibacillus sp.* in Abhängigkeit von der Ammoniakkonzentration erhöhte Abundanzen zeigten. Der Grund für die erhöhte Ammoniakkonzentration ist wahrscheinlich in der generell hohen hydrolytischen Aktivität dieser Bakterien zu finden. Andere Bakterien wie z.B. *Bacillus sp.* oder *Caloramator viterbiensis* korrelierten mit mehreren Prozessparametern und sammelten sich zwischen den jeweiligen Ordinaten. Der Monte-Carlo-Permutationstest ergab keine Signifikanz (p -Wert $> 0,05$), gleich wie bei Bioreaktor I2. Hervorzuheben ist, dass manche Bakterien (*Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium sp.*, aber auch *Paenibacillus sp.*) in der Anlaufphase eine Korrelation mit den Prozessparametern zeigten, in der stabilen Phase aber nicht. Es ist anzunehmen, dass die genannten Bakterien in der stabilen Phase von den Prozessparametern entkoppelt aufgetreten sein dürften, was einen Hinweis auf einen möglichen stabilen Gesamtprozess gibt bzw. die Rollenverteilung dieser Bakterien innerhalb der stabilen Fermentation widerspiegelt. Die taxonomische Identifizierung der Banden war bei Bioreaktor I3 am erfolgreichsten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die „Canonische Korrespondenzanalyse“ eine interessante Möglichkeit bietet die Auswirkungen verschiedener Prozessparameter auf das Auftreten von Mikroorganismen im Zuge des Biogasformationsprozesses zu erkennen. Durch diverse Korrelationen lassen sich idealerweise beim Auftreten eines Mikroorganismus prozessparametrische Trends erkennen, welche helfen können den Gesamtprozess optimal zu steuern. Eine Kontrolle des Biogasprozesses ist sehr wichtig, da bei einem Zusammensturz des Systems vor allem syntrophe Bakterien und methanogene Achaeen durch ihre langen Generationszeiten (5 bis 15 Tage) viel Zeit benötigen, um wieder aktiv zu werden (Weiland, 2003). Stehzeiten verursachen Betreibern von Biogasanlagen hohe Kosten, wenn man bedenkt, dass der Betreiber bei Einspeisung von Biogas-Strom ins Stromnetz bis zu 21 Cent/kWh (inkl. Rohstoffzuschlag) erwerben kann (Ökostrombericht 2010 E-CONTROL, 2010). Die gefundenen Bakterien waren zum Großteil der Ordnung *Clostridiales* zuzuordnen und zu einem geringen Teil der Ordnung der *Bacillales*. Diese sind vor allem in der Phase der Hydrolyse aktiv und hydrolysieren Polysaccharide und Proteine und stellen dadurch die für die Bildung von Biogas notwendigen Substrate wie Essigsäure, Wasserstoff und andere Intermediate bereit. Die durchgeführte PCR-basierte SSCP-Analyse mit anschließender Cluster-Analyse zeigte keine eindeutigen Cluster, welche den Prozessparametern zugeordnet werden konnten. Trotzdem war die Digitalisierung der SSCP-Gele für die „Canonische Korrespondenzanalyse“ notwendig, da mit den über „GelCompar II“ (Applied Maths, Germany) ermittelten Banden-Intensitäten die Korrespondenzanalyse erst möglich war. So ergab sich eine erfolgreiche Synergie der beiden Analysemethoden, welche für zukünftige Arbeiten im Bereich der Analytik der Biogasformation von Nutzen sein kann. So ist es demnach möglich mithilfe der SSCP-Analyse die Banden zu ermitteln, welche sich in ihrer Intensität über einen gewissen Zeitraum oder in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern ändern und diese dann zu sequenzieren. Im Anschluss daran lassen sich über die „Canonische Korrespondenzanalyse“ eventuelle Korrelationen der Bakterien mit den Prozessparametern finden. Betrachtet man nun die Ergebnisse in Zusammenhang mit dem Zusatz von Migulatoren zur Fermentationsmasse, so lässt sich eindeutig schlussfolgern, dass das Mineral in der gesamten Anfangsphase des Versuchs eine regulative Auswirkung auf die bakterielle Gemeinschaft zeigte.

Die Anfangsphase eines Fermentationsprozesses bildet einen kritischen Punkt, welcher bei unzureichender Kontrolle und ungenügender Stabilisierung der Prozessparameter den Gesamtprozess beeinflusst (vgl. Leclerc et al., 2001). Es wurde häufig beobachtet, dass es während der Anfangsphase zu einer schlechten Performance des Reaktors kommt und demnach auch zu einem vermindertem Abbau von Kohlenhydraten. Die initiale Hydrolyse bildet mit der Methanogenese die kritischsten Punkte innerhalb des anaeroben Abbaus (Leclerc et al., 2001).

4.4 Mikroskopie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen diskutiert.

4.4.1 CLSM-Mikroskopie

Die „Confocal Laser Scanning Microscopy“ mittels „Fluorescent *in situ* Hybridization“ (FISH) wurde angewendet, um zusätzlich zur molekularbiologischen Cluster-Analyse einen Beweis für das Vorkommen von Bakterien und Archaeen innerhalb eines Fermentationsprozesses mit dotiertem Zeolith als bioregulatorischem Additiv zu erhalten. Die Aufnahmen der Migulatorflocken des Batches „MS 1“ (Batchansatz mit einer Migulatorkonzentration von $0,01 \text{ g ml}^{-1}$ und Modellsubstrat (verändert nach Wiselogle et al., 1996) zeigten nach der FISH-Hybridisierung und der Bildgebung durch die resultierenden Fluoreszenzsignale eine hohe Kolonisierung einer Migulatorflocke mit Bakterien. Die Zellzählung ergab eine hohe Zelldichte und verdeutlichte die gute Besiedlungsfähigkeit von Migulatorpartikeln unter $100 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser. Im Gegensatz dazu konnte man mit Hilfe der

