

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

**Zusammensetzung der Biozönose der
Methanbildung unter Anwendung
molekularbiologischer Methoden;
Auswahl und Immobilisierung eines
prozesstragenden Organismus auf einem
Biosensor mit dem Ziel der Überwachung der
Prozessstabilität kommerzieller
Biogasanlagen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Simone Groebel, geb. am 08.05.1980 in Jülich
aus Jülich

Rostock, August 2012

1. Gutachter:

Prof. Dr. Bertold Sprenger

Fakultät für Maschinenbau und Schiffstechnik (MSF), Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Institut für Biowissenschaften (IfBI), Universität Rostock

Tag der Einreichung: 22.08.2012

Tag der Verteidigung: 28.01.2013

Vorwort:

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Forschungsprojektes „Bio-LAPS – Optimierung des Betriebs eines Biogasfermenters mit Hilfe eines Feldeffekt-Biosensors auf Basis eines lichtadressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS)“, das vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz durch die FNR, Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. unter dem Förderkennzeichen 22026407 finanziert wurde und durch ein K2-gefördertes Promotionsstipendium. Diese Arbeit wurde im Institut für Nano- und Biotechnologien (INB) der FH Aachen in Kooperation mit der Universität Rostock durchgeführt. Ich bedanke mich für die Förderung und Unterstützung.

Neben einer weiteren kooperativen Promotion von C. Frederik Werner wurden Abschlussarbeiten von Katharina Schumacher, Christoph Krumbé, Annika Jülicher, Marc Reimann, Niklas Jörres, Kristina Schiffer, Florian Jansen und Katharina Kasper im Rahmen dieses Projektes angefertigt.

Danksagung:

Viele Personen haben mich auf verschiedenste Weise in meiner Arbeit unterstützt. Dafür bedanke ich mich herzlich.

Ich danke Herrn Prof. Sprenger von der Universität Rostock, der mir durch die Annahme des Themas die Möglichkeit zur Promotion gab und engagiert und mit regem Interesse die Fortschritte an meiner Arbeit verfolgte.

Herrn Prof. Bahl von der Universität Rostock danke ich für die Übernahme des Amtes des Zweitprüfers.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Baumann von der FH Aachen für die Übernahme des Coreferats seitens der FH und für die fachliche und moralische Unterstützung. Er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Selmer von der FH Aachen, der nach dem Wechsel von Herrn Prof. Baumann ins Rektorat spontan die wissenschaftliche Betreuung meiner praktischen Arbeit übernommen und deren Fortgang durch inspirierende Fachgespräche bereichert und in erheblichem Umfang unterstützt hat.

Herrn Prof. Schöning danke ich für die kritische Begleitung meiner Arbeiten im Rahmen des Projektes „Bio-LAPS“.

Den Mitarbeitern des Instituts für Nano- und Biotechnologien (INB) an der FH Aachen und dort ganz besonders Herrn Dipl.-Ing. Werner aus der AG Schöning danke ich für die interessante Zusammenarbeit in unserem interdisziplinären Projekt und den Einblick in die Funktionsweise der Sensorik.

Ich danke dem Team aus Ingenieuren und Studenten, in dem ich arbeiten durfte und ohne deren Unterstützung die Realisierung des Projektes und dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Ing. Thönnessen für die letzten sechs Jahre, in denen sie mit mir ihr Büro und Labor teilte und mir mit hilfreicher Unterstützung zur Seite stand und Frau Dipl.-Ing. Küppers, die mir häufig den Rücken frei gehalten hat.

Ich danke allen Kollegen des Instituts NOWUM-Energy für das angenehme Arbeitsklima. Bei Herrn Prof. Dielmann bedanke ich mich für den Einstieg in die spannende Thematik sowie die interessanten Gespräche über den Bezug zwischen Forschung und Industrie, um den Fokus der Arbeit nicht zu verlieren.

Für das kollegiale Arbeitsklima danke ich allen Mitarbeitern der FH Aachen, die mir mit ihrer Erfahrung weitergeholfen haben. Dem Team der Werkstatt unter Leitung von Herrn Ziesmann gilt mein Dank für die Realisierung meiner Ideen, insbesondere für den Bau der Parallelanlage.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die unentwegt und mit großem Interesse meine berufliche Entwicklung verfolgten und mich gleichermaßen moralisch wie tatkräftig aufgebaut und unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Der Biogasbildungsprozess	1
1.1.1	Geschichtliche Entwicklung und aktuelle gesetzliche Bestimmungen	1
1.1.2	Sonderstellung von Biogas in den erneuerbaren Energien	3
1.1.3	Anaerober Abbau organischer Substanzen	4
1.1.4	Mikroorganismen in Biogasanalgen	8
1.1.5	Molekulargenetische Verfahren zur Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften	9
1.1.6	Sensitivität der Mikrobiologie	12
1.1.7	Entwicklung eines organismenbasierten Biosensors	12
1.2	Motivation und Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Analyse der Prozessorganismen	18
2.1.1	Analyse der dominanten Organismengruppen	18
2.1.2	Design von Primern und Sonden	22
2.1.3	Analyse der Organismenverteilung anhand der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	23
2.1.4	Quantifizierung der Organismen mittels <i>real time</i> PCR	24
2.1.5	Betrieb der Biogas-Laboranlage	25
2.2	Parallelanlage	27
2.2.1	Analyse der Prozessparameter	27
2.2.2	Untersuchung der optimalen Betriebsweise der Biogas-Parallelanlage	28
2.2.3	Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf den Biogasbildungsprozess	29
2.3	Sensormessungen	29
2.3.1	Aufbau von Chip und Messapparaturen	29
2.3.2	Organismenkultivierung	31
2.3.3	Immobilisierung	32
2.3.4	Messungen mit <i>Escherichia coli</i>	34
2.3.5	Messungen mit <i>Methanosaeta concilii</i>	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Identifizierung und Quantifizierung prozesstragender Organismen	37
3.1.1	Identifizierung der dominanten Organismengruppen	37
3.1.2	Synthetisierte Primer und Sonden	38
3.1.3	Analyse der räumlichen Verteilung der prozesstragenden Organismen mittels FISH	41
3.1.4	Quantifizierung der prozesstragenden Organismen mittels <i>rt</i> PCR	44
3.1.5	Analysen des Laborfermenters	49
3.1.6	Untersuchung von Großanlagen	52
3.2	Parallelfermenteranlage	53
3.2.1	Aufbau einer Parallelfermenteranlage	53
3.2.2	Optimale Betriebsweise für das Parallelfermentersystem	54
3.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf den Anlagenbetrieb	55
3.3	Sensormessungen	62
3.3.1	Aufbau	62
3.3.2	Immobilisierung und Organismenaktivität	63
3.3.3	Messungen mit <i>Escherichia coli</i>	64
3.3.4	Messungen mit <i>Methanosaeta concilii</i>	67

4	Diskussion	69
4.1	Methodische Aspekte	69
4.1.1	Datenbankerstellung	71
4.1.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	72
4.1.3	<i>Real time</i> PCR.....	72
4.1.4	Methodenvergleich	76
4.2	Analyse der Mikroorganismen	77
4.2.1	Identifizierte Organismen	77
4.2.2	Besonderheiten der Ergebnisse der Datenbank	83
4.2.3	Zeitliche Quantifizierung der dominanten Organismen in der Laboranlage	85
4.2.4	Untersuchungen von Großanlagen mit unterschiedlichen Substraten	86
4.3	Parallelfementer.....	88
4.3.1	Aufbau und Bilanzierung des Prozesses	88
4.3.2	Einfluss von Acetatzugaben	91
4.3.3	Einfluss von Butyratzugaben.....	93
4.4	Sensor.....	95
4.4.1	Sensoraufbau und Messanordnung	95
4.4.2	Immobilisierung und Stoffwechselaktivität	95
4.4.3	Messungen mit <i>Escherichia coli</i>	96
5	Zusammenfassung und Ausblick	99
6	Verzeichnisse	I
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	I
6.2	Literaturverzeichnis.....	II
6.3	Tabellenverzeichnis.....	XI
6.4	Abbildungsverzeichnis.....	XII
6.5	Formelverzeichnis	XVI
7	Anhang	XVII

1 Einführung

1.1 Der Biogasbildungsprozess

1.1.1 Geschichtliche Entwicklung und aktuelle gesetzliche Bestimmungen

In der Geschichte der menschlichen und gesellschaftlichen Entwicklung spielt Energie eine Schlüsselrolle. Heutzutage steigt der Bedarf an Energie weltweit jährlich an (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, 2010), womit die nachhaltige Energieversorgung eine Herausforderung der nahen Zukunft ist. Die fossilen Energie- und Rohstoffreserven, die über Millionen Jahre entstanden sind, werden heute in einem - erdgeschichtlich gesehen - winzigen Augenblick unwiederbringlich verbraucht. Im Bewusstsein der Verknappung fossiler Energieträger stieg der Ölpreis in den letzten Jahren rapide an (Tescon, 2012). So ist es nicht verwunderlich, dass energie- und umweltpolitische Fragestellungen in Deutschland seit mehr als 30 Jahren diskutiert werden (Hohensee et al., 1993).

Im Gegensatz zu den Energieträgern Erdöl, Kohle, Erdgas und Uran ist die Nutzung von erneuerbaren Energieträgern - Biomasse, Geothermie, Sonnenenergie, Wind- und Wasserkraft - aufgrund ihrer CO₂-Neutralität klimafreundlicher, sicherer sowie umwelt- und ressourcenschonender (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), 2011). Daher haben die heutigen Industriestaaten den Ausbau dieser Energien sowie die Energieforschung beschlossen (United Nations, 1998). Der Ausbau hat für Deutschland als bisherigem Energieimportland weiterhin den Vorteil von mehr Unabhängigkeit, größerer Versorgungssicherheit und einer gestärkten heimischen Wirtschaft.

Die ersten Untersuchungen von Biogas als ein natürlich entstehendes, energiereiches Gasgemisch wurden 1778 vom italienischen Physiker Alessandro Volta durchgeführt. Damals fand er bereits heraus, dass dieses Gas durch Verrotten aus Biomasse entsteht und gut brennbar ist (Volta, 1778). Ende des 19. Jahrhunderts, als Abwasser erstmals mittels anaerober Gärung geklärt wurde, entstand Biogas als prozessbedingtes aber ungenutztes Nebenprodukt. Seit 1922 wird Biogas zunehmend in städtische Gasnetze eingespeist (Hohensee et al., 1993). Innovationen zur Prozessoptimierung im Sektor Biogas wurden und werden damals wie heute zumeist in Deutschland entwickelt (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), 2011).

Erste Versuche bezüglich der gezielten Gewinnung von Biogas erfolgten in den späten 30er Jahren des letzten Jahrhunderts aus Festmist und Gülle. Bis in die 50er Jahre entstanden ca. 50 Anlagen, die jedoch wegen der niedrigen Erdölpreise damals nicht rentabel zu betreiben waren, so dass diese Versuche bald wieder eingestellt wurden. Mit

dem Bewusstsein der Verknappung und den angestiegenen Preisen für fossile Energien erlangte Biogas als regenerative Energiequelle in den frühen 90er Jahren erneut Interesse. Als wirtschaftliche Grundlage diente das Stromeinspeisungsgesetz (StrEG) von Januar 1991, das die Vergütung von Strom aus erneuerbaren Energien regelte (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktortechnik (BMU), 2010a). Es war der Vorläufer des zum 1. August 2000 in Kraft getretenen Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG), das den Vorrang erneuerbarer Energien vor fossilen und mineralischen Energieträgern festgelegt. Neben dem Ziel des Klima-, Natur- und Umweltschutzes ist der Zweck des Gesetzes, die knapper werdenden fossilen Energieträger möglichst schnell durch regenerative Quellen zu ersetzen.

Das EEG wurde seit 2000 bereits dreimal novelliert (2004, 2009 und 2012), wobei die allgemeinen Ziele beibehalten wurden (Bundesrepublik Deutschland, 2010). Es garantiert den Anlagenbetreibern eine auf 20 Jahre festgelegte Vergütung des produzierten Stromes. Diese langfristig festgesetzte Vergütung führte zu einer enormen Steigerung der Anzahl von Anlagen in Deutschland. Zusätzlich definierte die Bundesregierung das politische Ziel, 2020 mindestens 20 % des Energiebedarfs aus regenerativen Energien zu gewinnen. Die Ziele wurden national im Energie- und Klimapakt verankert (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), 2010), international in der EU-Richtlinie zur Förderung der Nutzung von Energien aus erneuerbaren Quellen (Amtsblatt der Europäischen Union, 2009) und im Kyoto-Protokoll (United Nations, 1998).

Durch die vielfältige Einsatzmöglichkeit von Biogas und die gesicherte Vergütung durch das EEG stieg die Anzahl der Biogasanlagen und deren installierte Leistung stark und stetig an (vgl. Abbildung 1.1.) (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 2011). Heutzutage liegt die garantierte Grundvergütung zwischen 6 und 25 Cent pro kW_{el} (in Abhängigkeit der Anlagengröße) und kann aufgrund von Einsatzstoff und Technologie weiter gesteigert werden (Bundesrepublik Deutschland, 2010).

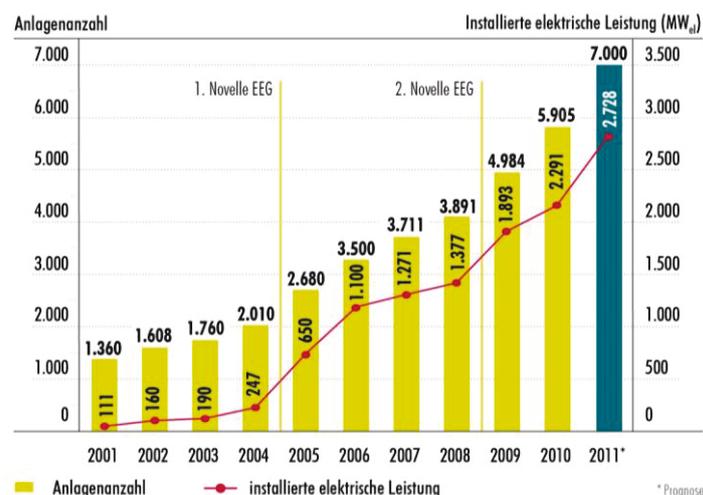


Abbildung 1.1: Entwicklung der Anzahl und der installierten elektrischen Leistung von Biogasanlagen in Deutschland inklusive der Novellierungsdaten des EEG (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 2011).

1.1.2 Sonderstellung von Biogas in den erneuerbaren Energien

Der Ausbau aller regenerativen Energien wird besonders in Deutschland gefordert und gefördert. Im Vergleich zu Wind- und Solarenergie, die von äußeren Einflüssen abhängig und somit nicht regelbar sind, ist der Biogasbildungsprozess diesbezüglich unabhängig. Die Biomasse, die zur Produktion benötigt wird, ist speicherbar und somit ist die Energiegewinnung regelbar. Dieser Vorteil verschafft Biogas somit eine Sonderstellung unter den erneuerbaren Energien. Zudem ist Biogas vielfältig nutzbar. Häufig erfolgt die energetische Nutzung über Verbrennung in Gas- oder Zündstrahlmotoren in Blockheizkraftwerken. Auch der Einsatz von Mikrogasturbinen und Stirlingmotoren zur Generierung von Strom ist möglich (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 2010). Bei dieser Art der Nutzung werden mit den Anlagen Konzepte zur Kraft-Wärme-Kopplung (KWK) entwickelt, da gleichzeitig zur Kraft (hier Strom) Wärme entsteht. Dies beinhaltet eine Nutzung beider entstehender Energieformen und erhöht die Wirtschaftlichkeit der Anlage. Der Strom wird in das öffentliche Stromversorgungsnetz eingespeist und gemäß dem Gesetz für den Vorrang erneuerbarer Energien (EEG) vergütet werden. Die Wärme kann über ein Nahwärmenetz die Biogasanlage sowie naheliegende Wohnhäuser und Stallungen beheizen oder – bei entsprechender Dimensionierung der Anlage - über ein Fernwärmenetz in anderen Bereichen genutzt werden, so beispielsweise in Krankenhäusern, Schwimmbädern etc.. Alternativ ist es auch möglich, das Biogas so zu reinigen, dass es Erdgasqualität erreicht. Mit der Entfernung von Kohlendioxid, Schwefelwasserstoff und Wasserdampf ist eine Einspeisung ins öffentliche Gasnetz oder die Nutzung als Treibstoff für Kraftfahrzeuge möglich (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2007; Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR), 2010).

Bauern und Landwirte produzierten Biogas lange Zeit als Nebenprodukt, um Gülle oder Feldreste verwerten zu können. Aufgrund der lukrativen und gesicherten Vergütung von Biogas sind viele von ihnen zu Energiewirten geworden, die Biogasanlagen statt Landwirtschaft als Erwerbsgrundlage nutzen. Dies macht es notwendig, den Prozess der Biogasbildung nicht zufällig, sondern gezielt ablaufen zu lassen, um die Produktion und damit die Existenz der Unternehmen sicherzustellen. Der Betrieb der Anlagen läuft heutzutage zumeist im mesophilen Temperaturbereich, der Aufbau ist sehr vielfältig, und die Prozesskontrolle basiert auf chemischen Abwasseranalysen. Dazu werden verschiedene Parameter, auf die im Folgenden detaillierter eingegangen wird, an Anlagen offline zumeist auch in externen Laboren untersucht oder physikalische Parameter an der Anlage eingestellt. Sowohl die Deutung der (zeitverzögerten) Ergebnisse sowie die optimalen physikalischen Parameter sind zum heutigen Zeitpunkt nicht systematisch erforscht.

1.1.3 Anaerober Abbau organischer Substanzen

In Biogasanlagen erfolgt der Abbau von organischem Material unter anaeroben Bedingungen und entspricht der technischen Anwendung der anaeroben Nahrungskette. Der syntrophe Prozess ist im Folgenden schematisch dargestellt (Abbildung 1.2).



Abbildung 1.2: Übersicht des Abbaus von organischer Biomasse zu Methan und Kohlenstoffdioxid durch Mikroorganismen im Biogasfermenter.

Der Abbau erfolgt durch eine enge Symbiose verschiedener Bakterien und Archaeen (Kratat et al., 2010). Der organische Abbau bis hin zum Biogas ist ein unter anaeroben Bedingungen stattfindender mikrobieller Prozess zur Energiegewinnung. In Biogasfermentern geht der Gärung eine Hydrolyse der biologischen Makromoleküle durch Bakterien voraus. Die Produkte Acetat, CO_2 und H_2 verwerten dann methanogene Archaeen zur Gasproduktion (CH_4). Der gesamte Prozess funktioniert nur durch eine artenreiche, eng miteinander verzahnte Mikroorganismengemeinschaft, die in syntropher Assoziation in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander stehen muss (Görisch & Helm, 2006).

Anaerobe Abbauschritte

Zu Beginn des Prozesses sind Organismen aktiv, die sowohl im aeroben als auch im anaeroben Milieu leben und in der Lage sind, geringe Sauerstoffmengen zu verwerten. Somit schaffen sie den strikt anaeroben Organismen ein praktisch sauerstoffreies Habitat (Deublein & Steinhauser, 2008). Allgemein werden sie als fakultativ fermentative Bakterien beschrieben (Antranikian, 2006), die in einem ersten Schritt Exoenzyme ausscheiden. Dies ist nötig, da die Substrate, meist wasserunlösliche komplexe Biomoleküle, zur Aufnahme in die Zelle zu groß sind und erst in Monomere (Monosaccharide, Aminosäuren) oder Oligomere (Disaccharide, Oligopeptide) aufgespalten werden müssen (Gerardi, 2003). Im unmittelbaren Anschluss erfolgt die Gärung, in der die entstandenen Monomere zu einer komplexen Mischung, bestehend aus Fettsäuren (FS), CO_2 und H_2 , umgesetzt werden (Bischofsberger et al., 2005). Dies wird von den Organismen durchgeführt, die zuvor die hydrolytischen Enzyme bereitgestellt haben. Die Bakterien dieser Phase werden als Primärgärer bezeichnet und generieren als Stoffwechselprodukte kurzkettige Fettsäuren (Eder & Schulz, 2006). Die längerkettigen Fettsäure-Intermediate und Alkohole können wiederum den sogenannten Sekundärgärern als Nahrung dienen, die beispielsweise Lactat in Acetat und Propionat umwandeln oder Buttersäure mit CO_2 zu Acetat oxidieren (acetogene Fettsäureoxidation) (Fuchs, 2008). Die Verwertung erfolgt bei den primären

Gärungsprozessen überwiegend über Substratkettenphosphorylierung, wobei die entsprechenden Substrate unter Energiegewinn oxidiert und zum Ausgleich der Redoxbilanz gleichzeitig auch reduziert werden. Ihre Endprodukte sind sehr vielfältig (homo- und heterofermentative Milchsäure-Gärung, Buttersäuregärung etc.) und werden im Allgemeinen nach ihrem Produkt benannt. Die Ausbeuteabschätzung kann über freie Energie der Energiestoffwechselreaktionen und die Energie, die zur Synthese von einem Mol ATP benötigt wird, erfolgen. Die Division dieser Werte ermöglicht die Berechnung des auf die verbrauchte Substratstoffmenge bezogenen ATP-Gewinns. Beispielsweise liefert die Propionsäuregärung mit $\Delta G^0 = -162 \text{ kJ/mol}$ bei einer ATP-Bildungsenthalpie von -80 kJ/mol zwei Mol ATP pro Mol umgesetzter Glukose (Thauer et al., 1977).