Hellfeldaufnahmen mit 400 x bzw. 1000 x Vergrößerung nur die grobe Morphologie der Migulatorflocken erkennen, jedoch keinen Hinweis auf mikrobielle Kolonisierung feststellen. Archaeale Fluoreszenzsignale konnten nicht beobachtet werden, was möglicherweise auf ein zu schwaches Signal der Archaeensonden zurückzuführen war. Neben einem zu schwachen Signal könnte auch eine fehlgeschlagene Bindung der FISH-Sonden an die Nukleinsäuren der Grund für das nicht positive Ergebnis gewesen sein. In einer Studie von De Long et al. (1999) zur Untersuchung von planktonischen Archaeen und Bakterien in Meerwasser konnte man durch die Verwendung von mehrfach-gelabelten Polyribonukleotid-Sonden eine erhöhte Sensitivität im Gegensatz zu Oligonukleotid-Sonden erreicht werden. Mit dieser Methode konnten in jener Untersuchung mögliche Nachteile, wie z.B. eine variable Visualisierung von Zellen oder eine hohe Autofluoreszenz der Proben, die bei Verwendung von einfach gelabelten Oligonukleotid-Sonden auftreten, beseitigt werden (De Long et al., 1999). Betrachtet man die mikroskopischen Bilder des Batchansatzes mit Grassilage und die daraus erstellte 3D-Rekonstruktion einer Grassilagefaser, sieht man eindeutig Grassilage-abbauende Bakterien mit höherer Dichte als auf der Migulatorflocke. Diese Untersuchung führt zu der Annahme, dass Migulatoren kein Konkurrenzfeld für den Substratabbau darstellt und jene mit den Fasern assoziierten Bakterien in den ersten Schritten der Substratkonversion eine Rolle spielen. Mit der konfokalen Mikroskopie ließ sich ein Bild über das Kolonisationsverhalten von Bakterien bzw. ihrem spezifischen Vorkommen erstellen. Im Gegensatz zur SSCP-Analyse und der anschließenden Sequenzierung der DNA-Banden konnten aber mit der CLSM-Mikroskopie keine genauen Aussagen über die Spezies der Bakterien gemacht werden. In diesem Versuch wurden zum Nachweis von Eubakterien bzw. von Archaeen allgemeine FISH-Sonden verwendet. Erweiternd könnte man, um z.B. spezielle phylogenetische Gruppen nachzuweisen, spezifische Sonden verwenden, so wie von Kaparaju und Angelidaki (2008) erwähnt.

Innerhalb dieses Versuches konnte festgestellt werden, dass es sowohl zur Kolonisierung von Migulatorpartikeln als auch zum sichtbaren Abbau von Grassilage gekommen war. Die CLSM-Untersuchung führt in Kombination mit PCR-basierten SSCP- und Sequenzanalysen zu einem allgemein besseren Verständnis über die vorkommenden Mikroorganismen.

4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterlektronenmikroskopische Analyse der Migulatorpartikel diente einerseits der Untersuchung der möglichen Kolonisation der Migulatorpartikel durch Mikroorganismen und andererseits auch der Identifizierung der Morphologie solcher Mikroorganismen. Mit den Rasterelektronenaufnahmen konnte gezeigt werden, dass erst nach 12 Wochen Versuchsdauer eine Kolonisierung des Migulators durch Mikroorganismen deutlich sichtbar war. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Aufnahmen stäbchenförmige Organismen, welche die Poren des Migulators als Mikrohabitat besiedelten. Um sich zu vergewissern, dass es sich tatsächlich um Mikroorganismen handelte, wurde derselbe Bildausschnitt mittels AsB-Detektor aufgenommen. Der AsB-Detektor misst Rückstrahlelektronen und liefert kompositionellen Kontrast, der aus den verschiedenen lokalen chemischen Verbindungen resultiert (Goldstein et al., 2003). Der Vergleich der rasterelektronischen Untersuchung der Migulatorpartikel nach einer Woche bzw. nach 12 Wochen lässt eindeutig darauf schließen, dass die Besiedelung der Migulatorpartikel nicht innerhalb eines kurzen Zeitraumes geschehen kann. Der zuvor erwähnte AsB-Detektor lieferte nach 12 Wochen den eindeutigen Hinweis, dass die gefundenen Strukturen an der Migulatoroberfläche nicht mineralischen Ursprungs waren, während nach einer Woche noch nichts Derartiges zu sehen war. Die Strukturen unterschieden sich auch morphologisch grundlegend von der mineralischen Oberfläche. Es konnte daraus geschlossen werden, dass es sich um stäbchenförmige Mikroorganismen handelte. Wie schon von Weiß et al. (2011) erwähnt, stellt die Rasterelektronenmikroskopie eine Methode zur Visualisierung von migulator-assoziierten Mikroorganismen dar. Visualisiert wurde die Kolonisation von Mikroorganismen an der Oberfläche des Migulators. Die Größe der gefundenen Mikroorganismen war ähnlich, die Durchmesser variierten von ca. 0,4 μm bis 0,5 μm und die Längen von 1,5 μm bis 6 μm . Auffallend war, dass die Mikroorganismen durch pilusähnliche Fortsätze mit der Oberfläche des Migulators verbunden waren. Die sogenannten „Pili“ können mehrere Funktionen haben: Unter anderem haften sie an Oberflächen, was bei Bakterien mit einem Cellulosom-Enzymkomplex zu einem besseren Wachstum und zu einer verbesserten Substrataufnahme führt (Shonam et al., 1999), oder sie dienen auch als leitende Elemente für

einen Wasserstoff- bzw. Elektronentransfer zwischen syntrophen Bakterien und Methanogenen (Ishii et al., 2006). Der Migulator bietet innerhalb des kontinuierlichen Fermentationslaufes eine Trägerfunktion für Mikroorganismen. Die Besiedelung der Migulatoroberfläche bietet den Mikroorganismen einen gewissen Schutz vor äußeren negativen Einflüssen, wie den schwankenden Prozessparametern der Fermentationsläufe der Bioreaktoren I1, I2 und I3. Durch die Schaffung von eigenen mikroklimatischen Regionen können jene Zonen nahezu unbeeinflusst von den Umwelteinflüssen bestehen (nach Somitsch/IPUS, 2010).

5. Zusammenfassung

Alternativenergien aus nachwachsenden Rohstoffen bieten eine sehr gute Möglichkeit ökonomisch und ökologisch den kommunalen Energieverbrauch zu unterstützen. Die Biogasbildung aus landwirtschaftlichen Rohstoffen wie z.B. Mais findet eine breite Anwendung auf diesem Gebiet. Die Fermentation von Grassilage ist zwar ein vielversprechender, jedoch noch nicht ausreichend erforschter Weg der Biogasgewinnung. Grassilage zu fermentieren wäre ökologisch sinnvoll, da in vielen Regionen der Milchviehproduktion beachtliche Mengen an überschüssigem Grünlandaufwuchs anfallen. Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Prozessparametern auf die Mikrobiologie bei der anaeroben Fermentation von Grassilage. In diesem Projekt wurde die Veränderung in der mikrobiellen Population kontinuierlich operierender Bioreaktoren (28 Liter) über einen gesamten Fermentationslauf untersucht. Die Reaktoren wurden mit Grassilage als Monosubstrat und Migulatorpartikeln als Additiv zur Erzeugung von Biogas betrieben. Die mikrobiologische Zusammensetzung wurde mit den Prozessparametern verglichen und eine Kolonisierung der Migulatorpartikel durch Mikroorganismen erforscht. Mittels molekularbiologischer Methoden sollte ferner die These, prozesstypische chemische Verbindungen wie Ammoniak, Essigsäure oder Propionsäure sowie Variationen der Raumbelastung im mono-vergärenden Betrieb von anaeroben Reaktoren hätten unter dem Einfluss von Migulatoren einen geringeren Einfluss auf die mikrobiologische Dynamik und Abundanz verschiedener Populationen, beweisführend untersucht werden. Genutzt wurden hierzu die PCR-basierende „Single Strand Conformation Polymorphism“-Analyse (SSCP) und eine anschließende Sequenzierung der DNA-Banden. Statistische Methoden wie Cluster-Analysen der SSCP-Banden und die „Canonische Korrespondenzanalyse“ kamen zum Einsatz. Diese Methoden zeigten bei den mit Migulator betriebenen Bioreaktoren keine Signifikanz bei der Korrelation der mikrobiellen Gemeinschaft mit den auftretenden Prozessparametern. Der Vergleich der Prozessparameter mit der Mikrobiologie im Kontrollreaktor ohne Migulator zeigte jedoch eine eindeutige Signifikanz. Die Sequenzierung ergab, dass Bakterien des Phylums *Firmicutes* (*Clostridiales*, *Bacillales*) innerhalb des Fermentationslaufs teilweise von

unterschiedlichen Prozessparametern beeinflusst wurden bzw. diese selbst änderten. Neben der Raumbelastung korrelierte in der Anlaufphase der Fermentation vor allem die Konzentration des Ammoniakstickstoffs häufig mit dem Auftreten von Clostridien und Bacilli. Eine vermehrte Korrelation von bakteriellen Spezies (*Clostridium frigidicarnis*, *Paenibacillus sp.*) mit den freien Fettsäuren konnte nur in einem Bioreaktor über den gesamten Fermentationslauf beobachtet werden. Mikroskopische Methoden wie die „Confocal Laser Scanning Microscopy“ (CLSM) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM) zeigten eine Kolonisierung von Migulator- und Grassilagepartikeln durch Mikroorganismen. Ausgehend von den Resultaten der Untersuchungen kann angenommen werden, dass Migulatorpartikel als bioregulatorisches Additiv innerhalb der Monofermentation von Grassilage eine stabilisierende Wirkung auf den Gesamtprozess zeigte. Es ermöglichte Bakterien bei teils hohen Belastungen die für den anaeroben Abbau von Biomasse nötige biologische Aktivität zu gewährleisten.

6. Literaturverzeichnis

Abwicklungsstelle für Ökostrom AG (2010), *Einspeismengen und Vergütung 2010*, http://www.oem-ag.at/green_energy/statistics/Uebersicht_Einspeisetarife, gefunden am 13.04.2011.

Ahring, B. K./ Angelidaki, I./ Johansen, K. (1992), Anaerobic treatment of manure together with industrial waste, in: *Water Science & Technology*, 25 (7), S. 311–318.

Amann, R. I./ Binder, B. J./ Olson, R. J./ Chisholm, S. W./ Devereux, R./ Stahl, D. A. (1990), Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, in: *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (6), S. 1919–1925.

Andrade D./ Lebuhn, M. (2009), *Bridge Biogas Plus- Kontrolle von Biogasprozessen durch den Einfluss auf den Faulschlamm*, 1. Jahrestreffen, Freising: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.

Angelidaki, I./ Ahring, B. K. (1993a), Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia, in: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38 (4), S. 560–564.

ARGE Kompost und Biogas Österreich (2009), *Biogasfolder 2009 - Multitalent Biogas*, http://www.kompost-biogas.info/index.php?option=com_rsfiles&Itemid=145, gefunden am 13.04.2011.