Der Abbau von intermediär gebildeten FS verläuft stufenweise über die β -Oxidation und wiederholt sich entsprechend häufig, bis die FS zu C2-Verbindungen abgebaut sind (Antranikian, 2006). Je nach Anzahl der C-Atome (geradzahlig oder ungeradzahlig) und/oder Lage und Konfiguration etwaiger Doppelbindungen unterscheidet sich der Abbau geringfügig und kann wie folgt (siehe Abbildung 1.3) dargestellt werden.

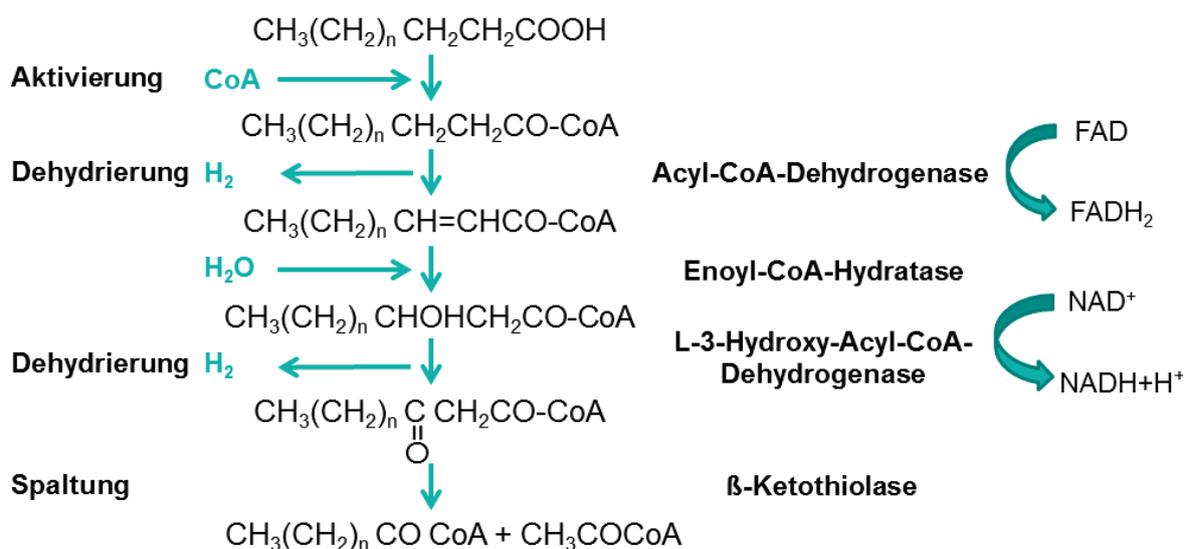


Abbildung 1.3: Fettsäureabbau durch β -Oxidation, modifiziert nach Spies (1986).

Bei jedem Zyklus wird die FS um eine Acetyleinheit (C2) verkürzt bis sie vollständig zu Essigsäure abgebaut ist (bzw. Acetat und Propionat bei ungeradzahligem Substrat).

In syntrophen Kulturen wie in Biogasfermentern ist es thermodynamisch möglich, sowohl bei der Gärung als auch bei der Fettsäureoxidation Wasserstoff zu bilden, da dieser quasi unmittelbar von den Archaeen verbraucht wird. Dies ermöglicht es den gärenden Organismen, durch die Einsparung des Substrates zum Ausgleich der Redoxbilanz mehr Energie pro Mol verfügbares Substrat zu konservieren (Fuchs, 2008). Die vollständige Oxidation der Substrate ist dabei unmittelbar von der direkten H_2 -Verwertung durch

methanogene Archaeen abhängig: Bei einem niedrigen Substrateintrag ist der Wasserstoffpartialdruck in Anwesenheit der Verbraucher gering, wodurch es zu einer Bildung von Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid kommt. Bei einer höheren Substratbelastung stellt sich dagegen ein höherer Wasserstoffpartialdruck ein, und es kommt zur Bildung von länger-kettigen Säuren, wie z.B. Propionsäure und Buttersäure (Bischofsberger et al., 2005). Aus thermodynamischen Gründen ist die β -Oxidation nicht mehr möglich, und es tritt eine Hemmung der Oxidation zu Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff auf (Görisch, 2006). Es reichern sich vermehrt langkettige FS wie (Iso-) Valerian-, Capron- und Oenanthsäure an, so dass der weitere Abbauprozess durch eine Versäuerung gehemmt werden kann (Kaiser et al., 2008). In einem gut funktionierenden Prozess wird der gebildete Wasserstoff dagegen quasi sofort in der Methanogenese verbraucht. Daher funktioniert ein Biogasbildungsprozess nur in enger Lebensgemeinschaft von Bakterien und Archaeen (Bischofsberger et al., 2005).

Methanbildung

Im letzten Schritt, der Methanogenese (Methanbildung), verstoffwechseln obligat anaerobe methanogene Archaeen wie beispielsweise *Methanomicrobiales sp.*, *Methanoculleus sp.* und *Methanosaeta sp.* Acetat oder CO_2 und H_2 unter Energiegewinnung zu Biogas (Klocke et al., 2009). Die Methanogenese stellt den Prozessschritt dar, der am sensibelsten auf Veränderungen der Prozessbedingungen (Temperatur, pH, H_2 -Partialdruck) reagiert und somit am störungsanfälligsten ist (Gerardi, 2003). Des Weiteren weisen die Methanogenen, im Vergleich zu den Bakterien der Acetogenese, eine wesentlich längere Generationszeit auf, wodurch eine optimale Methanproduktion erst nach einer gewissen „Anlaufzeit“ nach entsprechender Biomassebildung möglich wird.

Die Methanproduzenten werden aufgrund ihrer verschiedenen Stoffwechselwege (vgl. Abbildung 1.4) in drei verschiedene Typen von Archaeen unterteilt. 70 % des Methans wird durch die Verstoffwechslung von Acetat durch Mikroorganismen wie zum Beispiel *Methanosarcina sp.* erzeugt (acetoklastische Methanogenese). Die restlichen 30 % entstehen durch die Synthese von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid (hydrogenotrophe Methanogenese) durch z.B. *Methanococcus sp.* (Hecht et al., 2007; Fuchs, 2008). Darüber hinaus können einige wenige Archaeen Ameisensäure, Methanol und andere C1-Verbindungen direkt zum Methangas umsetzen (methylotrophe Methanogenese) (Besgen, 2005).

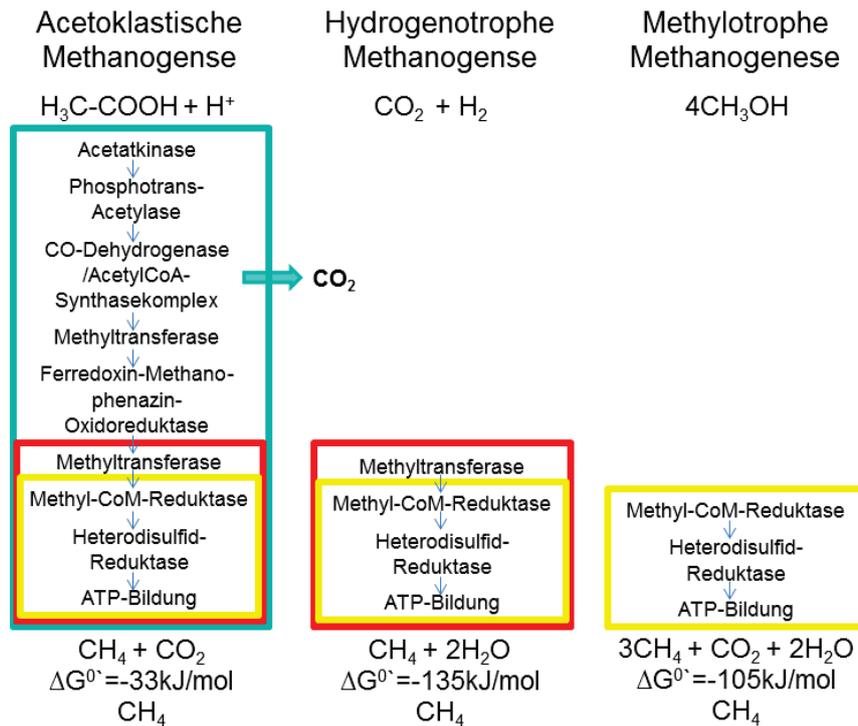


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht der drei methanogenen Stoffwechselwege mit beteiligten Enzymen und Energieausbeuten, modifiziert nach Lui & Whiteman (2008).

Die acetoklastische Methanogenese entspricht dabei einer „intramolekularen“ Gärung (Acetat [$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$] zu CO_2 und CH_4), während die hydrogenotrophe Methanogenese einer anaeroben Atmung mit CO_2 als terminalem Elektronenakzeptor entspricht, wobei Wasserstoff als Elektronendonator und Kohlendioxid als Akzeptor fungieren. Aufgrund der Trennung der elektrischen Ladung durch die Membran erfolgt der Aufbau eines elektrochemischen Membranpotentials, über das ATP generiert werden kann (Thauer et al., 1977; Fuchs, 2008). Die dabei resultierende Energieausbeute ist direkt abhängig von den Redoxpotentialen der Reaktionspartner und der Wasserstoffkonzentration (vgl. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Übersicht über die Standard-Redoxpotentiale einiger biologisch relevanter Systeme (Cord-Ruwisch et al., 1988).

Reactions	ΔG° [kJ/mol H ₂]	E° [mV]
H₂-producing reactions		
$C_6H_{12}O_6 + 4 H_2O \leftrightarrow 2 CH_3-COO^- + 2 HCO_3^- + 4 H^+ + 4 H_2$	-51.5	-681
$CH_3-CHOH-COO^- + 2 H_2O \leftrightarrow CH_3-COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2 H_2$	-2.0	-424
$CH_3OH + 2 H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ + 3 H_2$	+7.7	-374
H₂-consuming reactions		
$4 H_2 + 2 HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CH_3-COO^- + 4 H_2O$	-26.1	-279
$H_2 + S^0 \leftrightarrow HS^- + H^+$	-27.8	-270
$4 H_2 + HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CH_4 + 3 H_2O$	-33.9	-238
$4 H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \leftrightarrow 4 H_2O + HS^-$	-38.0	-217
$4 H_2 + S_2O_3^{2-} \leftrightarrow 2 HS^- + 3 H_2O$	-43.5	-189
$3 H_2 + SO_3^{2-} \leftrightarrow HS^- + 3 H_2O$	-57.2	-118
$H_2 + \text{caffeate} \leftrightarrow \text{Hydrocaffeate}$	-85.5 ^a	+29
$H_2 + \text{fumarate} \leftrightarrow \text{Succinate}$	-86.2	+32
$4 H_2 + NO_3^- + 2 H^+ \leftrightarrow NH_4^+ + 3 H_2O$	-149.9	+363

Values calculated from Thauer et al. (1977). E° of the couples accepting electrons from H₂ was calculated relative to the redox potential of H₂ (-414 mV)

^a Estimated from Grbić-Galić (1985)

Die resultierende Energie aus der anaeroben Atmung ist proportional zur Redoxpotentialdifferenz. Dies hat zur Folge, dass je nach vorhandenen bzw. nutzbaren Elektronenakzeptoren, die Ausprägung verschiedener Organismen in einem Habitat beeinflusst wird. Viele stoffwechselphysiologisch flexible Organismen können ihren Stoffwechsel an thermodynamische Gegebenheiten anpassen (Fuchs, 2008). Unter Betrachtung der thermodynamischen Hierarchie ist die „Nitratatmung“ die effektivste anaerobe Atmung, gefolgt von Fumarat, Sulfat und Schwefel. Am Ende dieser Hierarchie stehen die Methanogenese und die Acetogenese mit CO₂ als Elektronenakzeptor.

1.1.4 Mikroorganismen in Biogasanalgen

Der Biogasbildungsprozess ist, wie zuvor beschrieben, hinsichtlich der chemischen und thermodynamischen Zusammenhänge allgemein bekannt, jedoch sind die einzelnen Einflüsse auf die Organismenarten bisher kaum beschrieben. Dies beruht auf der Tatsache, dass die durchgeführten Untersuchungen an verschiedensten Anlagen bezüglich Größe (von Laborfermenter bis zur Großanlage), Fütterung (Kläranlagen, Gülle, organische Substrate oder Gemische) und Analysemethoden (Datenbank, FISH, *rt* PCR) erfolgt sind. Zudem sind die Organismen im Biogasbildungsprozess bezüglich ihrer unterschiedlichen Aufgaben im Prozess hochspezialisiert, was große Varianzen vermuten lässt (Weiland, 2010).

Erste Untersuchungen bezüglich der dominanten Bakterien in der anaeroben Vergärung beschreiben Amann und Mitarbeiter (1995) sowie Godon und Mitarbeiter (1997), die beide die Gruppen „Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides“ und Proteobacteria als häufige Bakterien herausstellten. Erst später erfolgten Untersuchungen an güllebasierten Anlagen, deren Hauptziel die Biogasgewinnung war. So sind nach Lui und Mitarbeitern (2008) Firmicutes, gefolgt von Bacteroides und Spirochaetes die vorherrschenden Bakterien in Schweinegülle basierten Systemen. Kröber und Mitarbeiter (2009) beschreiben in

Maisanlagen die Phyla Firmicutes, dort insbesondere die Klasse der Clostridia, und Bacteroides als dominant.

Die methanbildenden Archaeen sind ausführlicher erläutert. Raskin und Mitarbeiter beschrieben bereits 1994 die Organismen einer mit Klärschlamm betriebenen Anlage mit Methanosarcinales, Methanomicrobiales und Methanobacteriales. Aktuellere Arbeiten von Klocke und Krakat, die gezielt Biogasanlagen mit Maisvergärung untersuchten, weisen genomische DNA der Ordnungen Methanobacteriales, Methanococales, Methanomicrobiales und Methanosarcinales sowie Euryarchaeota auf (Klocke et al., 2008; Krakat et al., 2010a). Zhang und Mitarbeiter (2011), die güllebasierte Systeme untersuchten, beschreiben ergänzend Crenarchaeota und Methanoculleus, das die Ergebnisse von Lui und Mitarbeiter (2008) und Chouari et al. (2005) bestätigt.

Die Vielzahl der Untersuchungen lassen den Eindruck entstehen, dass der Prozess weitgehend bekannt ist. Doch aufgrund der Vielfalt der Prozessparameter und Substrate sind dies erst erste Einblicke. Zudem erschwert die natürliche Varianz der Substrate eine Vergleichbarkeit. Dennoch weisen die bisher veröffentlichten Daten erste wiederkehrende Tendenzen auf. Dabei muss kritisch betrachtet werden, dass es sich meistens um punktuelle Aufnahmen aus dem Prozess handelt. Es wird in der Regel davon ausgegangen, dass zum Zeitpunkt der Probenahme ein idealer Prozessbetrieb vorlag.

Die Datengewinnung hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die jeweiligen Ergebnisse. Die Identifizierung der Organismen gelingt über gentechnische und molekularbiologische Methoden wie Gendatenbanken. Obwohl die Methoden der verschiedenen Arbeitsgruppen ähnlich sind, erfolgen einzelne Arbeitsschritte wie DNA-Isolierung oder PCR unterschiedlich. Daher ist ein Vergleich der Ergebnisse häufig problematisch und Übertragbarkeiten auf andere Anlagen und Systeme schwierig (Carballa et al., 2010).

Die Erfassung eines Biogasbildungssystems, die Varianz im laufenden Prozess und deren Übertragbarkeit auf andere Anlagen soll in dieser Arbeit untersucht werden, um mit diesem Wissen eine zeitnahe Überwachungsmethode entwickeln zu können.

1.1.5 Molekulargenetische Verfahren zur Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften

Erstellung von Gendatenbanken

Eine Katalogisierung der Organismen kann auf deren Identifizierung und Charakterisierung basieren. Zur Einordnung in Kataloge gibt es einige Modelle, wie die phänotypische, die physiologische und die genotypische Charakterisierung. Die derzeit gültige und zugleich wichtigste taxonomische Klassifikation von *Bacteria* und *Archaea* ist beschrieben im *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity et al., 2003). Dieser Klassifizierung

trägt der Tatsache Rechnung, dass viele der Organismen in syntrophen Lebensgemeinschaften nicht oder nur mit größten Anstrengungen in Reinkulturen gewonnen oder kulturell nachgewiesen werden können. Häufig verwendet man daher in diesem Kontext molekularbiologische Methoden zur Erfassung der bakteriellen Diversität wie die Erstellung von Genbanken in Kombination mit der amplified rDNA restriction analysis (ARDRA), der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE), der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) und der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

Um einen Überblick über die prozesstragenden Organismen zu erhalten, benötigt man ausreichend umfangreiche Datenbanken. Die Erstellung von 16S rDNA Datenbanken ist eine wichtige und häufig verwendete Methode zur Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt in einem komplexen System wie das einer Biogasanlage (Klocke et al., 2007). Die 16S rDNA ist für jeden Organismus unterschiedlich. Sie trägt neben variablen Abschnitten auch Bereiche, die stark konserviert, also sehr stabil und mutationsarm sind. Dabei beruht die Einordnung auf Basis der phylogenetischen Taxonomie, auch als „natürliche“ Taxonomie bezeichnet, auf dem Vergleich der 16S rDNA (Schneider & Fuchs, 2007).

Die Erstellung von 16S rDNA Datenbanken für die Labor-Biogasanlage wurde im Rahmen einer Arbeit von Jülicher (2010) durchgeführt. Die Analysen der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in weiteren methanogenen Reaktoren wurden beispielsweise von Klocke, Fernández, der AG von Prof. Scherer und anderen beschrieben (Fernández et al., 1999; Krakat et al., 2010; Krakat et al., 2010a; Klocke et al., 2007).

Die Vielfalt der Methoden sowie die Variationsmöglichkeiten innerhalb dieser erschweren jedoch den Vergleich der Daten von verschiedenen Arbeitsgruppen. Ebenso ist ein Vergleich der Ergebnisse der Methoden, beispielsweise der bildgebenden FISH und der quantifizierenden *rt* PCR nicht gegeben (Fall, 2002; Ahring, 2003). Somit ist es wichtig, bei zeitlichen Entwicklungen bzw. dem Vergleich verschiedener Prozesse immer identische Methoden zu nutzen. Die Datenbankerstellung bedarf zusätzlich noch einer ausreichend großen Menge an zu untersuchenden Organismen, um mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die prozessrelevanten und dominanten Organismen angeben zu können.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde im Jahr 1969 von zwei Forschergruppen Paradue und Gall sowie John unabhängig voneinander entwickelt (John et al., 1969; Paradue & Gall, 1969). Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische, visualisierende Methode zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren in Gewebeproben, Chromosomen, Zellen oder intrazellulären Strukturen im natürlichen Habitat. Die Vorteile der Methode sind der kultivierungsunabhängige Nachweis, der eine Veränderung der Probe ausschließt, die Schnelligkeit von wenigen Stunden und die niedrigen Materialkosten. Der Nachweis, der

gattungs- oder artenspezifisch erfolgen kann, beruht auf der Paarung von komplementären Nukleinsäure-Einzelsträngen. Die Methode kann gezielt Organismen nachweisen, deren Genom sequentiell bekannt ist. Die Methode wurde bereits von Fall (2002) für Analysen aus Biogasfermentern eingesetzt, um gezielt Organismengruppen oder -arten im Prozess nachzuweisen.