Aschmann, V./ Effenberger, M./ Gronauer, A./ Kaiser, F./ Kissel, R./ Mitterleitner, H./ Nesper, S./ Schlattmann, M./ Speckmaier, M./ Ziehfreund, G. (2007), Grundlagen und Technik, in: *Biogashandbuch Bayern*, Materialienband, Kap. 1.1-1.5, Augsburg: Bayerisches Landesamt für Umwelt, <http://www.lfu.bayern.de/abfall/biogashandbuch/index.htm>, gefunden am 12.04.2011.

Baek, S.-H./ Yi, T.-H./ Lee, S.-T./ Im, W.-T. (2010), *Paenibacillus pocheonensis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from soil of a ginseng field, in: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60 (5), S. 1163–1167.

Bassam, B. J./ Caetano-Anollés, G./ Gresshoff, P. M. (1991), Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, in: *Analytical Biochemistry*, 196 (1), S. 80–83.

Bauer, C. /Lebuhn, M./ Gronauer, A. (2009), *Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen*, Schriftreihe, Freising: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_36964.pdf, gefunden am 19.11.2009.

- Biometra (2010), *TGGE MAXI System – Instruction Manual Vers. 09/10*, http://www.biometra.com/fileadmin/biometra/_products/Electrophoresis/tgge/docs/Manual_TGGE_MAXI_Oct_2009.pdf, gefunden am 15.09.2009.
- Broda, D. M./ Musgrave, D. R./ Bell, R. G. (2003), Molecular differentiation of clostridia associated with ‘blown pack’ spoilage of vacuum packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis, in: *International Journal of Food Microbiology*, 84 (1), S. 71–77.
- Cardinale, M./ de Castro Jr, J. V./ Müller H./ Berg, G./ Grube, M. (2008), *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*, in: *FEMS Microbiology Ecology*, 66 (1), S. 63–71.
- Chmiel, H. (2006), *Bioprozesstechnik. Einführung in die Bioverfahrenstechnik*, 2. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Coelho, M. R. R./ von der Weid, I./ Zahner, V./ Seldin, L. (2003), Characterization of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of part of genes encoding 16S rRNA and 23S rRNA and by multi locus enzyme electrophoresis, in: *FEMS Microbiology Letters*, 222 (2), S. 243–250.
- DeLong, E. F./ Taylor, L. T./ Marsh, T. L./ Preston, C. M. (1999), Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization, in: *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12), S. 5554–5563.
- Doran, P. M. (1995), *Bioprocess Engineering Principles*, London: Academic Press.
- E-Control (2010), *Ökostrombericht 2010*, <http://www.e-control.at/de/marktteilnehmer/news/themen-archiv/oeko-energie-news/oekostrombericht-2010>, gefunden am 13.04.2011.
- Guglielmi, G./ Béguin, P. (1998), Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome, in: *FEMS Microbiology Letters*, 161 (1), S. 209–215.
- Goldstein, J. I./ Newbury, D. E./ Echlin, P./ Joy, D. C./ Lyman, C./ Lifshin, E./ Sawyer, L./ Michael, J. R. (2003), *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, 3rd edition, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Halbhuber, K. J./ König, K. (2003), Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine, in: *Annals of Anatomy*, 185 (1), S. 1–120.
- Hayashi, K. (1991), PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA, in: *Genome Research*, 1, S. 34–38.

- Henstra, A. M./ Sipma, J./ Rinzema, A./ Stams, A. J. M. (2007), Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production, in: *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (3), S. 200–206.
- Holper, J./ Lesjak, M./ Heinzl, U./ Boos, B. (2005), *Verwendung von Zeolith zur Gewinnung von Methangas*, European Patent EP1577269.
- Ishii, S./ Kosaka, T./ Hotta, Y./ Watanabe, K. (2006), Simulating the Contribution of Coaggregation to Interspecies Hydrogen Fluxes in Syntrophic Methanogenic Consortia, in: *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (7), S. 5093–5096.
- Janke, H. D. (2008), *Umweltbiotechnik. Grundlagen und Verfahren*, 2. Auflage, Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Kaltschmitt, M./ Hartmann, H. (2009), *Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren*, Berlin/ Heidelberg: Springer Verlag.
- Kaparaju, P./ Angelidaki, I. (2008), Effect of temperature and active biogas process on passive separation of digested manure, in: *Bioresource Technology*, 99 (5), S. 1345–1352.
- Kato, S./ Haruta, S./ Cui, Z. J./ Ishii, M./ Yokota, A./ Igarashi, Y. (2004), *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community, in: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (6), S. 2043–2047.
- Koch, K./ Wichern, M./ Lübken, M./ Horn, H. (2009), Mono fermentation of grass silage by means of loop reactors, in: *Bioresource Technology*, 100 (23), S. 5934–5940.
- Krause, L./ Diaz, N. N./ Edwards, R. A./ Gartemann, K./ Krömeke, H./ Neuweger, H./ Pühler, A./ Runte, K. J./ Schlüter, A./ Stoye, J./ Szczepanowski, R./ Tauch, A./ Goesmann, A. (2008), Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogasreactor, in: *Journal of Biotechnology*, 136 (1-2), S. 91–101.
- Kulkarni, N./ Shendye, A./ Rao, M. (1999), Molecular and biotechnological aspects of xylanases, in: *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (4), S. 411–456.
- Lebuhn, M./ Heulin, T./ Hartmann, A. (1997), Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots, in: *FEMS Microbiology Ecology*, 22 (4), S. 325–334.
- Lebuhn, M./ Effenberg, M./ Gronauer, A./ Wilderer, P. A./ Wuertz, S. (2003), Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure, in: *Water Science and Technology*, 48 (4), S. 97–103.