Quantitative *real time* PCR

Die konventionelle PCR besteht aus der Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte und deren Detektion, die zumeist über Elektrophorese, Southern Blot oder ELISA erfolgt. Die Methode der *real time* PCR, die eine Erweiterung der konventionellen PCR ist, ermöglicht eine gleichzeitige Quantifizierung (Bangsow et al., 2002). Heutzutage dient sie hauptsächlich zur Quantifizierung von gentechnisch modifizierten Organismen in der humanen und veterinären Mikrobiologie und wird in der Krebsforschung und -erkennung eingesetzt. Nach Jung kann sie auch zur Detektion und Bestimmung der vorherrschenden Bakterien genutzt werden (Jung et al., 2000).

Die Methode der *real time*-quantitativen-PCR ist 1992 von Higuchi und Mitarbeitern entwickelt worden (Higuchi et al., 1992). Die Methode, die häufig auch unter den Abkürzungen RTq-PCT, qRT-PCR, *real time* Detection-PCR etc. beschrieben wird, ist mittlerweile eine etablierte, präzise, automatisierte, schnelle und sensitive Methode zur Genquantifizierung (Heid et al., 1996; Jothikumar & Griffiths, 2002).

Zur Detektion existieren in der Literatur zwei Ansätze: einerseits können fluoreszierende Farbstoffe genutzt werden, die sich unspezifisch in jede doppelsträngige DNA während der Amplifikation einlagern. Andererseits können sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide eingesetzt werden, welche sich nur an eine Region des Zielgens binden. Beispiele für unspezifische Farbstoffe sind SYBR Green oder Ethidiumbromid. Der Vorteil dieser Anwendung ist das bis zu 1000fach intensivere Fluoreszenzsignal im Vergleich zu nicht-interkalierenden Farbstoffen. Des Weiteren zeichnet sie sich durch ihren universellen Einsatz aus und ist, da sie ohne markierte sequenzspezifische Sonden auskommt, auch weniger kostenintensiv. Der Nachteil dieser Methode ist die unspezifische Bindung an eventuelle Primerdimere, die erst nach Abschluss der PCR über eine Schmelzkurve erkannt werden können (Bangsow et al., 2002; Jothikumar & Griffiths, 2002).

Die Quantifizierung von Organismen in Biogasfermentern ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Methode, um festgelegte und aufgrund ihrer Basenabfolge bekannte Organismen untersuchen zu können. Die Häufigkeit ermöglicht einen Rückschluss auf die Abundanz der Spezies zum Zeitpunkt der Probennahme. Die metabolische Aktivität kann mit der Abundanz jedoch nicht korreliert werden.

1.1.6 Sensitivität der Mikrobiologie

Sind die prozessrelevanten Organismen anhand der zuvor aufgeführten Methoden bestimmt, sind die Stoffwechselaktivität und die Sensitivität noch nicht bekannt. Diese Einflüsse sollen am Beispiel von Fettsäuren in parallelen, zeitgleichen Versuchen in dieser Arbeit untersucht werden. Erste Experimente diesbezüglich wurden von Ahring (2003a) durchgeführt, die FS-Abbau und die Gasbildungsrate korrelierte. Da die komplexen Zusammenhänge zwischen physikalischen und chemischen Parametern und der Mikrobiologie noch nicht systematisch im kontinuierlichen Betrieb untersucht worden sind, erfolgten Untersuchungen in einem eigens dafür entwickelten Parallelfermentersystem. Eine Quantifizierung der Organismen, gepaart mit dem Abbau der wichtigen Intermediärprodukte (FS) sowie der Gasbildungsrate inklusive Methananteil ermöglichen Rückschlüsse auf die Prozessstabilität und die Organismenaktivität. Zudem weisen solche Ergebnisse den Rahmen auf, in dem eine zukünftige Überwachung zeitlich und sensitiv reagieren muss. Durch dieses Wissen kann die Auswahl eines Organismus erfolgen, der als Indikatororganismus auf den Biosensor immobilisiert werden soll und damit als zeitnahe Prozessüberwachung dienen kann. Anforderungen an einen solchen „Indikatororganismus“ sind das Vorkommen und eine gute metabolische Aktivität in möglichst allen Biogasfermentern, die Möglichkeit der Kultivierung, ein Stoffwechsel, der säurebildend oder säureverwertend ist und eine Immobilisierung.

1.1.7 Entwicklung eines organismenbasierten Biosensors

Zellbasierte lichtadressierbare Biosensoren

Sind die prozessrelevanten Organismen bekannt, kann eine biologische Überwachungsmethode mit diesen Organismen erprobt werden. Die Idee, die von Herrn Prof. Schöning und Herrn Prof. Baumann entwickelt wurde, ist die direkte Erfassung des „Zustands“ von Prozessorganismen anhand deren metabolischer Aktivität mit einem Biosensor (siehe Abbildung 1.5), um den Prozess effizienter beeinflussen zu können. Die Vorteile einer solchen Methode, die in- oder atline an der Biogasanlage erfolgen könnte, ist eine orts- und zeitnahe Analyse ohne Probenvorbereitung und Laborinfrastruktur. Außerdem erwartet man bei dieser Methode keine Einschränkung hinsichtlich einer möglichst schnellen Detektion von Änderungen der Prozessparameter aufgrund der starken Pufferung des Mediums in Biogasanlagen.

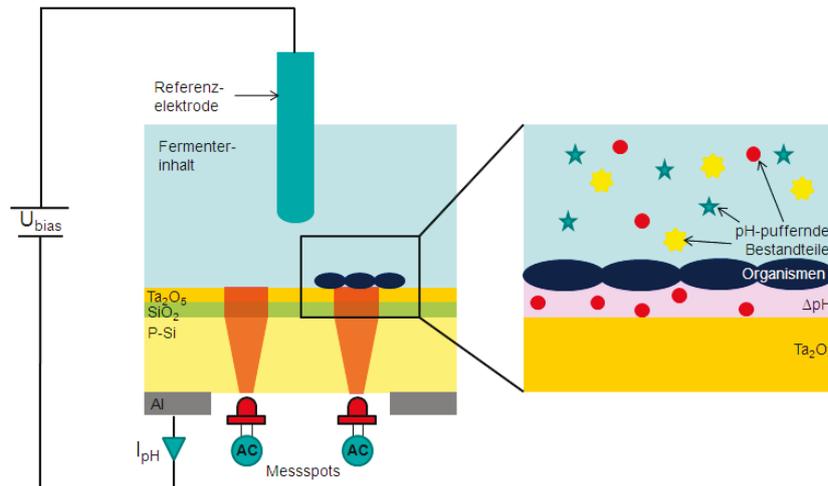


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des lichtadressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS) auf Feldeffektbasis nach Werner et al. (2011). Über einen Bakterienrasen lässt sich die Ansäuerung unter dem Bakterienrasen unter Umgehung der puffernden Bestandteile aus der Fermentationsbrühe messen.

Biosensoren sind Sensoren, die mit einer biologischen Komponente (z.B. Enzyme oder lebende Zellen) ausgestattet sind und somit Umgebungsgrößen erfassen können. **Lichtadressierbare potentiometrische Sensoren (LAPS)**, wie in dieser Arbeit verwendet, werden zwischenzeitlich für eine Vielzahl von chemischen und biologischen Anwendungen genutzt. In den 90er Jahren hat die Firma Molecular Devices (USA) ein auf dem LAPS-Prinzip basierendes „Microphysiometer“ kommerziell vertrieben, mit dem unter nicht-invasiven Umgebungsbedingungen ein Monitoring physiologischer Prozesse in Zellen, insbesondere deren metabolische Aktivität, möglich wurde (Hafner, 2000). Das Prinzip zielt auf die Detektion von metabolischen Produkten ab, die von lebenden Zellen als Stoffwechselprodukte abgegeben werden und welche als Analyten vom Sensor entsprechend erfasst werden können (siehe Abbildung 1.6).

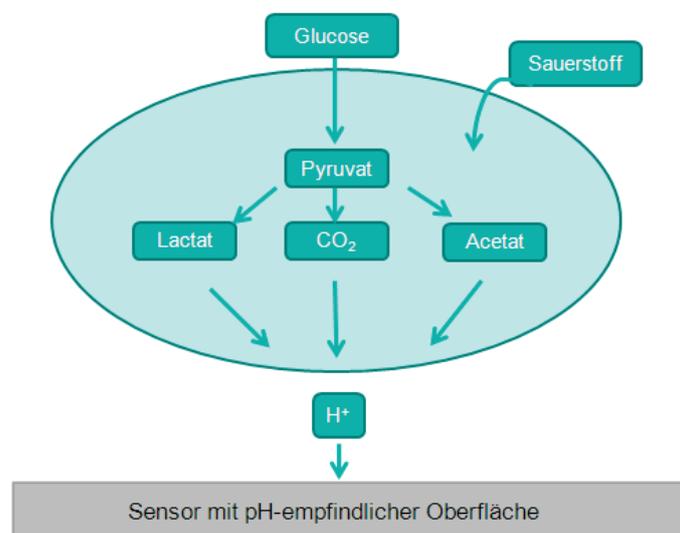


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer Zelle, die den Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität und Messsignal zeigt (Owicki & Parce, 1992).

LAPS ermöglichen eine orts aufgelöste, sensitive Messung an den einzelnen Messpunkten des Sensors. Des Weiteren liefern diese Sensoren ein sofort verwertbares elektrisches Signal.

Immobilisierungsstrategien

Zur Realisierung der Überwachungsmethode mittels Detektion der metabolischen Aktivität von Organismen mit einem LAPS muss gewährleistet sein, dass sich genügend Organismen direkt an der Sensoroberfläche befinden. Eine Maßnahme ist die Immobilisierung der Mikroorganismen, wozu in der Literatur verschiedene Arten der Immobilisierung beschrieben sind (Fukui et al., 1982; Scott, 1987).

Als Immobilisierung bezeichnet man die räumliche Fixierung von Bakterien, Enzymen, Zellen etc. (Bickerstaff, 1997), die durch physikalische oder chemische Methoden in eine unlösliche oder reaktionsraumbegrenzte Form gebracht werden. Die Methoden dazu gliedern sich in zwei Hauptverfahren, die Immobilisierung durch Kopplung und die Immobilisierung durch Einschlussverfahren. Bei der Immobilisierung durch Kopplung wird unterschieden zwischen Trägerbindung und Quervernetzung, die ihrerseits wieder weiter unterteilt werden. Die Einschlussimmobilisierung gliedert sich in die Matrixeinhüllung und die Membranabtrennung ebenfalls mit weiteren Spezifizierungen (Hartmeier, 1985). Eine Übersicht der Methoden ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

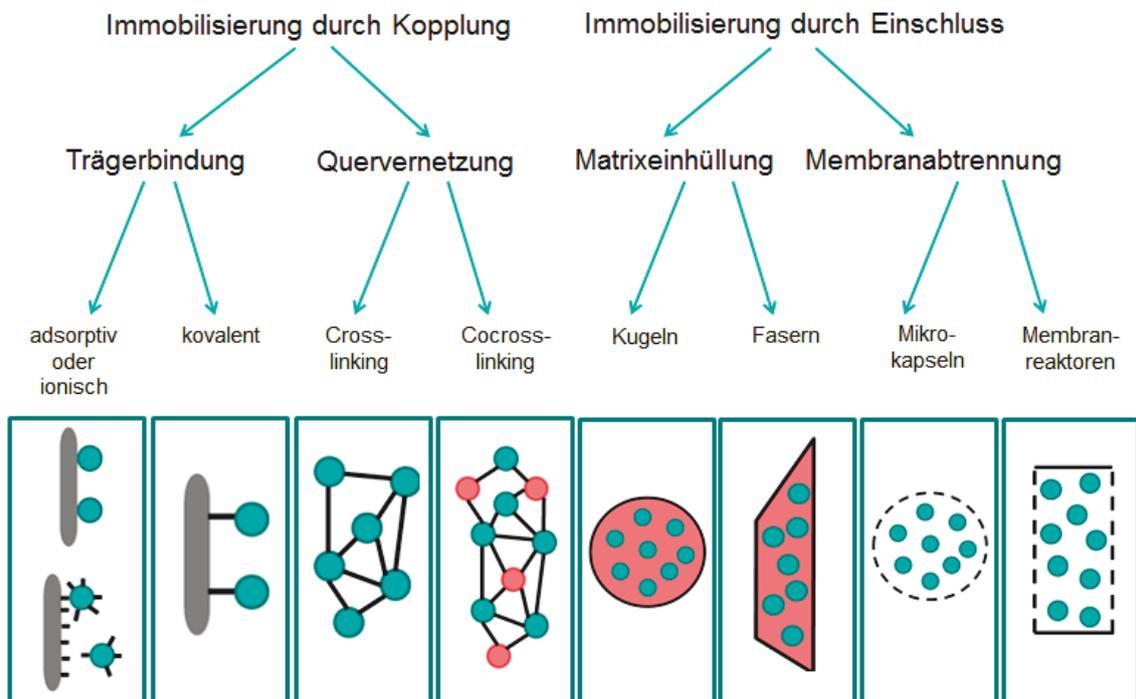


Abbildung 1.7: Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Immobilisierung; links: Immobilisierung durch Kopplung, meist chemisch; rechts: Immobilisierung durch Einschluss mittels physikalischer Methoden.

Die Immobilisierung durch Ankopplung zählt zu den chemischen Verfahren der Anbindung eines Trägers an die Oberfläche. Diese kann auf Basis der natürlichen Adhäsion, ionischer oder kovalenter Bindung sowie der Immobilisierung durch Quervernetzungen untereinander über Crosslinking und Ko-Crosslinking mit Hilfe von Inertproteinen erfolgen (Hartmeier, 1985).

Die Immobilisierung durch Einschluss hingegen ist eine physikalische Methode. Dazu zählen die Adsorption an ein poröses Material, der Einschluss mittels einer Dialysemembran, die Membranabtrennung in Membranreaktoren oder in Form von Mikroverkapselung und die Einschlussimmobilisierung durch Matrixeinhüllung in einer Gelmatrix in Form von Kugeln oder Fasern (Hartmeier, 1985). Die wichtigsten Formen der Einschlussimmobilisierung sind die Ganzzellimmobilisierung und die Adsorptionsimmobilisierung für Enzyme. Dabei erfolgt die Fixierung in polymere Netzwerke wie Hydrogele aus Polymer- und Wasseranteilen. Dazu werden Organismen in natürliche oder synthetische Polymere mit gelartiger Struktur eingebettet. Die in der Literatur beschriebenen Gelimmobilisierungsmethoden sind sehr vielseitig (Christensen & Characklis, 1990).

Die Ziele der Immobilisierung für den Sensor in der vorliegenden Arbeit waren neben Stabilität der Fixierung eine gute Diffusion der Substrate und Produkte, eine Langzeitstabilität und dass der Stoffwechsel der Organismen durch die Immobilisierungsmethode nicht beeinflusst wird.

1.2 Motivation und Zielsetzung

Ziel und Motivation der vorliegenden Arbeit war es, ein besseres Verständnis des Biogasbildungsprozesses hinsichtlich der Mikrobiologie und der wechselseitige Beziehung zwischen den prozesstragenden Mikroorganismen und den physikalischen und chemischen Parametern zu erlangen. Die Idee, über diese Erkenntnisse eine zeitnahe und sichere Kontrollmethode auf Basis eines Sensors zu entwickeln, wurde im Projektantrag „Bio-LAPS“ von den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Schöning und Herrn Prof. Baumann entwickelt (Projektantrag Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) (Förderkennzeichen 22026407)). Die Kernidee ist die Entwicklung eines Sensors, der aufgrund von darauf immobilisierten Organismen, die aufgrund ihres Stoffwechsels eine pH-Wert Änderung hervorrufen, auf die metabolische Aktivität zurückzuschließen. Bei der Verwendung von prozesstragenden Organismen aus dem Biogasbildungsprozess ermöglicht dieser Messaufbau eine orts- und zeitnahe Erfassung der mikrobiologischen Aktivität. Die vielfältigen Arbeiten teilten sich dabei, wie in Abbildung 1.8 dargestellt, in die drei Arbeitspakete (AP) auf, die interdisziplinär von den beiden Arbeitsgruppen bearbeitet werden.

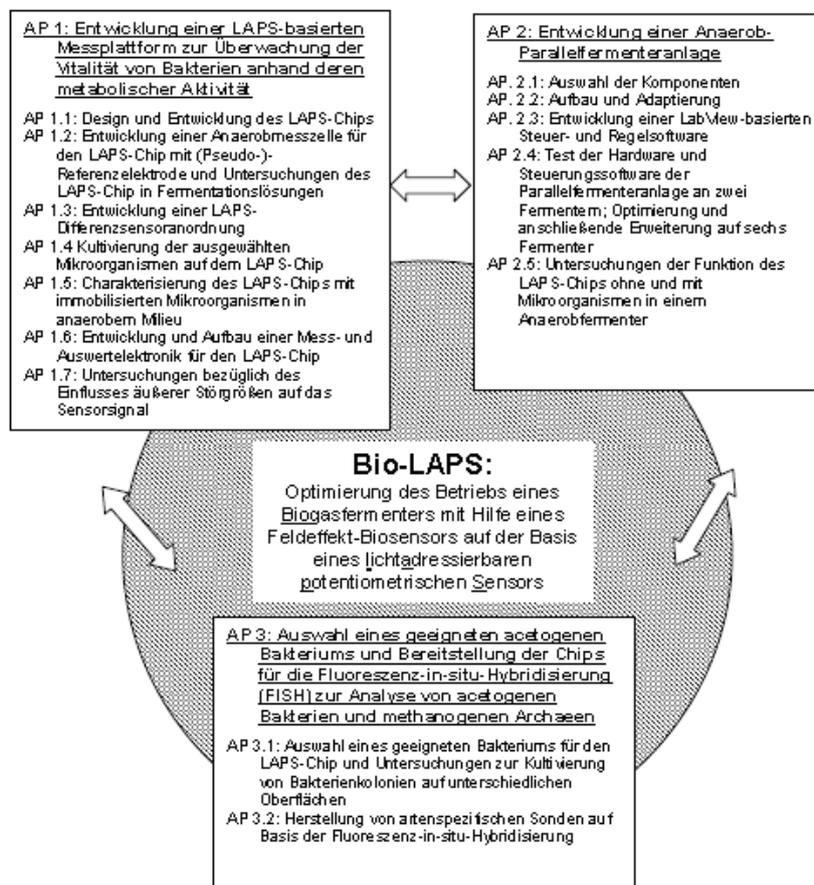


Abbildung 1.8: Strukturplan des Projektes "Bio-LAPS", dessen Idee die Entwicklung eines Sensors zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen für den Biogasbildungsprozess ist.

Die Sensorherstellung und Entwicklung (AP 1) erfolgte in der AG Schöning. Nur die Kultivierung und Immobilisierung der Organismen, deren Stoffwechselaktivität gemessen werden sollte, erfolgte in der AG Baumann/Selmer.

Der Aufbau der Parallelanlage (AP 2) erfolgte in direkter Zusammenarbeit beider Arbeitsgruppen, unterstützt durch die Diplomarbeiten von Marc Reimann, Niklas Jörres, Florian Jansen und Katharina Kaspers. Dieses System, bestehend aus sechs Fermentern, ermöglicht systematische Untersuchungen bezüglich chemischer, physikalischer und biologischer Parameter des Biogasbildungsprozesses und ermöglicht Rückschlüsse auf den Prozess, da in diesem Aufbau einerseits Substrat, Umgebungstemperatur und –druck sowie Aufbau und Betriebsweise für alle Reaktoren identisch sind, andererseits aber auch einzelne Parameter gezielt geändert und verfolgt werden können.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist das Arbeitspaket 3, in dem die Organismen des Biogasbildungsprozesses anhand der laboreigenen Biogasanlage mit molekularbiologischen Methoden identifiziert wurden. Über den Projektantrag hinaus wurden quantifizierende Methoden wie Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und quantitative *real time* PCR etabliert, um Organismenkonzentrationen über die Prozesslaufzeit bzw. in verschiedenen Anlagen erfassen können.

Das Parallelfermentersystem aus AP 2 und das Wissen um die Mikrobiologie aus AP 3 ermöglicht eine Gesamtbetrachtung des Biogasbildungsprozess. Somit können direkte Zusammenhänge bezüglich der eingestellten Faktoren auf Organismenzusammensetzung, Gasqualität, Gasquantität, Intermediärprodukte (z.B. FS) etc. festgestellt werden und damit zu einem tieferen Prozessverständnis beitragen. Der Sensor komplementiert die Ergebnisse, da nur so die Stoffwechselaktivität bestimmt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Analyse der Prozessorganismen

2.1.1 Analyse der dominanten Organismengruppen

Um den Prozess der Biogasbildung genau beurteilen zu können, wurde in einem ersten Schritt eine 10 L güllebasierte Laborbiogasanlage hinsichtlich der Mikroflora untersucht. Dazu wurden unter Verwendung von standardisierten gentechnischen Methoden, auf die im Weiteren detailliert eingegangen wird (vgl. Abbildung 2.1), zwei Datenbanken der 16S rDNA aufgenommen. Im Anschluss wurde auf Basis dieser Daten die Methode FISH und *real time* PCR zur Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Zeit, der Substratspezifität bei Großanlagen sowie der Störeffindlichkeit bezüglich kurzkettiger organischer Säuren getestet.