- Leclerc, M./ Delbes, C./ Moletta, R./ Godon, J. (2001), Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester, in: *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3), S. 213–220.
- Lieber, A./ Kiesel, B./ Babel, W. (2002), Microbial diversity analysis of soil by SSCP fingerprinting technique using TGGE Maxi System, in: Merbach, W./ Hütsch, B. W./ Augustin, J. (eds.), *13. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes*, Stuttgart/ Leipzig/ Wiesbaden: B. G. Teubner. Verlag, S. 61– 65.
- Little, J.W. (1981), Lambda Exonuclease, in: Chirikjian, J. G./ Papas, T. (eds.), *Gene Amplification and Analysis*, Vol. 2, New York: Elsevier, S. 135–145.
- Lethomäki, A./ Huttunen, S./ Lethinen, T. M./ Rintala, J. A. (2008), Anaerobic digestion of grasssilage in batch leach bed processes for methane production, in: *Bioresource Technology*, 99 (8), S. 3267–3278.
- Martin-Laurent, F./ Philippot, L./ Hallet, S./ Chaussod, R./ Germon, J. C./ Soulas, G./ Catroux, G. (2001), DNA extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods, in: *Applied Environmental Microbiology*, 67 (5), S. 2354–2359.
- Mülhardt, C. (2006), *Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics*, 5. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nielson, H. B./ Angelidaki, I. (2008), Strategies for optimizing recovery of the biogasprocess following ammonia inhibition, in: *Bioresource Technology*, 90 (17), S. 7995–8001.
- Park, J. S./ Kihm, K. D. (2006), Use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) next term for depthwise resolved microscale-particle image velocimetry (μ -PIV), in: *Optics and Lasers in Engineering*, 44 (3-4), S. 208–223.
- Pisarevsky, A. M./ Polozova, I. P./ Hockridge, P. M. (2005), Chemical Oxygen Demand, in: *Russian Journal of Applied Chemistry*, 78 (1), S. 101-107.
- Pobeheim, H./ Munk, B./ Müller, H./ Berg, G./ Guebitz, G. M. (2010), Characterization of an anaerobic population digesting a model substat for maiz in the presence of trace metals, in: *Chemosphere*, 80 (8), S. 829–836.
- Quéméneur, M./ Hamelin, J./ Latrille, E./ Steyer, J./ Trably, E. (2010), Development and application of a functional CE-SSCP fingerprinting method based on [Fe-Fe]-hydrogenase genes for monitoring hydrogen-producing Clostridium in mixed cultures, in: *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (6), S. 3870–3879.

Rainey, F. A./ Fritze, D./ Stackebrandt, E. (1994), The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis., in: *FEMS Microbiology Letters*, 115 (2-3), S. 205–211.

Rainey, F.A./ Stackebrandt, E. (1993) 16S rDNA analysis reveals phylogenetic among the polysaccharolytic clostridia diversity, in: *FEMS Microbiology Letters*, 113(2), S. 125-128

Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 23.April 2009 zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77EG und 2003/30/EG. Text von Bedeutung für den EWR, in: *Amtsblatt der Europäischen Union, Rechtsvorschriften L140/16*, 52. Jg. (5.6.2009), <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:140:0016:0062:DE:PDF>, gefunden am 13.04.2011.

Sagova-Mareckova, M./ Cermak, L./ Novotna J./ Plhachova, K./ Forstova, J./ Kopecky J. (2008); Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics; in: *Applied Environmental Microbiology*, 74 (9), S. 2902–2907.

Sanz, J. L./ Köchling, T. (2007), Molecularbiology techniques used in wastewater treatment: An overview, in: *Process Biochemistry*, 42 (2), S. 119–133.

Scheinpflug, P. (2010) *Natürliche Zeolithe*, <http://scheinpflug.privat.t-online.de/mzli.htm>, gefunden am 26.5.11.

Schwieger, F./ Tebbe, C. C. (1998), A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis, in: *Applied Environmental Microbiology*, 64 (12), S. 4870–4876.

Seyfried, M./Lyon, D./ Rainey, F. A./ Wiegel, J. (2002), *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy, in: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 (4), S. 1177–1184.

Shoham, Y./ Lamed, R./ Bayer, E. A. (1999), The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides, in: *Trends in Microbiology*, 7 (7), S. 275-281.

Somitsch, W. (2010), *Migulatoren – funktionale Minerale mit bioregulativen Eigenschaften*, Technisches Büro Walter Somitsch, Wiedner Hauptstrasse 90/2/19, A-1050 Wien, <http://www.somitsch.at/leis/migul/Migulatoren.pdf>, gefunden am 13.04.11.

Stahl, D. A./ Amann, R. (1991), Development and application of nucleic acid probes, in: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, S. 205–248.

- Strik, D. P. B. T. B./ Domnanovich, A. M./ Holubar, P. (2006), A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage, in: *Process Biochemistry*, 4 (6), S. 1235–1238.
- Tada, C./ Yang, Y./ Hanaoka, T./ Sonoda, A./ Ooi, K./ Sawuayama, S. (2005), Effect of natural zeolite on methane production for anaerobic digestion of ammonium rich organic sludge, in: *Bioresource Technology*, 96 (4), S. 459–464.
- Talbot, G./ Topp, E./ Palin, M.F./ Massé, D. I. (2008), Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors, in: *Water Research*, 42 (3), S. 513 – 537.
- Técher, D./ Martinez-Chois, C./ D’Innocenzo, M./ Laval-Gilly, P./ Bennasroune, A./ Foucaud, L./ Falla, J. (2010), Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils, in: *Separation and Purification Technology*, 75 (1), S. 81 – 86.
- ter Braak, C. J. F./ Šmilauer, P. (2002), *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User’s Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Section on permutation methods*, Ithaca, NY, USA: Microcomputer Power (www.canoco.com), 500 pp.
- ter Braak, C. J. F./ Verdonschot, P. F. M. (1995), Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology, in: *Aquatic Sciences*, 57 (3), S. 255–289.
- Thermo Scientific, *Application Note NanoDrop 1000*, <http://www.nanodrop.com/Library/NanoDrop%201000%20microcell-cuvette-Application-Note.pdf>, gefunden am 20.4.2011.
- Wallner, G./ Amann, R./ Beisker, W. (1993), Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms, in: *Cytometry*, 14 (2), S. 136–143.
- Wang, Q./ Kuninobu, M./ Ogawa, H. I./ Kato, Y. (1999), Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion, in: *Biomass and Bioenergy*, 16 (6), S. 407–416.
- Weiland, P. (2003), *Biologie der Biogaserzeugung*, ZNR Biogastagung 2003 Bad Sassendorf-Ostinghausen, Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, http://www.biogas-infoboard.de/pdf/Biologie_der_Biogaserzeugung.pdf, gefunden am 07.08.2010
- Weiß, S./ Zankel, A./ Leubhn, M./ Petrak, S./ Somitsch, W./ Guebitz, G. M. (2011), Investigation of microorganisms colonizing activated zeolites during anaerobic biogas production from grass silage, in: *Bioresource Technology*, 102 (6), S. 4353–4359.

Yu, Y./ Lee, C./ Kim, J./ Hwang, S. (2005), Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction, in: *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (6), S. 670–679.

Zhang, X. †/ Mandelco, L./ Wiegel, J. (1994), *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment, in: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44 (2), S. 214–222.

Zheng, D./ Alm, E. W./ Stahl, D. A./ Raskin, L. (1996), Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies, in: *Applied Environmental Microbiology*, 62 (12), S. 4504–4513.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Methodenübersicht zur Erstellung der Masterarbeit.....	13
Abb. 2: Die vier Phasen des anaeroben Biomasseabbaus verändert nach Janke et al. (2008).....	15
Abb. 3: Kohlenstoffbilanz bei vollständigem Abbau der Kohlenstofffracht (Weiland, 2003).....	16
Abb. 4: Hydrolyse von Stärke durch bakterielle Amylase und Glucosidase (verändert nach Bauer et al., 2009)	18
Abb. 5: Reaktionen der Acetogenese ausgewählter Fettsäuren und Ethanol und die jeweils zugehörigen freien Energien (Bauer et al., 2009).....	19
Abb. 6: Die zwei Reaktionswege der Methanogenese (Bauer et al., 2009).	20
Abb. 7: Prinzip eines Radialrührers (nach Doran, 1995)	27
Abb. 8:Reaktoraufbau-Querschnitt (verändert nach Andrade und Lebuhn, 2009).....	27
Abb. 9: Schema der Fraktionierung der Reaktorschlämme.....	28
Abb. 10: „In Sacco“-Migulatorsäckchen (6 Fraktionen zu je 0,4 g Migulator [nach Andrade und Lebuhn, 2009])	32
Abb. 11: Befestigungsstutzen für „In Sacco“-Gewebe mit Migulator zur Positionierung in den Bioreaktoren I2 und I3 (nach Andrade und Lebuhn, 2009)	32
Abb. 12: Schema der amplifizierten bakteriellen 16s rRNA-Gen Region und der verwendeten Primer „Com1f“ (f = forward) und „927r“ (r = reverse).....	41
Abb. 13: Schema der amplifizierten archaealen 16S rRNA Region und der verwendeten Primer „787f“ (f=forward) und „1059r“ (r=reverse)	42
Abb. 14: Schema der SSCP-Gelkammer (ohne Frontalglasplatte)	49
Abb. 15: „Set-up“ des Gels für die Elektrophorese („Instruction Manual“ TGGE-MAXI, Biometra, Germany, 2009).....	50
Abb. 16: Vergleich der zwei Extraktionsmethoden- P/C/I-Extraktion vs. „FastDNA® SPIN Kit for Soil“ (MP Biomedicals, Germany) zur Isolierung von gDNA anaerober Populationen aus Fermentationsschlamm.	64
Abb. 17: SSCP-Gele-Bakterien	66
Abb. 18: SSCP-Gele Archaeen.....	67
Abb. 19: Cluster-Analyse des Bioreaktors I1 und die dazugehörigen Prozessparameter	68
Abb. 20: Cluster-Analyse des Bioreaktors I2 und die dazugehörigen Prozessparameter	70
Abb. 21: Cluster-Analyse des Bioreaktors I3 mit Labormesswerten und die dazugehörigen Prozessparameter	71
Abb. 22: SSCP-Gele 1 und 2 der Bioreaktoren I1, I2 und I3 (Versuchstage d22–d353) mit den eluierten Banden (orange Markierung) und der Kennzeichnung der Banden (A– M).....	73
Abb. 23:Veränderung der Ammoniumkonzentration der Reaktoren I1, I2 und I3 innerhalb des Fermentationszeitraumes von Tag 0 bis Tag 236 (verändert nach Andrade und Lebuhn, 2009)	77