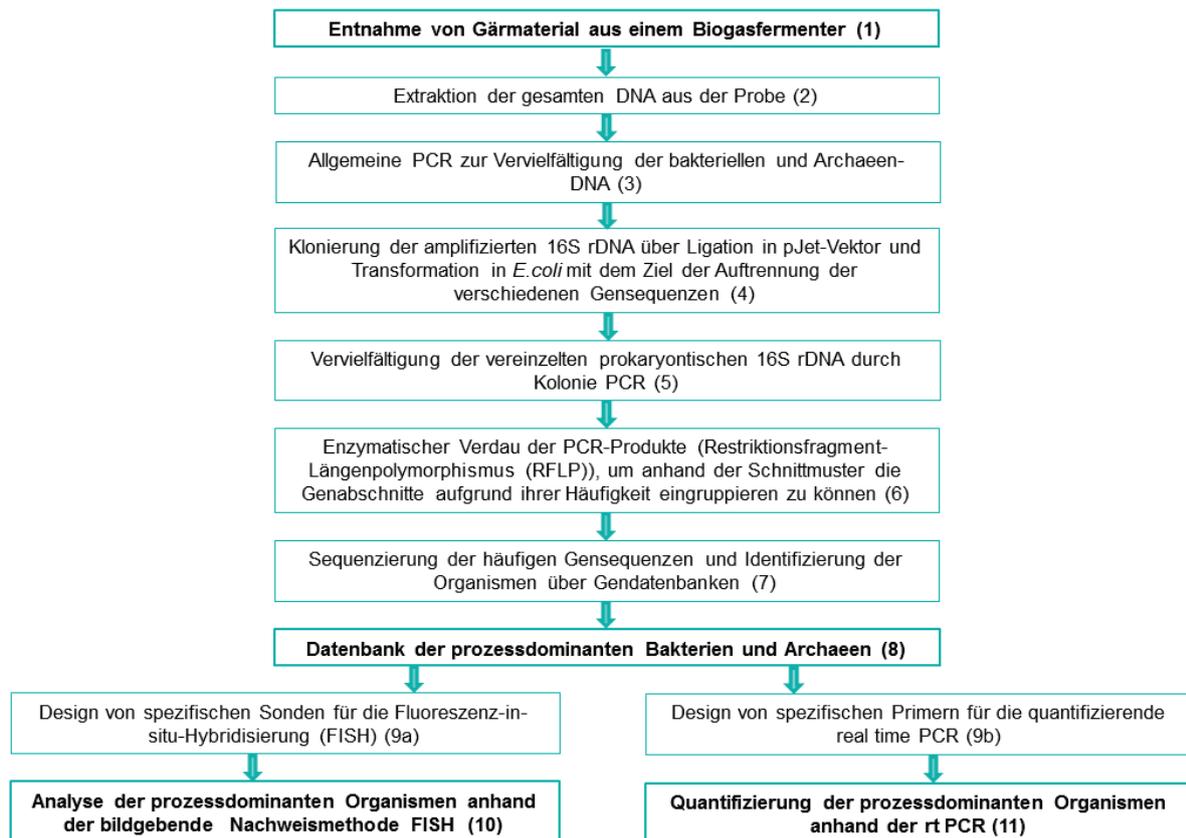


Abbildung 2.1: Ablaufschema der Arbeitsschritte zur Erstellung einer 16S rDNA Datenbank mit anschließendem Nachweis der Organismen anhand von FISH und *rt* PCR.

DNA-Extraktion

Zur Erstellung von 16S rDNA-Datenbanken für die Domänen *Bacteria* und *Archaea* wurde aus dem sich im Betrieb befindlichen Biogas-Laborfermenter (güllebasiert) eine Probe von 1 mL entnommen, um die genomische DNA zu isolieren. Dies erfolgte mit dem innuPREP

stool DNA Kit von Analytik Jena. Dazu wurde die frische Probe im Verhältnis 1:4 mit Leitungswasser verdünnt. Die Arbeiten erfolgten laut Originalprotokoll „*Protocol 1: Isolation of bacterial DNA from stool samples*“. Die Konzentrationsmessung der isolierten DNA erfolgte mit dem Nanodrop 1000 Spectrophotometer (PeqLab) (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 1 und 2).

Vervielfältigung der prokaryontischen 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion

Da zur Erstellung der Datenbank eine größere Menge DNA benötigt wird, wurde gezielt die bakterielle als auch Archaeen-DNA über PCR vervielfältigt (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 3). Die PCR erfolgte im Eppendorf Mastercycler epgradient S. Alle Chemikalien stammten von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Als Primer, synthetisiert von der Firma Thermo Fisher Scientific, wurden allgemeine Bakterien- bzw. Archaeenprimer genutzt (vgl. Tabelle 2.1). Die Protokolle sowie die Programme der PCR wurden zuvor für die Bakterien- bzw. Archaeen- 16S rDNA entsprechend optimiert (siehe Anhang Tabelle 7.1 – 7.4).

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten allgemeinen Primer zur Vervielfältigung der bakteriellen und Archaeen-DNA.

Ansatz	Name	Sequenz (5´nach 3´)	Quelle
Bakterien forward	GM3F	AGA GTT TGA TCM TGG C	Ansedo, 2001
Bakterien reverse	GM4R	TAC CTT GTT ACG ACT T	
Archaeen forward	A571F	GCY TAA AGS R5C CGT AGC	Baker, 2003
Archaeen reverse	UA1204R	TTM GGG GCA TRC 5KAC CT	

Die PCR-Produkte, die mittels Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung überprüft wurden, hatten eine Größe von ca. 1500 bp bei Bakterien und ca. 700 bp bei Archaeen. Anschließend erfolgte eine Reinigung nach Herstellerprotokoll mit dem Hi Yield[®] Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (SLG[®]). Die Konzentrationsmessung der PCR-Produkte wurde mit dem Nanodrop 1000 Spectrophotometer (PeqLab) durchgeführt.

Klonierung der amplifizierten 16S rDNA

Die Produkte der PCR, die aus Gemischen von bakterieller bzw. archäaler DNA bestanden, mussten aufgrund ihrer Sequenz unterschieden werden. Um die Gemische zu separieren, wurden die PCR-Fragmente zuerst in einen Vektor ligiert, dann in *E. coli* transformiert und somit vereinzelt (vgl. Abbildung 2.1, Schritte 4). Beide Schritte erfolgten mit dem CloneJET[™] PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Vor der Ligation wurden die aus der PCR mittels Taq-Polymerase entstandenen A-Überhänge über die enzymatische Reaktion entfernt („*Sticky-End Cloning Protocol*“ nach Herstellerangaben). Die Ligation des aufgereinigten PCR-Produktes

erfolgte in den pJET1.2/blunt Vektor (Abbildung 2.2), wobei auf ein molares „Vektor zu Insert“-Verhältnis von 1:3 bis 1:7 geachtet wurde.

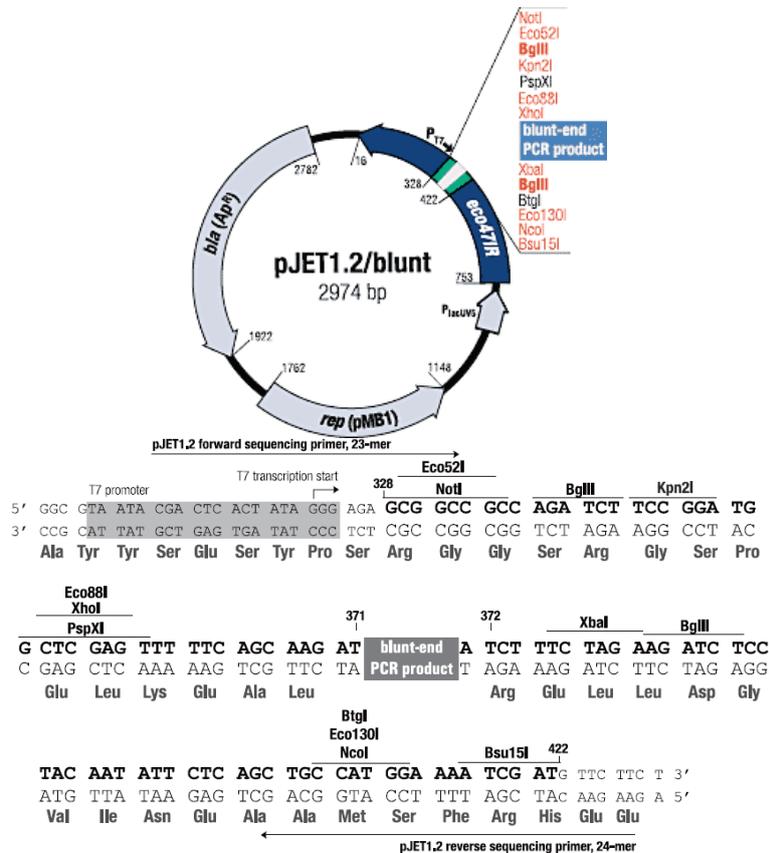


Abbildung 2.2: oben: pJET1.2/blunt Vektorkarte; unten: DNA-Sequenz der multiple cloning site (MSC)-Region (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011).

Nach der erfolgreichen Ligation erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5- α Zellen. Dazu wurden 10 μ L der Ligationslösung auf Eis gestellt und die kompetenten Zellen von -80 °C auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 μ L Zellen zu dem Ligationsansatz gegeben und nach erneuter zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen, schnell auf Eis abkühlt, 900 μ L LB-Medium hinzugegeben und die gesamte Suspension nach 1 min auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/mL Ampicillin zu je 100 μ L ausplattiert. Eine Inkubation der Platten folgte bei 37°C üN. Die entstandenen Kolonien wurden von den Platten gepickt und in 20 μ L Reinstwasser resuspendiert.

Vervielfältigung der vereinzelt prokaryontischen 16S rDNA durch Kolonie PCR

Im Anschluss an die Vereinzelung der Genabschnitte, die jetzt in *E. coli* vorlagen, erfolgte erneut eine Vervielfältigung des Materials, bevor es zur Sequenz- und damit zur Organismenbestimmung kam (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 5). Dazu wurde von jedem gepickten Klon eine Kolonie-PCR durchgeführt, um ausreichende Mengen der vereinzelt 16S rDNA der Mikroorganismen für weitere Analysen zu erhalten. Zusätzlich diente die

Methode als Kontrolle der Ligation, ob zuvor überhaupt ein PCR-Fragment erfolgreich in den Vektor ligiert worden war. Das Insert im Vektor wurde hier durch vektorspezifische Primer, die um die MCS-Region (vgl. Abbildung 2.2) des Vektors greifen, vermehrt. Als *Forwardprimer* wurde pJET1.2 *forward sequencing primer* 5' - CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC - 3' und als *Reverseprimer* pJET1.2 *reverse sequencing primer* 5' - AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG - 3' (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011) verwendet. Das Programm der Kolonie-PCR wurde für die zu amplifizierenden Größen der 16S rDNA der Archaeen und Bakterien entsprechend angepasst (siehe Anhang Tabellen 7.5 und 7.6). Die Produkte der Kolonie-PCR wurden stichprobenartig auf Vorhandensein des Inserts über Agarosegelelektrophorese untersucht.

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Nachdem sichergestellt war, dass PCR-Fragmente erfolgreich ligiert worden waren und in ausreichender Menge vorlagen, erfolgte ein enzymatischer Verdau der Proben (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 6). Dieser ermöglicht eine Einteilung der PCR-Fragmente in phylogenetische Gruppen. Dazu wurden die Produkte der Kolonie-PCR nacheinander zuerst mit den Restriktionsenzymen *Hae III* und dann mit *Msp I* (beides Fermentas) in Fragmente geschnitten, um im Weiteren die Schnittmuster vergleichen und gruppieren zu können. Der erste Verdau erfolgte mit *Hae III* (5U), Puffer R und 5 µL PCR-Produkt in einem Gesamtansatz von 15 µL bei 37 °C für eine Stunde. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Länge der entstandenen DNA-Fragmente mittels des Chip-Elektrophoresegerätes MultiNA (Shimadzu). Die Chemikalien der Kit-Systeme, jeweils abgestimmt auf die maximale Fragmentlänge der verdauten PCR-Produkte, sowie ein mit 1 %igem SYBR gold versetztem Puffer ermöglichten eine Auswertung über die MultiNA Control & Viewer Software. Dazu wurden die Schnittmuster aufgrund ihrer Fragmentlängen in Microsoft EXCEL in Muster eingruppiert. Zur Bestätigung der Homologie von Verdaumustern wurden ähnliche Schnittmuster nach gleichem Ansatz mit *Msp I* verdaut, aufgetrennt und ausgewertet.

Sequenzierung und phylogenetische Analyse

Um die verschiedenen RFLP-Muster der allgemeinen mikrobiellen Phylogenie zuordnen zu können, wurde jeweils ein Vertreter jedes RFLP-Musters ausgewählt und über die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) anhand dessen Basenabfolge sequenziert (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 7). Zuvor wurde die Probe mittels Hi Yield[®] Gel /PCR DNA Fragments Extraction Kit (SLG[®]) aufgereinigt. Die Kontrolle der gereinigten Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch.

Die unterschiedlichen Sequenzen, jeweils als operative taxonomische Einheiten (*operational taxonomic units*, (OTU)) beschrieben, wurden für eine taxonomische

Einordnung mit den Einträgen in der EMBL Nucleotide Sequence Database unter Verwendung der BLASTN-Software verglichen. Die Gendatenbankeinträge mit den höchsten phylogenetischen Übereinstimmungen wurden für die Erstellung von phylogenetischen Bäumen verwendet. Es wurden zusätzlich 16S rDNA-Sequenzen von Typenstämmen repräsentativ für die gefundenen Gattungen als Referenz ausgewählt. Die Durchführung der Konstruktion von den phylogenetischen Bäumen der unterschiedlichen Gattungen erfolgte mit der Software Mega Version 4.0 (Tamura et al., 2007; Kumar et al., 2008). Unter Verwendung der *neighbour-joining* Methode (Saitou & Nei, 1987) konnte die Ähnlichkeiten der Organismen zueinander dargestellt werden.

Die Datenbankerstellung (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 8) erfolgt nur für Sequenzen, die mindestens viermal in den Untersuchungen nachgewiesen worden waren. Diese sequenzierten und identifizierten Organismen wurden anhand ihrer Verwandtschaftsverhältnisse und Häufigkeiten zusammengefasst.

2.1.2 Design von Primern und Sonden

Aufgrund der Ergebnisse der Identifizierung der prozesstragenden Organismen von Jülicher (2010) wurden zur weiteren schnelleren Analyse der Organismen Gensonden und Primer von den Sequenzen der dominanten Organismen abgeleitet, um diese für die Methoden der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und *real time* PCR nutzen zu können (vgl. Abbildung 2.1, Schritt 9a und 9b). Das Design erfolgte, indem aus den Einträgen der Gendatenbank mit den höchsten phylogenetischen Übereinstimmungen multiple Alignments durch Nutzung der Website www.workbench.sdsc.edu (Version 3.2) mit der Funktion „CLUSTALW – *Multible Sequence Alignment*“ konstruiert wurden. Anhand dieser Alignments wurde die Basenabfolge des identifizierten Organismus auf Unterschiede zu den zehn genetisch Ähnlichsten untersucht. Die Auswahl jeweils zwei dieser Regionen dienten als Sequenzen zum Designen der für den identifizierten Organismus spezifischen Primer. Besondere Beachtung lag dabei darauf, dass beide Primer zwischen 18 und 21 bp lang waren und eine ähnliche theoretische Schmelztemperatur aufwiesen. Die Synthese erfolgte durch Thermo Scientific Biopolymers.

Tests der Primersequenzen

Nach dem Design der Primer wurde die PCR für jedes Primerpaar optimiert, gefolgt von einem Test auf Monoklonalität. Dieser diente als Beweis dafür, dass die Primer spezifisch auf nur einen Organismus greifen und keine weiteren Organismen ebenfalls komplementäre Sequenzen zur ausgewählten Sequenz aufweisen. Tests erfolgten von jedem entwickelten Primer anhand einer PCR mit DNA-Isolat aus der Biogasanlage mit anschließendem enzymatischen Verdau des PCR-Produktes. Dabei wurde das Enzym so gewählt, dass es

- wie bei seiner theoretischen Verdausimulation gezeigt - ein eindeutiges Schnittmuster ergibt. Dieses wurde mit dem frei zugänglichen Programm „pDRAW32“ virtuell dargestellt. Das Enzym erzeugt idealerweise nicht zu viele Fragmente, damit eine gute Auftrennung möglich ist. Zudem sollte das Schnittmuster aber auch spezifisch genug sein, um eventuelle Fehlsequenzen erkennbar zu machen. Die Ansätze der Verdaue waren immer identisch (vgl. Tabelle 2.2), einzig das Enzym variierte.

Tabelle 2.2: Ansatzprotokoll für einen Verdau von PCR-Produkten.

Chemikalien	Konzentration	Hersteller
Enzym	5 U	Fermentas
Puffer (anhängig von Enzym)	1-fach	Fermentas
PCR-Produkt	5 µL	

Die entstandenen Fragmente wurden über die Chipelektrophorese detektiert. Zur Bestätigung der Monoklonalität erfolgte ein Vergleich des theoretischen und praktischen Verdaus. Die Ergebnisse mussten weitestgehend identisch sein und keine weiteren DNA-Banden aufweisen, damit dieses Primerpaar als spezifisch und funktional gelten konnte. Im Anschluss daran wurde von einer Primersequenz eine gelabelte Sonde für die Identifizierung mittels FISH angefertigt.

2.1.3 Analyse der Organismenverteilung anhand der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), die eine Methode zur schnelleren Identifizierung von Mikroorganismen im jeweiligen Milieu darstellt, wurde zur Etablierung mit Referenzorganismen in Reinkultur durchgeführt. Dazu zählten die unten aufgeführten Reinkulturen (Tabelle 2.3). Dies war notwendig, um die Visualisierung der Organismen aufgrund von Leuchteigenschaften und Eigen- bzw. Autofluoreszenz richtig beurteilen und um sie im weiteren auch später von einer Hybridisierung unterscheiden zu können.

Zur Identifizierung wurden sowohl arten- als auch gruppenspezifische Sonden genutzt. In Tabelle 2.3 sind die in der Literatur beschriebenen und verwendeten Sonden mit Fluoreszenzlabel aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete, in der Literatur beschriebene Oligonucleotidsonden mit Zielorganismus, Label und Sequenz.

Zielorganismus	Sonde mit Label	Sequenz (5' nach 3')	Quelle
Bakterien (allgemein)	EUB388 - Cy 3 & Rhod. green	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann et al., 1990
Archaeen (allgemein)	ARC915 - Cy 3 & Rhod. Green	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Raskin et al., 1994
Archaeen (allgemein)	ARC344 - Cy 3	TCG CGC CTG CTG CCC CCG T	Raskin et al., 1994
<i>Methano- sarcinaceae</i>	MSMX860 - Cy 3 & Rhod. green	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	Raskin et al., 1994
<i>Methanosaeta concilii</i>	Mst 702 - Cy 3	TAA TCC TYG ARG GAC CAC CA	Yo et al., 2005

Ergänzend wurden Organismen mit spezifischen Sonden untersucht, die basierend auf den erstellten Datenbanksequenzen entworfen wurden. Diese Sequenzen sind in Tabelle 3.3 (Seite 39) dargestellt.

Die Methode gliedert sich in verschiedene Arbeitsschritte, welche individuell auf die oben gelisteten Sonden sowie das Probenmaterial aus Biogasfermentern optimiert wurden. Als Grundlage diente immer das Vorgehen, das Amann und Mitarbeiter (1990a) beschreiben. Die einzelnen Protokolle, optimiert für jede spezifische Sonde, sind in den Diplom- und Bachelorarbeiten von Nathalie Mäder (2009), Annika Jülicher (2010) und Kristina Schiffer (2011) beschrieben.