- Abb. 24: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I1- „Anlaufphase“; P- value signifikant ($\leq 0,05$); AA: 0,1-8,2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-2,9 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; NH_3 (=NH₃): 0,4-1,1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; VLR: 0,0-2,0 $\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 79
- Abb. 25: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I1- stabile Phase ; AA: 0,2-3,8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-4,7; NH_3 (=NH₃): 0,7-1,2; VLR: 1,0-2,0 $[\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$80
- Abb. 26: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I2- „Anlaufphase“ AA: 0,1-16,5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-7,7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; NH_3 (=NH₃): 0,4-0,7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; VLR: 0,5-2,0 $[\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$81
- Abb. 27: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I2- „Stabile Phase“ = AA: 0,0-3,5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-3,0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; NH_3 (=NH₃): 0,4-1,2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; VLR: 1,0-2,0 $[\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$82
- Abb. 28: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I3- „Anlaufphase“ (AA=Essigsäure, PA= Propionsäure, NH_3 = Ammoniak, VLR= Raumbelastung); AA: 0,1-6,8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-2,9 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; NH_3 (=NH₃): 0,8-1,1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; 0,0-2,0 $[\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$83
- Abb. 29: Canonische Korrespondenzanalyse multivariater Verteilung von Prozessparametern des Bioreaktors I3- „Stabile Phase“ ; AA: 0,3-6,0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; PA: 0,0-0,6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; NH_3 (=NH₃): 0,4-1,1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ FM}$; VLR: 1,0-2,0 $[\text{kg ods m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$84
- Abb. 30: CLSM-Aufnahmen: (1): Fermentationsschlamm, Hellfeldaufnahme 400 x Vergrößerung ; (2): Migulatorpartikel (<100 μm Ø), Hellfeldaufnahme 1000 x Vergrößerung (3): Migulatorpartikel (<100 μm Ø/orange) mit fluoreszenzmarkierter Eubakterienbesiedelung (gelb) und autofluoreszente pflanzliche Fragmente (grün) (4): Migulatorpartikel (<100 μm Ø/orange) mit fluoreszenzmarkierter Eubakterienbesiedelung (gelb) und autofluoreszente pflanzliche Fragmente (grün).87
- Abb. 31: 3D-Rekonstruktion und Rendering der Aufnahmeserie einer Grassilgefaser mit Bakterien und ihren Fraßspuren an den pflanzlichen Zellwänden/Partikeln.....88
- Abb. 32: Rasterelektronische Aufnahmen: Migulatorpartikel des Bioreaktors I3 nach einer Woche (Bild 1: Gesamtpartikel In-Lens-Detektor, Bild 2: Detailaufnahme In-Lens- Detektor, Bilder 3 und 4:Vergleich einer Totalaufnahme mit In-Lens-Detektor bzw. mit AsB-Detektor)89
- Abb. 33: Rasterelektronische Detailaufnahmen von Migulatorpartikeln des Bioreaktors I3 nach 12 Wochen: Bild 5 zeigt die In-Lens-Detektor Aufnahme und Bild 6 den gleichen Bildausschnitt mit AsB-Detektor aufgenommen. Bild 7 und Bild 8 zeigen die Aufnahmen des gleichen Bildausschnittes mit In-Lens-Detektor (links) und mit AsB-Detektor (rechts).90

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Spezifikationen der Bioreaktoren zu Vergärung von Grassilage mittels kontinuierlicher und einstufiger Prozessführung und die Eigenschaften des Reaktorensystems (nach Andrade und Lebuhn, 2009)	25
Tab. 2: Zusammensetzung der Grassilage; TS = Trockensubstanz, oTS = organische Trockensubstanz, NH ₄ = Ammoniumstickstoff (nach Andrade und Lebuhn, 2009)	26
Tab. 3: Gesamte fraktionierte Proben des Fermentationslaufs von 12.2.2009 bis 08.01.2010.....	28
Tab. 4: Probenamen aus dem jeweils zugehörigen Bioreaktor und den Versuchstagen	30
Tab. 5: Extraktionsmethoden der ausgewählten Proben (P/C/I = Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol)	37
Tab. 6: Einstellungen der Elektrophorese für DNA-Isolate und 16s rRNA Amplifikate (V = Volt; mA = Milliampere; min = Minuten)	38
Tab. 7: Die prinzipiellen Schritte der Polymerasenkettenreaktion (PCR) nach Mühlhardt (2006) ..	39
Tab. 8: Komponenten und Menge der angewendeten „COM I“ - PCR-Ansätze.....	43
Tab. 9: „COM I“- amplifizierte Proben	43
Tab. 10: Thermocyclerprogramm „COM I“ (Pobeheim et al., 2010)	44
Tab. 11: Komponenten und Menge der angewendeten archaealen „272“-PCR-Ansätze	44
Tab. 12: Thermocyclerprogramm “272”	45
Tab. 13: Zusammensetzung des Gel-Ladepuffers (NaOH = Natriumhydroxid 2, 5 molar).....	47
Tab. 14: Zusammensetzung des λ- Exonukleasereaktionsgemisches pro zu verdauender DNA- Probe	47
Tab. 15: Zusammensetzung der SSCP-Gele.....	48
Tab. 16: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers	58
Tab. 17: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	58
Tab. 18: FISH-Sonden (beinhalten Fluorochrome) und ihre Eigenschaften	59
Tab. 19: Bakterielle PCR-Amplifikatkonzentrationen der Proben 58-27 und 31-78.....	65
Tab. 20: Archaeale PCR-Amplifikatkonzentrationen der Proben 58-27 und 31-78	65
Tab. 21: Korrelation der SSCP-Gel Banden für die „Canonische Korrespondenzanalyse“ und Sequenzerggebnisse der Banden-DNA mit Angabe der bakteriellen Spezies, Ordnung, Identity in % und „Accessionnumbers“. Die Korrelation der jeweiligen Spezies mit den Prozessparametern in der Anlaufphase (schwarzes X) und stabilen Phase (rotes X). (B.= Bandennummer; VT=Versuchstag; A-N= Bandennamen laut Abb.8)	75
Tab. 22: Konzentrationsbereiche der Prozessparameter je Bioreaktor und Fermentationsphase	78
Tab. 23: <i>p</i> -Werte der Bioreaktoren I1, I2, I3	85

7.3 Chemikalienliste

Chemikalien (hergestellt)		
Chemikalien	Herstellung	Verwendung
APS 10 %	1 g Ammoniumpersulfat auf 1 ml ddH ₂ O	SSCP-Gel-Radikalsartier
Elutionspuffer	500 µl NH ₃ CH ₂ COOH, 100 µl MgCH ₂ COOH, 100 µl EDTA, 5 µl SDS (0.1%), 295 µl dH ₂ O	SSCP DNA-Banden-Elution
Essigsäure 10 %	100 ml Essigsäure 98,9 % in 900 ml dH ₂ O	SSCP-Gel-Färbung, Stopplösung
Ethidiumbromidbad	60 µl in 600 ml dH ₂ O	DNA-Färbung
Extraktionspuffer	2,4 g Tris, 7,45 g EDTA, 1,17 g NaCl, 2 g Polyvinylpyrrolidon, 20 ml SDS in ca. 200 ml dH ₂ O	DNA-Isolierung
Fixierlösung	100 ml Ethanol 99,8 %, 130 ml Glycerol in 770 ml dH ₂ O	SSCP-Gel-Färbung, Fixierung
Glutaraldehyd	3 ml von 25 % GA auf 22 ml 1 M Na-Cacodylatpuffer	Zellfixierung
Isopropanol		DNA-Isolierung, Chlorophomentfernung
Ladepuffer	950 µl Formamid, 4 µl 2,5 M NaOH, 5 µl 5 % Bromphenolblau	DNA-Ladepuffer für SSCP-Gele
Na-Cacodylatpuffer 0,2 M	4,28 g, 100 ml	Zellfixierung
NaOH-Lösung 3 %	15 g Natriumhydroxid & 2 ml Formaldehyd in 500 ml ddH ₂ O	SSCP-Gel-Färbung, Entwickler
Natriumacetat 5 M	20,5 g auf 80 ml dH ₂ O	DNA-Isolierung, Präzipitation
Paraformaldehydlösung 4 %	4 l PFA, PBS	Mikroskopie, Probenentwässerung
PBS-Puffer	0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 1,15 Na ₂ HPO ₄ , 8 g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen & pH auf 7,4 einstellen	Physiologischer Puffer, Mikroskopie
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung	25 ml Phenol pH 7,6, 24 ml Chloroform, 1 ml Isoamylalkohol	DNA-Isolierung, Extraktion
Silbernitratlösung 0,1 %	0,3 g AgNO ₃ & 1,5 ml 37 % Formaldehyd in 300 ml dH ₂ O lösen und in 300 ml dH ₂ O lösen	SSCP-Gel-Färbung, Färbesagenz
50 x TAE-Puffer	242 g Tris-Base, 51,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8 mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen	Agarosegele, Laupuffer
5 x TBE-Puffer	54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8 mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen	SSCP-Gele, Laupuffer
Tris-Base pH 8-10 mM	121 mg Tris-Base auf 100 ml dH ₂ O	DNA-Isolierung, DNA-Aufnahme
Chemikalien (fertig)		
Chemikalien	Hersteller	Verwendung
ddH ₂ O (PCR-Wasser)	Roth, Germany	PCR, DNA-Lösung
DNA-Primer "Com I, 92T, 78T und 1059"	MWG Eurofins, Germany	PCR
λ-Exonuklease & 10 x Puffer	New England Biolabs, Germany	SSCP-Einzelstrangverdau
FastDNA [®] SPIN Kit for Soil	MP Biome-dicals, Europe	DNA-Isolierung
2 x MDE [®] Gel Solution	LONZA, Europe	SSCP-Gele
MgCl ₂ 50 mM	Roth, Germany	PCR
Taq & Go Polymerase & 10 x Puffer	MP Biome-dicals, Europe	PCR
N,N,N',N'-Tetraethylthylenidiamin (TRENED)	Roth, Germany	SSCP-Gele
PCR-Primer COM1f und 92T	MWG Eurofins, Germany	PCR
PCR-Primer 78T und 1059T	MWG Eurofins, Germany	PCR
Propylenoxid	Fluka Chemikalien	Mikroskopie, Probenentwässerung
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Germany	DNA-Aufreinigung
100 bp ready to use DNA-Ladder	Fermentas	Kontrollgele, DNA-Größenvergleich
1 Kb ready to use DNA-Ladder	Fermentas	Kontrollgele, DNA-Größenvergleich

Danksagung

Ich möchte diese Arbeit meinen Eltern und Großeltern widmen. Sie ermöglichten mir den Besuch einer Hochschule und das Absolvieren eines Studiums. Für diese Chance bin ich Ihnen sehr dankbar und daran werde ich mich immer erinnern.

Zu allererst möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Dipl.-Ing. Georg Gübitz bedanken, der mir die Anfertigung meiner Masterarbeit am Institut für Umweltbiotechnologie ermöglichte. Seine konstruktiven und sehr nützlichen Ratschläge und seine Unterstützung waren für meine Arbeit entscheidend und sehr hilfreich.

Weiters bedanke ich mich bei Dipl.-Biologen Stefan Weiß, mit dem ich die meiste Zeit zusammen arbeitete und der für mich bei wissenschaftlichen als auch bei persönlichen Fragestellungen immer ein offenes Ohr hatte.

Ich bedanke mich auch bei unserer Arbeitsgruppe in Besonderen bei Markus List und dem jetzt nicht mehr auf der Technischen Universität tätigem Dr. Herbert Pobeheim, deren motivierende Impulse und Konversationen mir oft eine Hilfe waren.

Bei den Projektpartnern (Institut für Elektronenmikroskopie/TU Graz, LfL-Bayern, IPUS GmbH/Austria, Dr. Walter Somitsch) möchte ich mich auch für die reibungslose Zusammenarbeit und den Rat- und Ideenaustausch bedanken.

Ass.-Prof. Dr. Massimiliano Cardinale und Dr. Armin Zankel danke ich für die unterstützende Mitarbeit und wissenschaftliche Vertiefung auf dem Gebiet der Mikroskopie.

Während meiner Zeit am Institut für Umweltbiotechnologie und während der Anfertigung meiner Masterarbeit nutzte ich die Chance vielen neuen Menschen zu begegnen, die mir positive Impulse auf wissenschaftlicher als auch persönlicher Ebene mitgaben. Viele dieser Menschen bleiben hier leider unerwähnt, für dies möchte ich mich entschuldigen.