Nach Trocknung und Zugabe von Immersionsöl wurden die Proben mittels Umkehrmikroskop mit Fluoreszenzeinheit (Fa. Leica DM IRB) betrachtet. Die Bearbeitung der Bilder sowie die Überlagerung verschiedener Aufnahmen erfolgten mit der Software „MacBiophotonics ImageJ“.

2.1.4 Quantifizierung der Organismen mittels *real time* PCR

Als quantifizierende Methode wurde die *real time* PCR ausgewählt. Diese dient der zahlenmäßigen Erfassung der untersuchten Genabschnitte und ermöglicht damit, den Status einer Anlage oder Veränderungen bezüglich der untersuchten Organismen zu ermitteln (vgl. Abbildung 2.1; Schritt 11).

Zur Generierung der DNA wurde die genomische DNA aus einem Milliliter einer Biogasfermenterprobe mittels immuPREP stool DNA Kit von Analytik Jena isoliert. Nachdem die Probe 1:4 mit Leitungswasser verdünnt worden war, erfolgten die Arbeiten laut Originalprotokoll „*Protocol 1: Isolation of bacterial DNA from stool samples*“. Nach einer Konzentrationsmessung der gesamten isolierten DNA mit dem Nanodrop 1000 Spectrophotometer (PeqLab) wurden die Isolate bei 4 °C gelagert.

Der Ansatz für die quantifizierende PCR erfolgte nach Tabelle 2.4. Als Primer dienten einerseits die allgemeinen Bakterien- und Archaeenprimer und der spezifische Primer für *Methanosaeta concilii* ((Yo et al., 2005) *Forwardprimer*: Mst 702 forward 5' - TAA TCC TYG ARG GAC CAC CA - 3', *Reverseprimer*: Mst 862 reverse 5' - CCT ACG GCA CCR ACM AC - 3') sowie die selbst entwickelten und getesteten Primer, synthetisiert durch Thermo Scientific Biopolymers.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Ansätze für *real time* PCR.

Komponenten	Konzentration	Hersteller
IQ SYBR Green Supermix	2-fach	Bio-Rad
Primer forward	0,4 µM	Thermo
Primer reverse	0,4 µM	Thermo
Template DNA	4 µL	
RNase-freies Wasser		eigen

Die Analysen wurden im iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Vor jedem Lauf wurde vor der Quantifizierung nach folgendem Protokoll (Tabelle 2.5) eine Kalibrierung durchgeführt:

Tabelle 2.5: Protokoll der *real time* PCR mit spezifischen Primern.

Zyklen	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	900	94	1
Denaturierung	15	94	
Annealing	30	60	45
Elongation	60	72	
Schmelzkurve	10 sec je 0,5 °C	50-95	1
Lagerung	∞	4	1

Zur Kalibrierung wurden Standardkurven aufgenommen. Dies erfolgte im Dreifachansatz unter identischen Versuchsbedingungen wie bei der Probenbehandlung. Als Basis dienten Plasmide mit zuvor bestimmten DNA-Konzentrationen, wodurch eine Auswertung der Proben-DNA möglich wurde. Im Anschluss an jede PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können.

Auswertung der *real time* PCR

Um die verschiedenen Organismen miteinander vergleichen zu können, müssen die C_T -Werte, automatisch generiert durch den Cycler, in die Anzahl der Kopien pro definierter Menge DNA-Isolat umgerechnet und normiert werden. Dies erfolgte anhand der gewonnenen C_T -Werte der Proben, die immer aus Mittelwerten von Doppelansätzen generiert worden waren, bezogen auf die Geradengleichung des Plasmidansatzes und dessen PCR-Effizienz. Die Masse und die Konzentration wurden anhand der Avogadro-Konstante und der spezifischen Molmasse jedes Moleküls errechnet (vgl. Formel 3.1 - 3.4, Seiten 45 - 46).

2.1.5 Betrieb der Biogas-Laboranlage

Wenn ein Prozess einer systematischen Untersuchung unterzogen werden soll, ist es notwendig, möglichst viele Parameter des Prozesses zu erfassen. Dafür wurden Anlagen im Labormaßstab aufgebaut, die im Gegensatz zu Großanlagen gezielt unter definierten Bedingungen und mit zeitnahen Analysen betrieben werden konnten.

Aufbau des Biogas-Laborfermenters

Für verschiedene Forschungsprojekte wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit eine Biogasanlage im Labormaßstab aufgebaut. Diese besteht aus zwei Behältern à 10 L, die als Fermenter und Nachgärer fungieren. Das System, welches weitestgehend analog zu Großanlagen betrieben wurde, war eine auf Rindergülle basierende Anlage. Die Fütterung erfolgte täglich. Die eingestellten Prozessparameter beinhalteten eine Temperierung bei

40 °C, kontrolliert und aufgezeichnet mittels Pt 100 über ein LabVIEW-Programm und eine kontinuierliche Durchmischung mittels Propellerrührer bei 100 rpm. Zusätzlich existierte eine konstante Gaserfassung, die zuerst über einen Trommelgaszähler (Ritter), später über Milligascounter der Firma Ritter erfolgte. Der Aufbau und die Modifikationen (vgl. Abbildung 2.3) der Anlage werden in den Abschlussarbeiten von Linus Neikes (2008) und Christine Küppers (2009) genauer erläutert.

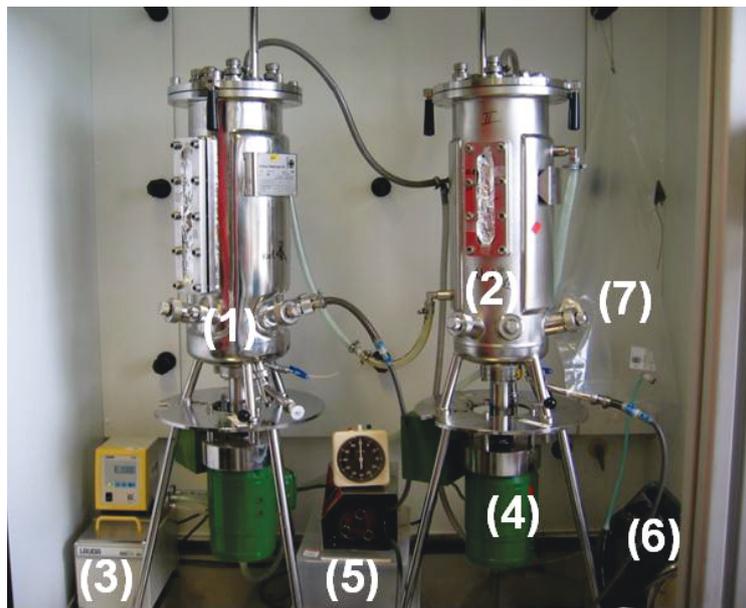


Abbildung 2.3: Biogas-Laborfermenter (1) und Nachgärer (2), temperiert über ein Wasserbad (3) und von unten gerührt (4). Die Fütterung erfolgt mittels Schlauchpumpe (5), die Gaserfassung über einen Trommelgaszähler (6). Das entstehende Gas wird in einem Gassack (7) gesammelt.

Prozessanalysen

Von der kontinuierlich betriebenen und täglich gefütterten Anlage wurde kontinuierlich die produzierte Gasmenge erfasst. Weitere Analysen zur Beurteilung der Gärbiologie vervollständigten die Überwachung mittels täglicher chemisch-biologischer offline-Analysen des Gärmaterials.

Der pH-Wert, die Leitfähigkeit und das Redoxpotential wurden direkt nach Probenahme mit entsprechenden Elektroden gemessen (pH-Meter inoLab pH level 2, Gamma Analysetechnik GmbH (Bremerhaven), Leitfähigkeitselektrode TetraCon 325, WTW (Weilheim), Redoxelektrode Blue Line 31 RX, Schott Instruments (Mainz)).

Die Pufferkapazitätsberechnung der Probe erfolgte anhand des Verbrauchs von 0,1 M Natronlauge (siehe Formel 2.1), die benötigt wurde, um bei einer 10 mL Probe den pH-Wert um eine Einheit in den alkalischen Bereich zu verschieben.

$$\beta = \frac{n_{\text{NaOH}}}{V_{\text{Probe}} \cdot \Delta\text{pH}}$$

Formel 2.1: Formel zur Berechnung der Pufferkapazität (Aurich & Rinze, 1993).

Die Titration mit Schwefelsäure ermöglichte die Bestimmung des biogasspezifischen FOS/TAC-Verhältnisses. Vor der Verwendung des Überstands zur Analyse, wurde die Probe zunächst für 20 Minuten bei 14.996 g zentrifugiert. Der Titrationsautomat Biogas Titrationsmanager TitraLab von Hach Lange titrierte die Probe mittels Schwefelsäure (0,05 mol/L) vom Ausgangs-pH-Wert zuerst auf einen pH-Wert von 5,0 und anschließend weiter bis auf pH 4,4. Anhand des Säureverbrauches kann unter Verwendung der Formeln (Formel 2.2 und Formel 2.3) das Verhältnis ermittelt werden, wobei V_d dem Verdünnungsfaktor der Probe, V_1 dem Säureverbrauch bis pH 5,0 und V_2 dem Säureverbrauch bis pH 4,4 entspricht.

$$\text{FOS} = \frac{V_d \cdot V_2 \cdot 0,25}{V_{\text{Probe}}} \cdot c(\text{H}^+) \cdot M_{\text{CaCO}_3}$$

Formel 2.2: Formel zur Berechnung des FOS-Wertes (Rieger & Weiland, 2006).

$$\text{TAC} = \frac{V_d \cdot V_1}{V_{\text{Probe}}} \cdot c(\text{H}^+) \cdot M_{\text{CaCO}_3} \cdot \frac{1}{2}$$

Formel 2.3: Formel zur Berechnung des TAC-Wertes (Rieger & Weiland, 2006).

Zudem wurden kontinuierlich die TS- und oTS-Gehalte und die Fettsäuren bestimmt. Neben den Analysen der Laboranlage wurden verschiedene Industrieanlagen bezüglich chemisch-physikalischer Parameter, aber auch hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung untersucht. Dabei unterschieden sich die Anlagen aufgrund von Fütterung und Aufbau, alle wurden jedoch im mesophilen Bereich betrieben.

2.2 Parallelanlage

Zur systematischen Analyse von physikalischen und mikrobiologischen Einflüssen diente eine Parallelanlage, bestehend aus sechs Fermentern. Diese Fermenter mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von einem Liter wurden mit je einer Temperaturerfassung und -regelung, einem dreiflügeligen Propellerrührer, einer Gasanalyse (BlueSens), einem Gaszähler (Ritter) sowie Elektroden zur pH-, Sauerstoff- und Redoxerfassung ausgestattet. Die Steuerung und Datenerfassung gelang mit Hilfe eines mit LabVIEW erstellten Programms, das von Marc Reimann und Frederik Werner implementiert wurde (Reimann, 2010). Der Betrieb der Anlage erfolgte automatisiert mit einer Fütterung über eine Schlauchpumpe (Fink).

2.2.1 Analyse der Prozessparameter

Neben den kontinuierlich erfassten Parametern wurden im Labor regelmäßig offline weitere Parameter untersucht, um eine möglichst genaue Erfassung der Prozessbiologie zu ermöglichen. So erfolgte die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) und der organischen

Trockensubstanz (oTS) nach VDI-Richtlinie (VDI 4630). Die Ermittlung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und des Redoxpotentials wurde mittels handelsüblicher Elektroden durchgeführt. Weiterhin wurden die Pufferkapazität und das FOS/TAC-Verhältnis über Titration bestimmt, die Untersuchung der Summenparameter „chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)“ und „Gesamtkohlenstoff (TOC = total anorganic carbon)“ anhand von Schnelltests von Hach Lange. Die wichtigste und für den Prozesszustand aussagekräftigste Analyse ist die Bestimmung der organischen Säuren. Sie erfolgte einerseits in Form eines Summenparameters als Essigsäureäquivalent, andererseits mittels HPLC (high performance liquid chromatography) als Einzelbestimmung der kurzkettigen Säuren Essigsäure, Propionsäure, Valeriansäure etc.

Der Analyseturnus war einerseits anlagen-, andererseits versuchsabhängig. Bei einem konstanten Prozess wie der Laboranlage erfolgten die Kontrollen seltener als während der Versuchsphasen des Parallelermentersystems. Die genauen Methoden sind in den Abschlussarbeiten von Niklas Jörres (2010), Florian Jansen (2011) und Katharina Kasper (2011) erläutert.

2.2.2 Untersuchung der optimalen Betriebsweise der Biogas-Parallelanlage

Nach erfolgtem Aufbau und Test der Anlage hinsichtlich Software und Datenerfassung erfolgten Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Betriebsbedingungen. Zu Beginn jeder Versuchsphase wurden alle Fermenter identisch mit 50 % Animpfschlamm aus der laboreigenen Biogasanlage angeimpft und 50 % Frischgülle zugegeben. Die Fütterung und die Versuchsphasen wurden erst nach dem Erreichen von mindestens 50 % Methan gestartet. Während der einzelnen Phasen wurde kein weiterer Parameter als der zu untersuchende variiert. Um die Einflüsse durch verschiedene Güllechargen ausschließen zu können, wurde vor der Versuchsphase eine ausreichend große Güllemenge vorbereitet. Die Fütterung erfolgte automatisiert acht Mal je 24 h. Die Temperatur wurde konstant auf 37 °C gehalten und eine Rührgeschwindigkeit von 44 rpm eingestellt.

Beim ersten Versuch wurde das rein auf Rindergülle basierende System bezüglich der maximalen Fütterungsrate getestet. Zu diesem Zeitpunkt funktionierten erst vier Fermenter, welche schrittweise auf eine Faulraumbelastung von 7 kg oTS/m³*d hochgefahren wurden. Neben einem Vergleichsfermenter wurde bei den drei anderen Fermentern die Fütterung täglich um 0,2, 0,5 und 0,7 kg oTS/m³*d gesteigert.

Vor dem zweiten Versuch wurden die beiden letzten Fermenter in Betrieb genommen, so dass die sechs Faulraumbelastungen 0, 1,75, 3,5, 7, 14 und 21 kg oTS/m³*d bei gleichbleibender Fütterung untersucht werden konnten. Im Anschluss daran wurden zur

genaueren Bestimmung des optimalen Bereiches Versuche in Doppelbestimmung mit 8, 10 und 12 kg oTS/m³*d durchgeführt.

Als letzter Optimierungsparameter wurde der Einfluss der Temperatur bei optimierter Faulraumbelastung getestet. Die interne Fermentertemperatur variierte dabei von 27 über 32, 37, 39,5, 42 bis auf 47° C.

2.2.3 Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf den Biogasbildungsprozess

Die verschiedenen Parameter, die Einflüsse auf den Biogasbildungsprozess haben, sind bis heute unzureichend untersucht. Sicher ist jedoch, dass die kurzkettigen organischen FS zu den wichtigsten Intermediärprodukten zählen (Ahring et al., 1995). Daher wurden diese erst anhand ihres Einflusses bei punktuellen, später dann bei semikontinuierlich hohen Konzentrationen untersucht. In den Versuchen erfolgten die Störungen allesamt durch die kurzkettigen organischen Säuren Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutyrat und Phenollessigsäure. Die Zugaben erfolgten über Septen in den Fermentern. Die Säuren wurden in Phosphatpuffer gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt, um keine pH-Wert-Änderung durch die Zugabe hervorzurufen. Um identische Startbedingungen zu ermöglichen, wurden alle sechs Fermenter identisch und zum gleichen Zeitpunkt angefahren und bei 37° C, 44 rpm und 10 kg oTS/m³*d betrieben.

Im ersten Versuch wurden die Säuren einmalig zudosiert, so dass die Acetatkonzentration ca. 150 mmol/L, die Propionat-, Butyrat- und Isobutyratkonzentrationen 50 mmol/L und die Phenylacetatkonzentration 0,15 mmol/L im Fermenter entsprachen.

In der zweiten Versuchsphase wurden die Säuren identisch angesetzt, jedoch die angestrebte Säurekonzentration in den Fermentern verdoppelt. Die Zielkonzentration für Acetat lag bei 300 mmol/L, bei Propionat, Butyrat und Isobutyrat bei 100 mmol/L. Bei Phenyllessigsäure konnte die Konzentration nicht erhöht werden, da die maximale Löslichkeit bereits erreicht war. So wurde dieser Ansatz erneut mit 0,15 mmol/L durchgeführt.

In der letzten Versuchsphase erfolgte eine semikontinuierliche Zugabe der Säuren. Jeden zweiten Tag wurden 300 mmol/L Acetat bzw. 150 mmol/L Propionat, Butyrat und Isobutyrat sowie 0,15 mmol/L Phenylacetat zugegeben.

In allen Versuchsphasen erfolgte neben der Erfassung der chemisch-physikalischen Parameter auch die zeitliche Quantifizierung der Mikroorganismen.

2.3 Sensormessungen

2.3.1 Aufbau von Chip und Messapparaturen

Die Erfassung der mikrobiellen Aktivität von Organismen kann mittels Sensoren, die spezifisch auf die Stoffwechselprodukte der Organismen reagieren, erfolgen. Hier wurde ein

pH-sensitiver LAPS von der AG Schöning entwickelt, um ihn unter anaeroben Bedingungen, wie sie in Biogasanlagen vorherrschen, nutzen zu können.

Für die Messungen wurden Chips mit einer Tantalpentoxid-Oberfläche genutzt. Im Rahmen des Projektes wurde eine Differenzanordnung auf dem Chip realisiert. Um mit dem Chip Messungen realisieren zu können, musste eine entsprechende Halterung zur Fixierung entwickelt werden. Die Konstruktion einer Halterung erfolgte, wie in Abbildung 2.4 dargestellt, aus verschiedenen Einzelteilen. Dieser Aufbau diente als Basishalterung und Grundhalterung des Chips für die Messungen (Werner et al., 2009; Werner et al., 2011a; Werner et al., 2010).

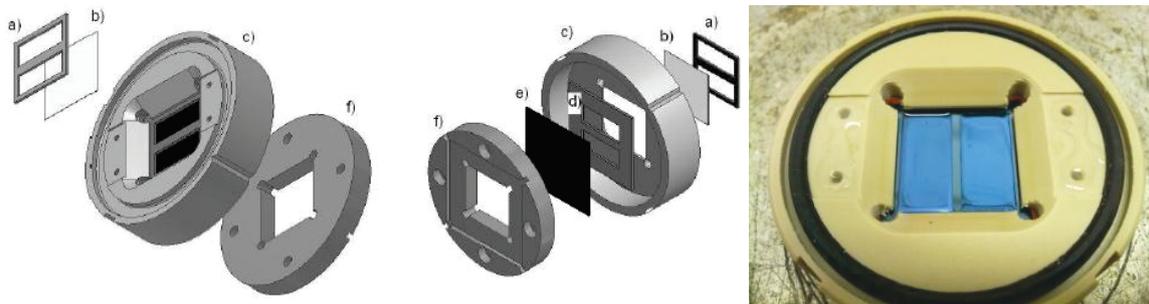


Abbildung 2.4: links: Modularer Aufbau einer Chiphalterung. Unter die Basis (c) wird, abgedichtet durch eine Dichtung (d), der Chip (e) gelegt und mit dem Unterteil (f) verschraubt. Auf den Chip wird eine Membran (b) gelegt, die über einen Metallrahmen (a) fixiert wird; rechts: Foto eines eingebauten Chips in der Halterung (Schumacher, 2009).

Ergänzend wurde für die anaeroben Messungen eine Messkammer entwickelt, in die die Basishalterung eingebaut werden konnte. Die Anforderungen an einen anaeroben Messaufbau waren die Nutzung von sauerstoffundurchlässigen Materialien, einfache Handhabung, gute Reinigungsmöglichkeit und Durchflussanordnung. Zusätzlich sollte die Apparatur die Möglichkeit der Temperierbarkeit aufweisen, da diese die Stoffumsatzrate der Organismen beeinflusst. Die Messzelle wurde außerdem so ausgelegt, dass eine Durchflussmessung möglich war, um frisches Medium bzw. neuen Fermenterinhalt anaerob durchströmen zu lassen.

Datenerfassung und Auswertung

Ziel der Messung ist die Detektion der pH-Wert-Änderung pro Zeiteinheit und Organismenanzahl. Das System zur Datenauswertung des LAPS ermittelt diese konzentrationsabhängige Oberflächenpotentialänderung. Dieses Programm (LabVIEW) generiert im I/V-Modus die Strom/Spannungskurven von 16 LED, die nacheinander angesteuert werden. Zusätzlich dient es zur Festlegung des Arbeitspunktes, der durch den Wendepunkt dieser Kurve definiert ist. Über diesen Punkt werden die Änderungen des Oberflächenpotentials ermittelt. Bei Messungen wurden alle 16 Messspots ausgelesen. Diese wurden nacheinander angesteuert, so dass pro Messung 16 Messwerte generiert

wurden. Die Auswertung der Differenzmessungen erfolgte über das arithmetische Mittel der jeweiligen vier äußeren Messspots. Die Potentialdifferenz wurde über die Subtraktion der Mittelwerte erzeugt.

Für die weitere Auswertung erfolgte die Ermittlung der Standardgeraden in den linearen Bereichen. Die Steigung entspricht dabei der Potentialänderungsrate (potential-change rate) ϕ . Die Ansäuerungsrate (acidification rate) α konnte laut Owicki und Mitarbeitern daraufhin wie folgt (vgl. Formel 2.4) berechnet werden (Owicki et al., 1994):

$$\phi = S \frac{1}{\beta V} \frac{n \alpha}{N_A}$$

Formel 2.4: Formel zur Berechnung der Potentialänderungsrate (Owicki et al., 1994).

Der Parameter S entspricht der pH-Sensitivität des Sensors und wird mit 58 mV/pH angenommen (Schöning et al., 2005). β beschreibt die spezifische Pufferkapazität des jeweiligen Mediums, in dem die Messung stattfindet, V das Volumen. Mit dem Parameter n wird die Gesamtzellzahl in der Rechnung berücksichtigt und mit N_A die Avogadrokonstante (Werner et al., 2011).

2.3.2 Organismenkultivierung

Um mittels Sensor gezielt den Stoffumsatz von Organismen detektieren zu können, wurden die Modellorganismen *E. coli* und *M. concilii* in Reinkulturen unter optimalen Bedingungen angezogen. Dies diente der Sicherstellung von ausreichendem Zellmaterial.

Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *Escherichia coli* K12 (DSMZ No. 498) erfolgte überwiegend in flüssigem LB-Medium (engl. lysogeny broth). Dieses komplexe Medium, in dem Hefeextrakt als Nahrungsquelle dient, bietet *E. coli* verschiedene Stoffwechselwege zur Nutzung an. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C und 120 rpm. Die genaue Medienzusammensetzung ist im Anhang (Tabelle 7.7, S. XVIII) aufgelistet.

Kultivierung von *Methanosaeta concilii*

M. concilii wurde von der DSMZ (DSMZ No. 2139) bezogen und in flüssigem Acetatmedium (DSMZ-Medium 334) anaerob kultiviert. Dazu wurden alle autoklavierbaren Medienbestandteile in Wasser gelöst (Tabelle 2.6), in anaerobe Kultivierungsflaschen (Wheatson) gefüllt und mit 80 % N₂ und 20 % CO₂ so lange begast, bis der Sauerstoff ausgetrieben war. Nach dem Autoklavieren des Mediums in der Kultivierungsflasche wurden steril die hitzeempfindlichen Vitamin-, L-Cystein- und Natriumsulfid-Lösungen zugegeben.

Diese reduzieren den restlichen in Lösung befindlichen Sauerstoff und binden ihn. Nachdem das Medium aufgrund der farblosen Lösung als sauerstofffrei bezeichnet werden konnte, erfolgte das Animpfen durch eine ältere, zuvor überprüfte Kultur aus 10% vol./vol.. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C und 70 rpm.

Tabelle 2.6: Medienzusammensetzung für Acetatmedium zur Kultivierung von *M. concilii*.

Chemikalien	Menge [% w/v]	Hersteller
Natriumacetat	0,68	VWR
KHCO ₃	0,4	Merck
NH ₄ Cl	0,1	Merck
NaCl	0,06	AppliChem GmbH
KH ₂ PO ₄	0,03	Merck
MgCl ₂	0,005	Merck
Trace element solution	1 (v/v)	s. Anhang (Tabelle 7.8, S. XVIII)
CaCl ₂	0,006	VWR
Resazurin	0,0001	Riedel-de Haën
Vitamin solution	1 (v/v)	s. Anhang (Tabelle 7.9, S. XIX)
L-Cystein	0,027	Calbiochem
Na ₂ S	0,01	Alfa Aesar

2.3.3 Immobilisierung

Um eine ausreichende Organismendichte an der Sensoroberfläche sicherstellen zu können, wurden verschiedene Immobilisierungsstrategien getestet. Als geeignetste Methode stellte sich die Immobilisierung mittels Einschlussverfahren heraus, wobei die Wahl auf eine Acrylamid-Matrix fiel. Dieses Acrylamidgel besteht zum einem aus dem Monomer Acrylamid, dem Quervernetzer Methylenbisacrylamid, Wasser und den zu immobilisierenden Mikroorganismen sowie den Radikalstartern Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED). Diese Gelstruktur (vgl. Abbildung 2.5) zeichnet sich durch eine Langzeitstabilität, eine geringe Abbaubarkeit sowie eine gute Diffusion aus. Die Immobilisierung von *E. coli* & *M. concilii* erfolgte identisch, abgesehen von der sauerstofffreien Handhabung der Archaeen im Anaerobzelt (Coy), und wird im Folgenden genauer erläutert.

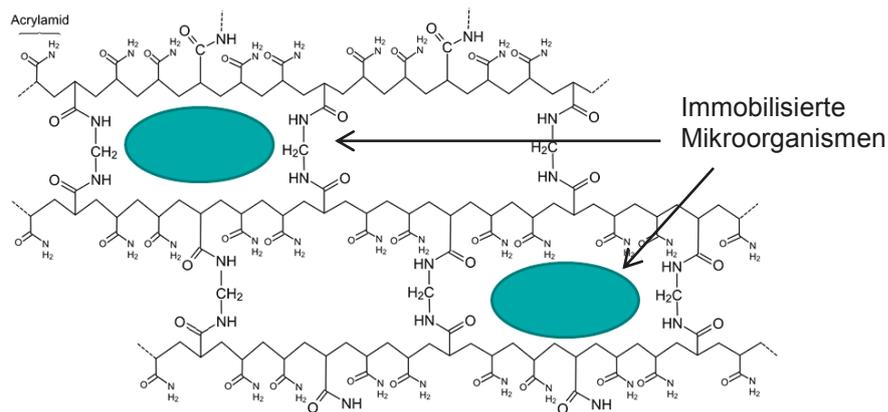


Abbildung 2.5: Chemischer Aufbau eines Acrylamid/Bisacrylamidgels mit immobilisierten Organismen.

Immobilisierungsmethoden

Vor der Immobilisierung wurden die Organismen im regulären Medium vermehrt und regelmäßig auf Wachstum und Kontaminationen kontrolliert. Die Inkubationsdauer war dabei so ausgelegt, dass die Organismen sich am Ende der exponentiellen Phase befanden. Bei *E. coli* war dies unter den eingestellten Bedingungen nach ca. 24 h, bei *M. concilii* nach sechs bis acht Wochen der Fall.

Vor der Immobilisierung wurde die Zellzahl über ein Auszählen in der Thoma-Kammer durchgeführt, um bei den anschließenden Messungen die Zellzahl berücksichtigen zu können. Für eine genügend hohe Zelldichte, die ein besseres metabolisches Signal erzeugt, wurde eine Aufkonzentrierung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen gewaschen. Dazu erfolgte zuerst eine fünfminütige Zentrifugation bei 5.000 x g, wobei im Anschluss der Überstand verworfen und das Sediment in 10 mL Wasser resuspendiert wurde. Der Vorgang des Zentrifugierens wurde wiederholt, und erneut wurde der Überstand verworfen. Im Weiteren erfolgte die Resuspension der Zellen in einem Milliliter 0,1 M Tris Puffer (VWR).

Nach dem Waschen der Zellen wurden zwei parallele Ansätze von Gelen vorbereitet. Einerseits wurde ein Kontrollgel vorbereitet, in dem Tris-Puffer ohne Organismen als Basis eingesetzt wurde. Im anderen Ansatz wurde Tris-Puffer genutzt, in dem die gewaschenen Organismen vorlagen. Die Herstellung erfolgte, indem Wasser, Puffer und Acrylamid zusammengegeben und gemischt wurden (siehe Tabelle 2.7). Die Radikalstarter APS und TEMED wurden im Anschluss zugefügt, gemischt und direkt auf den Chip gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gemisch gleichmäßig über die zu benetzende Fläche verteilt wurde, bevor das Gel auspolymerisierte. Das aufgetragene Volumen betrug bei einer Chiphälfte 37 μ L, womit eine durchschnittliche Gelhöhe von 0,47 mm erreicht wurde. Nach ca. 20 min wurde eine Celluloseacetatmembran (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,2 μ m

auf den Chip gelegt und fixiert. Anschließend konnte der Chip in den Messaufbau eingebaut und die Messung begonnen werden.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgeles zur Immobilisierung von Mikroorganismen.

Chemikalien	Volumenprozent [%]	Hersteller
Tris Puffer mit Organismen (Tris & HCl)	46	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid	4	Serva (37,5:1)
Wasser	49	
APS	0.56	Merck
TEMED	0.44	Merck

Bei der Differenzanordnung wurden zwei identische Gele gegossen, die sich einzig darin unterschieden, dass ein Gel im Puffer die Organismen enthielt. Das andere Gel, auch als Kontrollgel bezeichnet, hatte lediglich Puffer als Basis.

2.3.4 Messungen mit *Escherichia coli*

Zur Überprüfung und Optimierung des Aufbaus und des Messprinzips wurden Untersuchungen mit dem Bakterium *Escherichia coli* durchgeführt. Aufgrund der geringen Generationszeit von 20 min im Standardmedium und dem fakultativ anaeroben Sauerstoffverhalten eignete sich *E. coli* sowohl für aerobe Optimierungen als auch für anaerobe Messungen.

Proof of principle

Zum Nachweis des Messprinzips (Proof of principle) wurden Versuche mit *E. coli* in Flüssigkultur durchgeführt. Dazu wurden Chips ohne Differenzanordnung verwendet. Der Messstart erfolgte mit der Zugabe von 2 mL LB-Medium ohne Organismen auf die Messanordnung. Nach Erreichen eines konstanten Messsignals erfolgte die Zugabe von 1 mL *E. coli* üN Kultur. Vor jeder Messung wurde die genaue Zellzahl der Kultur bestimmt, um den Einfluss der Zellzahl auf das Potential untersuchen zu können. Dieser Versuch wurde mit unterschiedlichen Bakteriendichten durchgeführt.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass eine durch Organismen verursachte pH-Wert-Änderung mittels LAPS detektierbar ist, wurde der Versuchsaufbau von der AG Schöning entwickelt.

Test auf Reproduzierbarkeit in der Differenzanordnung

Zur Sicherstellung, dass die gemessene Signaldifferenz einzig durch die Organismen erzeugt wird, wurde eine Differenzanordnung entwickelt und getestet. Somit wurde es möglich, eventuelle Stör- oder Driftsignale von den Signalen der Organismen zu unterscheiden. Erst daraufhin konnte eine rechnerische Auswertung erfolgen.

Zum Nachweis diente ein Chip mit Differenzaufbau, der hälftig mit einem Gel mit immobilisierten *E. coli* und auf der anderen Hälfte mit einem Kontrollgel belegt war. Das Gelvolumen betrug 37 μL je Chiphälfte und wurde angesetzt, wie in Tabelle 2.7 beschrieben. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Chip im Messaufbau eingebaut (vgl. Abbildung 2.4, S. 30) und sofort die Messung gestartet. Auf den Chip wurde dazu ein Milliliter LB-Medium aufgetragen. In 30 minütigem Turnus wurde das Medium entfernt und durch frisches ersetzt.

Die Potentialerfassung erfolgte an allen 16 Spots alle zwei Minuten. Für die Auswertung wurden bei der Differenzanordnung jeweils Mittelwerte der Potentiale gebildet, die von den vier äußeren Spots jeder Chiphälfte stammten.

Tests des Einflusses einer Schutzmembran

Nachdem die Funktion des Messaufbaus erfolgreich gezeigt werden konnte, wurde eine Schutzmembran auf dem Gel getestet, um eine weitere Fixierung der Organismen an der Sensoroberfläche sicherzustellen. Die Membran sollte die Organismen zurückhalten, die sich aus dem Gel lösen könnten, sowie das Eindringen „fremder falscher“ Organismen in die Matrix verhindern.

Zur Bestimmung des Einflusses einer Membran erfolgte der Messaufbau wie bei der vorigen Messung. Ebenfalls wurde die Differenzanordnung mit Gelen angefertigt. Zusätzlich wurde auf das Gel eine Celluloseacetatmembran aufgelegt und fixiert. Die Messung erfolgte ebenfalls mit einem regelmäßigen Wechsel des LB-Mediums, die Auswertung analog zum Test auf Reproduzierbarkeit.

Untersuchungen hinsichtlich einer Konzentrationsabhängigkeit von Glukose

Neben dem Funktionsnachweis des Systems wurde die Abhängigkeit der Substratkonzentrationsänderung getestet. Dies erfolgte mit *E. coli* in isotonischem Phosphatpuffer (vgl. Tabelle 2.8) als Basismedium, da dieses keine Kohlenstoffquellen aufweist (Werner et al., 2012).

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des isotonischen Phosphatpuffers.

Chemikalien	Masse [mmol]	Hersteller
KCl	0,083	AppliChem
NaCl	141,1	AppliChem
KH_2PO_4	0,045	Merck
Na_2HPO_4	0,249	Biomedicas

Diesem Puffer mit einer Pufferkapazität von 0,2 mmol/L wurden für die Untersuchung verschiedene Konzentrationen an Glukose zugesetzt. Zu Beginn wurde das Gel, welches sich unter einer Membran befand, 50 min mit 1 mL Puffer inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dieser Puffer durch Puffer mit 0,5 mmol/L Glukose ersetzt und alle zwei Minuten für

2 h gemessen. Nach einer Regenerationsphase, in der erneut nur Puffer über das Gel gegeben wurde, erfolgte die Zugabe von Puffer mit 1,0 mmol/L Glukose. Diese Schritte wurden ein drittes Mal mit einer Zugabe von 1,5 mmol/L Glukose wiederholt.

2.3.5 Messungen mit *Methanosaeta concilii*

Nachdem die Resultate mit *E. coli* vielversprechend waren, erfolgten Untersuchungen im anaeroben Zielmilieu. Als Organismus wurde der strikt anaerobe, rein acetoklastische, methanproduzierende *Methanosaeta concilii* genutzt (Patel, 1984; Patel & Sprott, 1990).

Die Durchführung der Immobilisierung und der Zusammenbau der Messzelle erfolgten stets unter anaeroben Bedingungen im Anaerobzelt. Das Gel mit Organismen wurde identisch zu den Versuchen mit *E. coli* hergestellt (vgl. Tabelle 2.7). Ebenfalls wurde vor Versuchsbeginn die Zellzahl bestimmt. Alle Messungen erfolgten in der konstruierten Anaerobzelle.

Untersuchung im Kulturmedium

Bei diesen Untersuchungen diente das Standardmedium 334 von DSMZ mit einer Pufferkapazität von 8,2 mmol/L, in dem *M. concilii* regulär kultiviert wurde, als Basis. Es wurde gewählt, da unter diesen Bedingungen die Wachstumsgeschwindigkeit bekannt und anhand des Resazurin-Zusatzes eine eventuelle Sauerstoffundichtigkeit sichtbar gemacht werden konnte.

In diesem Test wurde ein Chip ohne Differenzanordnung verwendet, 240 µL Gel mit Organismen darauf immobilisiert und mit 17 mL Medium überschichtet. Ergänzend zu den regelmäßig in fünfminütigem Abstand stattfindenden Messungen der Potentiale erfolgte die Erfassung der Temperatur in der Messlösung.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Quantifizierung prozesstragender Organismen

3.1.1 Identifizierung der dominanten Organismengruppen

Die Analyse der mikrobiellen Vielfalt einer mesophil betriebenen, güllebasierten Laborbiogasanlage erfolgte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden für die Domänen der *Bacteria* und der *Archaea* aus einer einzigen Probe im Rahmen der Diplomarbeit von Annika Jülicher (2010).

Dazu wurde zunächst die genomische DNA aus der Probe isoliert, um dann als Template für die PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene mit spezifischen Primern für die Bakterien bzw. Archaeen zu dienen. Diese PCR-Produkte wurden dann in pJET-Vektoren integriert und durch Transformation in *E. coli* DH5a vereinzelt. Unter Verwendung vektorspezifischer Primer in der Kolonie-PCR wurden dann monoklonale PCR-Produkte von einzelnen Klonen gewonnen und mittels RFLP-Analyse und Chip-Elektrophorese analysiert. Aufgrund der erhaltenen Schnittmuster konnten identische PCR-Produkte in taxonomische Gruppen (*operational taxonomic unit*, (OTU)) zusammengefasst werden. Als relevante OTU wurden die Schnittmuster gewertet, die häufiger als vier Mal von insgesamt 1266 Bakterien bzw. 412 Archaeen analysierten Klonen gefunden wurden. Die restlichen Klone, die seltener gefunden wurden, wurden nicht weiter untersucht, da angenommen werden konnte, dass diese Organismen keine prozessrelevante Bedeutung haben. Sie konnten aufgrund der Fütterung in das System eingebracht worden sein. Die relevanten OTU wurden einerseits sequenziert, um auf den Organismus zurückschließen zu können. Andererseits wurden die PCR-Produkte in einen Vektor ligiert, um als Standard in der *real time* PCR und als Rückstellprobe zu dienen.

Insgesamt konnten 18 bakterielle OTU identifiziert werden, die zusammen 15 % der analysierten Klone entsprachen. Die Zugehörigkeit der Isolate zu bekannten Taxa sind in der folgenden Übersicht dargestellt (vgl. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht über die OTU in der Domäne *Bacteria*.

Zuordnung	OTU	Anzahl Klone	Anteil aller Klone
Phylum Bacteroidetes	5	60	4,74 %
<i>Bacteroides</i>	3	49	3,87 %
Bacteroidetes / <i>Chlorobi group</i>	1	4	0,32 %
unklassifizierte	1	7	0,55 %
Phylum Firmicutes	5	38	3,00 %
<i>Sp. / Bacilli</i>	3	16	1,26 %
<i>Mollicutes</i>	2	22	1,74 %
Phylum Spirochaetes	1	5	0,39 %
<i>Spirochaetaceae</i>	1	5	0,39 %
Phylum Chloroflexi	1	4	0,32 %
<i>Anaerolineae</i>	1	4	0,32 %
Phylum Fibrobacteres	1	4	0,32 %
<i>Fibrobacteriales</i>	1	4	0,32 %
„ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> “	4	71	5,61 %
unklassifizierte Bakterien	1	4	0,32 %

Die Analyse der *Archaea* erfolgte analog zu der der *Bacteria*. Es konnten 17 Muster mittels RFLP aus 412 Klonen gruppiert werden, was einem Anteil von 89 % der gesamten Klone entsprach. Die restlichen 11 % der Klone wurden weniger als vier Mal detektiert und dürften daher wenig relevante Arten repräsentieren. Tabelle 3.2 zeigen die detaillierte Verteilung der Klone der *Archaea*.

Tabelle 3.2: Übersicht über die OTU in der Domäne *Archaea*.

Zuordnung	OTU	Anzahl Klone	Anteil aller Klone
Phylum Euryarchaeota	7	125	30,34 %
Methanomicrobiales	2	48	11,65 %
Methanobacteriales	3	17	4,13 %
unklassifiziert	2	60	14,56 %
Phylum Crenarchaeota	10	240	58,25 %

Ausführlichere Daten zu den jeweiligen Analyseschritten und den Ergebnissen inklusive der phylogenetischen Stammbäume sind der Diplomarbeit von Annika Jülicher (2010) zu entnehmen.

3.1.2 Synthetisierte Primer und Sonden

Basierend auf den Ergebnissen der prozesstragenden Bakterien und Archaeen wurden die Organismen aus Biogasanlagen bezüglich ihrer räumlichen Nähe und ihrer Quantifizierung untersucht. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dient der optischen, die *real time* PCR der quantifizierenden Analyse. Um die identifizierten Organismen nachweisen zu können, wurden spezifische Primer und Sonden für die Organismengruppen abgeleitet und getestet.

Ergebnisse

Dies erfolgte durch die Erstellung der Alignments der 16S rRNA-Gensequenzen der Zielorganismen und dem Vergleich dieser Sequenzen mit den jeweils neun ähnlichsten Sequenzen bekannter Organismen. Die Primer wurden immer in Bereiche gelegt, die die größten Sequenzunterschiede zu anderen, nahe verwandten Organismen aufwiesen.

Die fünf PCR-Primerpaare für die Zielsequenzen auf der Domäne Bakterien (*Bacteroidetes*, *Bacteroides*, *Firmicutes sp.*, *Mollicutes*, „*Candidatus Cloacamonas sp.*“) und die drei Primer für die Domäne der Archaeen (Crenarchaeota, Euryarchaeota und Methanomicrobiales) sind in Tabelle 3.3 gezeigt.

Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer für den spezifischen Nachweis der Zielorganismen in PCRs.

Zielorganismus	Primer	Sequenz (5' nach 3')	Schmelztemperatur
Bacteroidetes	AJB 110 forward	GCA ATA AGG GGG TTT CGC AC	62 °C
	AJB 110 reverse	AGG GAA GGG GCA TCT CTG C	62 °C
<i>Bacteroides</i>	AJB 109 forward	GAT GTC GGT ATT TGG AGA CAG A	64 °C
	AJB 109 reverse	TGG GGA TCC GCA ACC TGT CA	64 °C
<i>Firmicutes sp.</i>	AJB 114 forward	CTG GAT AGG TTG TAT TGG GCC	64 °C
	AJB 114 reverse	TAA GCC AGG GAA TTT CAC GC	64 °C
<i>Mollicutes</i>	AJB 101 forward	TTT ACT GGG CCA CAT CTG ACT	64 °C
	AJB 101 reverse	AGC TCT ACC TCA CGG TTT TGC	64 °C
<i>Cloacamonas sp.</i>	AJB 104 forward	CTT TTA TAT GTG AGC AGT GCT TC	64 °C
	AJB 104 reverse	AAC GGG TTA GCT ACG GCA CC	64 °C
Crenarchaeota	AJB 8-11 forward	GCC GTA GCT GGC TAA GTY AG	62-64 °C
	AJA 8-11 reverse	GCA CAA GGC TAG TAG CAA CAG	64 °C
Euryarchaeota	AJA 12 forward	GGG CCG TAG CCT GTC TTG TA	64 °C
	AJA 12 reverse	TGA GAT ATG GGT CTC GCT CG	62 °C
Methanomicrobiales	AJA 1 forward	CTC TTG GGA AAT CTG GCG GC	64 °C
	AJA 1 reverse	CAT CAG TCC GGA GAC CAT GC	64 °C

Nach der Ableitung wurden die Primer auf Monoklonalität getestet. Dies ist notwendig, um sicherzustellen, dass ein Primerpaar nur an ein spezifisches, den Zielorganismus charakterisierendes Gen bindet. Dabei wurden differentielle enzymatische Verdauung von individuellen PCR-Produkten mit verschiedenen Endonukleasen eingesetzt und mit den theoretisch zu erwartenden Schnittmustern des Zielgens verglichen. Nur den Erwartungen entsprechende Schnittmuster ohne weitere Fragmente können als monoklonal, also spezifisch, gewertet werden. Beispielhaft ist hier das Fragmentmuster eines spezifischen PCR-Produktes für das Isolat AJA 112, identifiziert als Euryarchaeota, mit dem Enzym *Hpa II* im Vergleich zu den theoretisch erwarteten Fragmenten dargestellt.

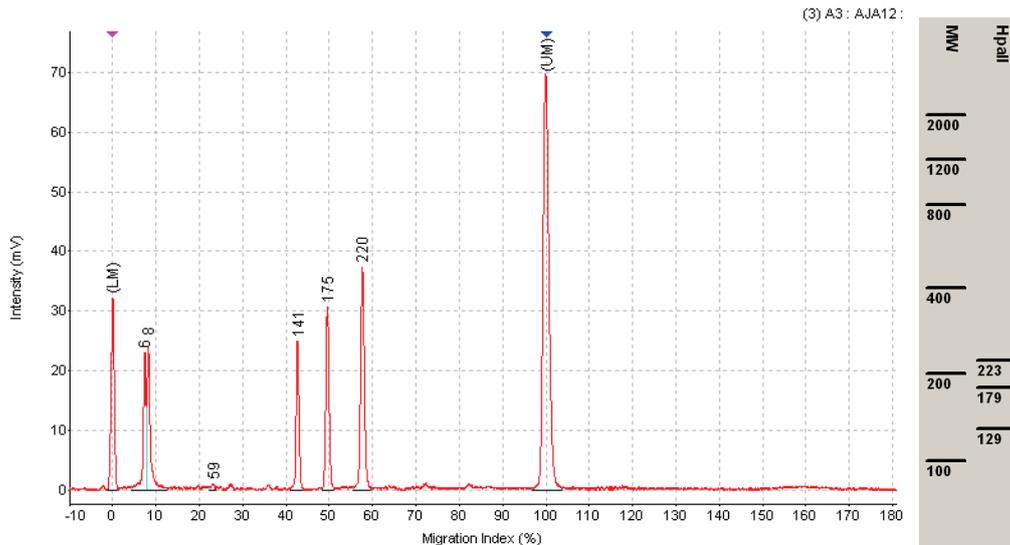


Abbildung 3.1: links: Verdauemuster von Euryarchaeota (AJA 12)-PCR-Produkten mit *Hpa II* ermittelt mit MultiNA; rechts: theoretisches Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

Das Fragment, das in der Gesamtlänge 531 bp entspricht, wird in die drei erwarteten Fragmente geschnitten. Die Fragmente mit 6 und 8 bp-Größe entsprechen wahrscheinlich den Primern, da der Verdau direkt aus dem PCR-Produkt erfolgte. Die Vergleiche aller entwickelten Primerpaare zwischen theoretischen und realen Verdauen sind im Anhang (vgl. Abbildung 7.1 - Abbildung 7.9) dargestellt.

Die Stringenz, die durch den Anteil falsch gepaarter Basen einen Anhaltspunkt für die Spezifität von FISH-Sonden liefert, liegt bei dem allgemeinen Archaeenprimer nur bei 20 %. Nach Lang sind Stringenzen unterhalb von 70 % nicht spezifisch und sinnvoll, was ebenfalls die Unspezifität des Primers bestätigt (Lang, 2006).

Sonderfall *Methanosaeta concilii*

Ergänzend zu den selbst erstellten Primern wurde ein aus der Literatur bekanntes Primerpaar untersucht, das als spezifisch für *Methanosaeta concilii* beschrieben ist (Yo et al., 2005). Dieser zusätzliche Primer beruht auf verschiedenen Literaturquellen, die *M. concilii* als dominante Archaeae in verschiedenen Biogasanlagen identifiziert haben (Raskin et al., 1994; Leclerc et al., 200; Klocke et al., 2008; Zhang et al., 2011). Bei einer Überprüfung der ursprünglich von Jülicher (2010) verwendeten Primer gegen die 16S rRNA-Gene dieses Organismus konnte im nachhinein festgestellt werden, dass diese zur Amplifikation dieser Gene und damit zur Detektion von *M. concilii* ungeeignet waren. PCR-Analysen der isolierten genomischen DNA von Jülicher wiesen diesen Organismus jedoch zweifelsfrei nach, so dass er nachträglich ebenfalls in die Liste der relevanten Organismen aufgenommen wurde. Weitere Organismen wurden nicht ergänzt.

3.1.3 Analyse der räumlichen Verteilung der prozesstragenden Organismen mittels FISH

Ähnlich zu den spezifischen Primern wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden zum Nachweis der rRNA in Zielorganismen abgeleitet und zum direkten, mikroskopischen Nachweis der Zielorganismen verwendet. Mittels FISH konnten einzelne Organismen im natürlichen Habitat direkt nachgewiesen werden. Diese Sonden sind komplementär zur Ziel-RNA und können mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sein, um verschiedene Organismen in einer Probe parallel untersuchen zu können.

Die Optimierung der Methode, insbesondere hinsichtlich Fixierung, Permeabilisierung und Hybridisierungsbedingungen, erfolgte zunächst an Reinkulturen mit gruppenspezifischen Sonden (Bakterien und Archaeen) in der Diplomarbeit von Mäder (2009). Im Weiteren wurden die spezifischen Sonden für die identifizierten Zielorganismen ebenfalls im Rahmen einer Abschlussarbeit getestet und zum visuellen Nachweis der Organismen in Originalproben aus der Laborbiogasanlage eingesetzt (Schiffer et al., 2011). Die analog zu den PCR-Primern designten spezifischen Sonden sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Übersicht über spezifische FISH-Sonden.

Zielorganismus	Sonde mit Label	Sequenz (5' nach 3')
Bacteroidetes	AJB 110 - Cy 3	AGG GAA GGG GCA TCT CTG C
<i>Bacteroides</i>	AJB 109 - Cy 3	GAT GTC GGT ATT TGG AGA CAG A
<i>Firmicutes sp.</i>	AJB 114 - Cy 3	CTG GAT AGG TTG TAT TGG GCC
<i>Mollicutes</i>	AJB 101 - Cy 3	AGC TCT ACC TCA CGG TTT TGC
<i>Cloacamonas sp.</i>	AJB 104 - Cy 3	CTT TTA TAT GTG AGC AGT GCT TC
Crenarchaeota	AJA 8-11 - Cy 3	GCC GTA GCT GGC TAA GTY AG
Euryarchaeota	AJA 12 - Cy 3	GGG CCG TAG CCT GTC TTG TA
Methanomicrobiales	AJA 1 - Cy 3	CAT CAG TCC GGA GAC CAT GC

Alle spezifischen eigens designten Primer und die spezifischen Primer für *M. concilii* wurden mit dem roten fluoreszierenden Cy 3 markiert, die allgemeinen Sonden hingegen mit dem grün fluoreszierenden Rhodamin green, um im Weiteren die räumliche Verteilung untersuchen zu können.

Für alle spezifischen Primer wurden individuelle Protokolle unter Verwendung von frischen Originalproben aus dem Laborfermenter erstellt. Beispielhaft sind hier (vgl. Abbildungen 3.2 und 3.3) Bildausschnitte dargestellt, die solche Proben zeigen und mit verschiedenen Sonden untersucht wurden.

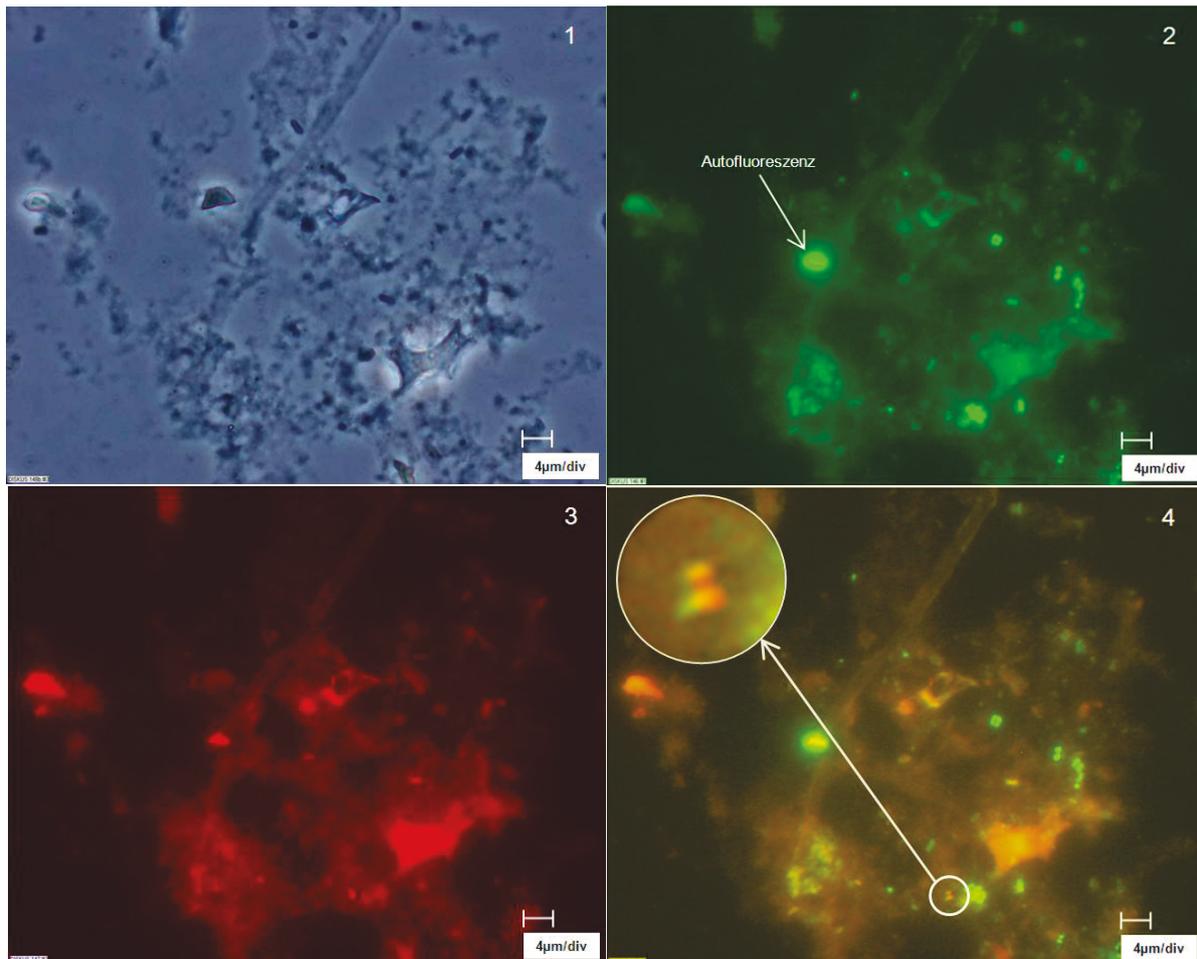


Abbildung 3.2: Mikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe (1:4 verdünnt); 1: lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme; 2: mit allgemeiner Archaeensonde Rhodamin green (grün) markiert; 3: mit spezifischer *Mollicutes*-Sonde (AJB 101) - Cy 3 (rot) markiert; 4: Überlagerung der Aufnahmen 2 und 3.

Abbildung 3.2 zeigt vier identische Ausschnitte einer Probe aus der Laborbiogasanlage. Im ersten Ausschnitt ist die Probe mit 1.000-facher Vergrößerung gezeigt. Es sind verschiedene Strukturen erkennbar, die jedoch nicht eindeutig in Pflanzen- bzw. Faserreste oder Mikroorganismen eingruppiert werden können. Aufnahme zwei ermöglicht, alle Archaeen zu lokalisieren, wobei eine inhomogene Verteilung in der Probe erkennbar ist. Die zumeist runden und kokkenförmigen Organismen liegen oft in Gruppen zusammen, wohingegen die intensiv leuchtenden Stellen zumeist Autofluoreszenzen von Pflanzenteilen sind. Abbildungsausschnitt drei, die die Verteilung der *Mollicutes* zeigt, weist einige, zumeist diploide Kokken auf. Die Überlagerung der Ausschnitte (Aufnahme vier) verdeutlicht, dass Archaeen und diese Bakterien sehr dicht beieinander liegen und teilweise sogar direkten Kontakt aufweisen. Es ist deutlich erkennbar, dass trotz des hohen Schwebstoffgehaltes und einer nicht zu vernachlässigenden Eigenfluoreszenz des Untersuchungsmaterials die Zielorganismen deutlich sichtbar gemacht werden konnten.

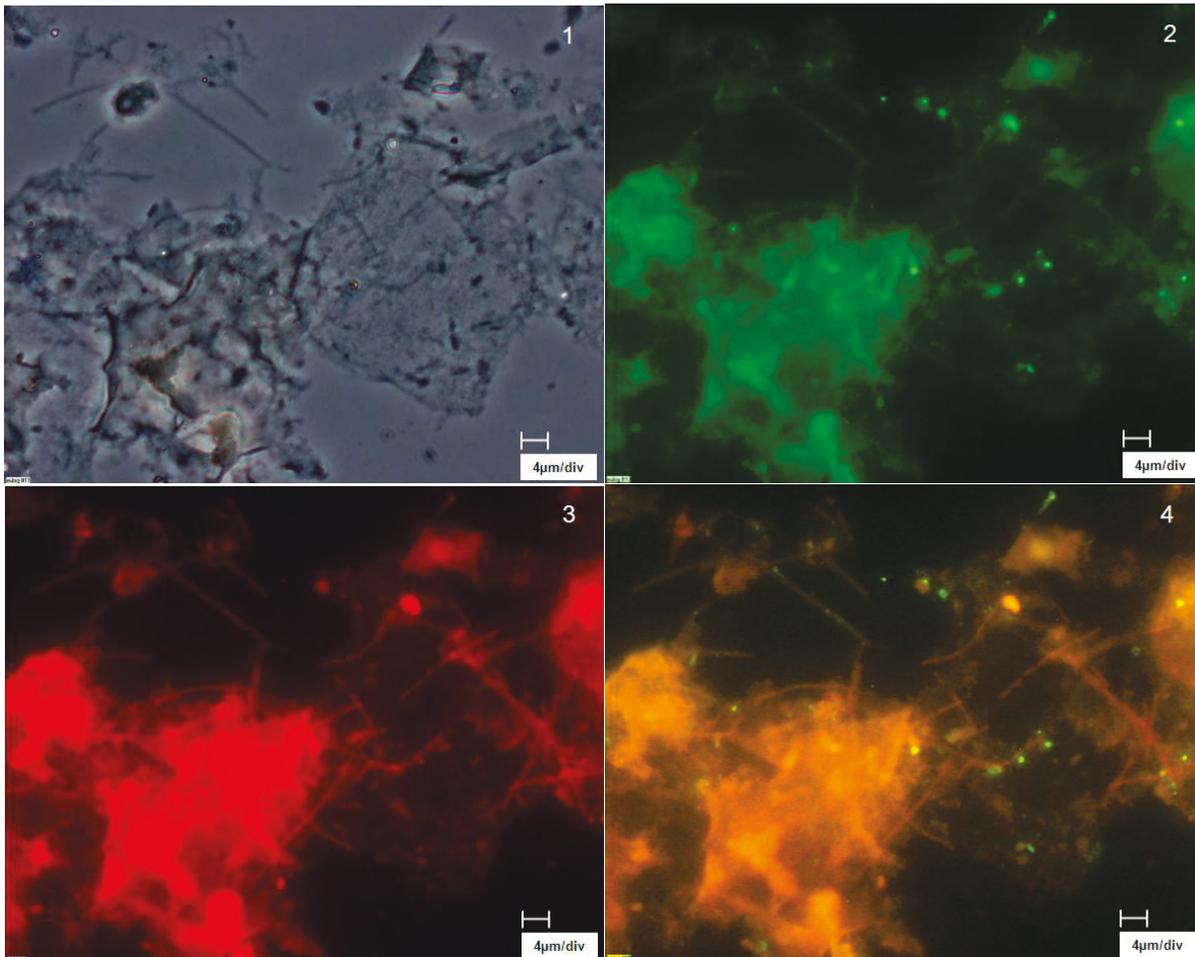


Abbildung 3.3: Mikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe (1:4 verdünnt); 1: lichtmikroskopische Aufnahme; 2: mit allgemeiner Bakteriensonde Rhodamin green (grün) markiert; 3: mit spezifischer Euryarchaeota-Sonde (AJA 12) - Cy 3 (rot) markiert; 4: Überlagerung der Aufnahmen 2 und 3.

Die Bildübersicht aus Abbildung 3.3 zeigt eine weitere Probe. Die lichtmikroskopische Aufnahme (Ausschnitt 1) ermöglicht, genau wie die lichtmikroskopische Aufnahme von Abbildung 3.2, keinerlei Aussage über die Art und Menge der in der Probe vorhandenen Organismen. Die Aufnahme mit der allgemeinen Archaeensonde (2) gibt einen Überblick über die Verteilung der gesamten Archaeen. Die spezifische Sonde im dritten Bildausschnitt zeigt kaum definierte Organismen. Die überlagerten Ausschnitte (4) lassen auch hier wieder vermuten, dass Bakterien und Archaeen aufgrund der Syntrophie eng nebeneinander liegen. So ist besonders auffällig, dass die grünen rundlichen Euryarchaeota häufig an den roten fadenförmigen Bakterien angelagert sind.

Anhand der bildgebenden Auswertung über FISH wurde die Häufigkeit der einzelnen Arten geschätzt. Im Folgenden (vgl. Abbildung 3.4) ist dies für den Laborfermenter dargestellt. Einige Protokolle wurden in dieser Zeit erst etabliert, so dass die Daten zu Beginn nicht komplett sind. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Häufigkeit der Organismen, zu deren Auswertung nur Bildausschnitte ausgewertet werden können, mittels FISH nur grob

geschätzt werden kann, da sie sehr stark ausschnitt-, proben- und auch betrachterabhängig ist (Amann et al., 1995).

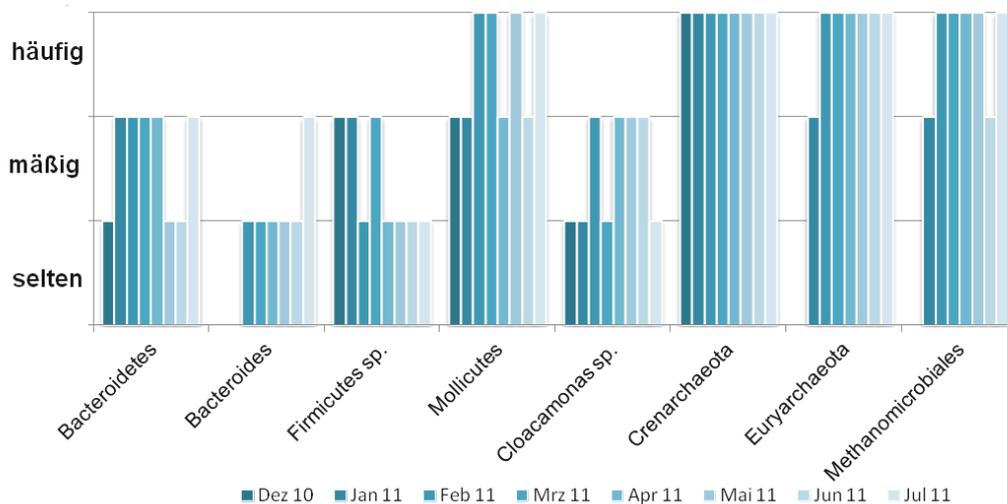


Abbildung 3.4: Abgeschätzte Häufigkeiten der dominanten Organismen in zu verschiedenen Zeitpunkten genommenen Proben des Laborfermenter, wobei selten 0 - 2, mäßig 3 - 6 und häufig mehr als sechs Organismen pro Bildausschnitt entspricht.

Die untersuchten Bakterien wiesen unterschiedliche Häufigkeiten auf. Bacteroidetes und *Firmicutes sp.* lagen nur selten vor, *Mollicutes* zeigte über den untersuchten Zeitraum die größte Präsenz. Alle untersuchten Archaeen waren abundant.

3.1.4 Quantifizierung der prozesstragenden Organismen mittels *rt* PCR

Nachdem durch FISH der Nachweis und eine räumliche Abschätzung der prozesstragenden Organismen ermöglicht wurde, sollte mit der *real time* PCR eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung der Zielorganismen etabliert werden. Dazu wurde verschiedenen Anlagen Material entnommen und zur Präparation genomischer DNA eingesetzt. Diese DNA diente dann als Template in *rt* PCR mit den organismenspezifischen Primern. Durch die parallele Amplifikation des Zielgens unter Verwendung des klonierten Zielgens in einem Vektor konnte die Zahl der Kopien in den DNA-Isolaten mit der bekannten Kopienanzahl des Plasmids berechnet werden. Die Quantifizierung erfolgte für jedes Primerpaar über eine Plasmidverdünnungsreihe (vgl. 2.1.4 Quantifizierung der *Organismen mittels real time* PCR, S. 24). Diese diente neben der Abschätzung der Nachweisgrenzen zur Ermittlung der C_T -Werte. Beispielhaft sind hier die Kurvenverläufe der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenanzahl (siehe Abbildung 3.5) für Methanomicrobiales (AJA 1) dargestellt.

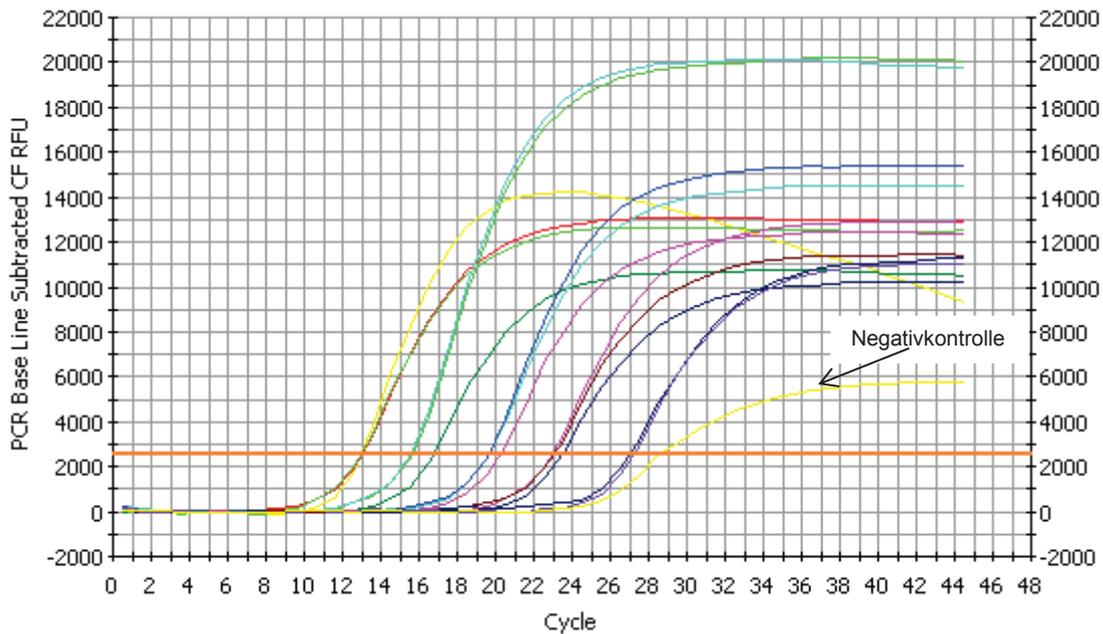


Abbildung 3.5: Amplifikationen von fünf Standardkonzentrationen in Dreifachbestimmung von Methanomicrobiales (AJA 1) sowie einer Negativkontrolle (gelb) mit dem automatisch kalkulierten Treshold (orange).

Zur Erstellung der Standardgeraden ist neben den ermittelten C_t -Werten die Anzahl der Plasmidkopien zu Beginn nötig (Rutledge, 2003). Diese wurde aufgrund der bekannten Daten wie der Plasmidkonzentration und der Fragmentlänge wie folgt (siehe Formel 3.1, Formel 3.2 und Formel 3.3) berechnet:

$$M_{\text{Fragment}} = \frac{1 \mu\text{g} * \text{Fragmentlänge (bp)}}{1,52 \text{ pmol} * 1000 \text{ bp}}$$

Formel 3.1: Formel zur Berechnung der Molmassen der spezifischen DNA-Fragmente.

$$n_{\text{Fragment}} = \frac{m_{\text{Fragment}} (\mu\text{g})}{M_{\text{Fragment}} (\mu\text{g}/\text{pmol})}$$

Formel 3.2: Formel zur Berechnung der Stoffmenge.

$$\text{Anzahl (Kopien)} = n_{\text{Fragment}} * \text{Avogadrokonstante}$$

Formel 3.3: Formel zur Berechnung der Fragmentanzahl.

Anhand dieser Daten wurden für jedes Primerpaar Standardgeraden erstellt, indem die C_t -Werte gegen den Logarithmus der Templatezahl (Anzahl der Kopien in der Probe zu Beginn) aufgetragen wurden. Beispielhaft ist im Folgenden (Abbildung 3.6) die Ermittlung der Standardgeraden mit einem Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,99$ für die Methanomicrobiales dargestellt.

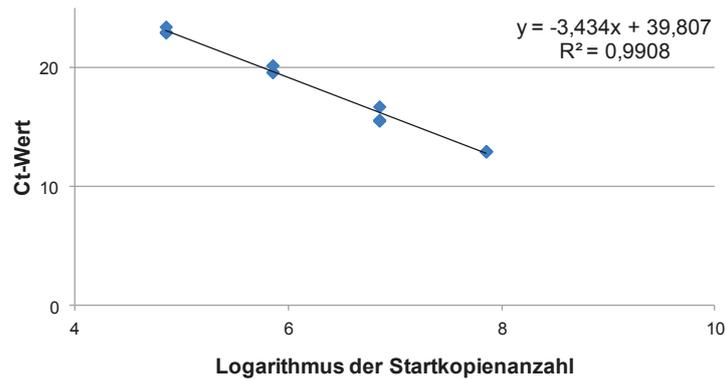


Abbildung 3.6: Darstellung der C_t -Werte der Standardkonzentrationen gegen die logarithmische Anzahl der Kopienzahl am Beispiel von *Methanomicrobiales* (AJA 1).

Die Berechnung der Effizienz der PCR wurde mit Hilfe der Formel (vgl. Formel 3.4) aus der Steigung m berechnet (Larionov et al., 2005).

$$E = 10^{\frac{1}{-m}} - 1$$

Formel 3.4: Formel zur Berechnung der PCR-Effizienz (Larionov et al., 2005).

Als Kontrolle wurde im Anschluss immer eine Schmelzkurve erstellt, wie in Abbildung 3.7 ersichtlich.

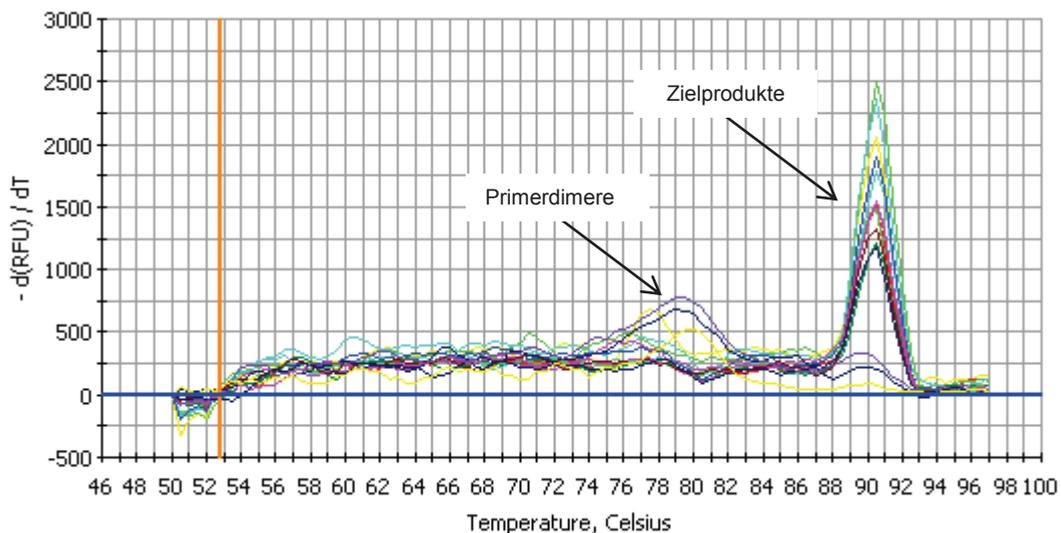


Abbildung 3.7: Bestimmung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte durch das Auftragen der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur.

Die Schmelzkurven zeigen die Temperatur an, bei welcher die Doppelhelix des PCR-Produktes aufschmilzt und bieten somit eine Kontrolle, ob ein Signal von Primerdimeren oder vom tatsächlichen PCR-Produkt des Zielgens herrührte. Die PCR-Zielprodukte der spezifischen Primer denaturieren je nach Länge und GC-Gehalt bei ca. 90 °C, während Primeroligomere deutlich geringe Schmelztemperaturen aufweisen.

Ergebnisse

In Tabelle 3.5 sind die gefundenen Geradengleichungen für die Quantifizierung unterschiedlicher Zielsequenzen zusammengefasst. Kurvenverläufe und graphische Auftrugungen der Standardgeraden aller Primer sind im Anhang gezeigt.

Tabelle 3.5: Übersicht über die Standardgeradengleichungen, die Korrelationskoeffizienten und die PCR-Effizienzen, erzeugt durch spezifische Primer und bekannte Konzentrationen der Plasmide.

Zielorganismus	Standardgeradengleichung	Korrelationskoeffizient	Effizienz (%)
Bacteroidetes	$y = -4,430 x + 58,353$	0,997	67,3
<i>Bacteroides</i>	$y = -3,294 x + 37,713$	0,998	101,3
<i>Firmicutes sp.</i>	$y = -3,335 x + 37,143$	0,999	99,5
<i>Mollicutes</i>	$y = -3,555 x + 38,320$	0,997	91,2
<i>Cloacamonas sp.</i>	$y = -3,541 x + 39,676$	0,998	91,6
Crenarchaeota	$y = -3,637 x + 43,855$	0,997	88,4
Euryarchaeota	$y = -3,601 x + 40,769$	0,999	89,5
Methanomicrobiales	$y = -3,434 x + 39,807$	0,991	95,6
<i>Methanosaeta concilii</i>	$y = -3,524 x + 41,686$	0,996	92,2

Die C_t -Werte einzelner Proben wurden für y in die jeweilige Geradengleichung des spezifischen Standards eingesetzt, um die in den DNA-Isolaten enthaltenen Kopienanzahlen n als x -Wert für einzelne Zielgene zu ermitteln. In den folgenden Abbildungen wird die Anzahl der berechneten Templates sowohl auf 100 % PCR-Effizienz umgerechnet und auf 1 ng isolierte genomische DNA bezogen. Somit ist eine Vergleichbarkeit der einzelnen Kopienzahlen für die verschiedenen 16S rRNA-Gene möglich. Es muss aber berücksichtigt werden, dass daraus nicht direkt auf die Zahl der vorhandenen Organismen geschlossen werden kann, da verschiedene Organismen signifikant unterschiedliche Kopienanzahlen für rRNA-Gene haben.

Vergleich der Datenbank-Resultate mit *real time* PCR-Häufigkeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt, um die Häufigkeit unterschiedlicher Organismen in Proben zu ermitteln: Zunächst wurden individuelle 16S rRNA-Gene mittels PCR amplifiziert, klonal isoliert und ihre Abundanz in der Probe quantifiziert (Jülicher, 2010). Danach wurden zielspezifische Primer zur Quantifizierung der Templates in derselben DNA mittels *real time* PCR eingesetzt, um ebenfalls eine Abschätzung der Häufigkeit zu ermöglichen. Zur Validierung der Ergebnisse konnten diese Ergebnisse nun miteinander verglichen werden (vgl. Abbildung 3.8).

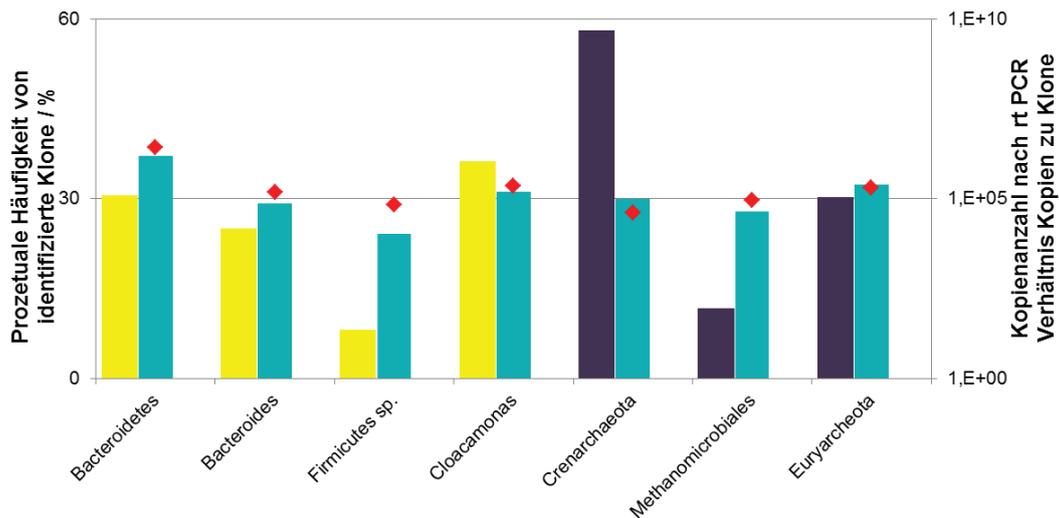


Abbildung 3.8: Vergleich der Methoden Gendatenbank und *rt* PCR bezüglich der prozentualen Häufigkeit der identifizierten Klone (■ Bakterienklone, ■ Archaeenklone), bzw. der Kopienanzahlen (■), ergänzt mit dem Vergleich der Verhältnisse Kopien zu Klone zueinander (◆).

Der Vergleich der Probe bezieht sich auf das Verhältnis der identifizierten Klone der Datenbank, getrennt nach Bakterien und Archaeen und die Kopienanzahl, ermittelt durch *rt* PCR. Ein prozentualer Vergleich der Häufigkeiten, der eine direktere Übersicht gegeben hätte, konnte aufgrund der fehlenden Daten der rRNA-Häufigkeiten in den jeweiligen Organismen nicht erfolgen. Die Häufigkeiten variieren je nach Organismus zumeist zwischen vier und 20 Genen.

Anhand der Grafik (Abbildung 3.4) wird jedoch dennoch deutlich, dass bei den Bakterien die Häufigkeiten der untersuchten Organismen Ähnlichkeiten aufweisen, was bei den Daten der Archaeen nicht der Fall ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den Bakterien beide Methoden, sowohl die Datenbankerstellung als auch die *real time* PCR, reproduzierbar die Mikrobiologie im Fermenter abbilden können. Da dies aber bei den Archaeen nicht der Fall ist, ist der Unterschied wahrscheinlich in der Auswahl der allgemeinen Primer im ersten Schritt der Datenbank begründet. Diese beeinflusst die Datenbank in hohem Maße. In dem hier untersuchten Fall kann davon ausgegangen werden, dass der allgemeine bakterielle Primer die Verhältnisse im Fermenter gut widerspiegelt, der Archaeenprimer jedoch nicht. Um dies von vornherein auszuschließen, ist es sinnvoller, Datenbanken eventuell anhand von zwei oder drei allgemeinen Primern zu erstellen.

Somit ist auch zu erklären, warum der in der Literatur als dominant beschriebene Organismus *Methanosaeta concilii* in der Datenbank nicht nachgewiesen wurde. Im nachhinein wurde festgestellt, dass die als allgemeine Archaeenprimer beschriebenen Sequenzen nicht komplementär zu *M. concilii* sind. Eine Vorauswahl in einer Datenbank geschieht somit je nach Primerauswahl, wodurch unter Umständen so selbst dominante Gruppen nicht erfasst werden können. Die Literatur weist keine weiteren dominanten Gruppen auf, die zusätzlich zu den analysierten hätten berücksichtigt werden müssen.

3.1.5 Analysen des Laborfermenters

Physikalisch chemische Analysen

Die überwachenden Analysen des 10 L-Laborfermenters erfolgten zeitnah, jedoch offline. Im Folgenden (vgl. Abbildung 3.9) sind die pH-Werte und die Redoxpotentiale über den Zeitraum von März 2009 bis September 2011 dargestellt.

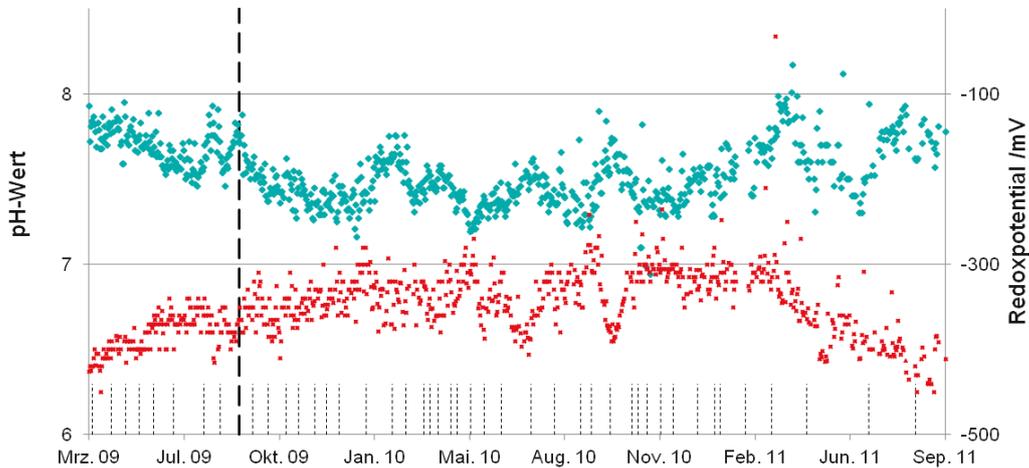


Abbildung 3.9: Graphische Darstellung des pH-Wertes (◆) und der Redoxpotentiale (■) des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (- -) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.

Auffällig ist ein Anstieg der Redoxpotentiale über das gesamte Jahr 2010 mit anschließendem kontinuierlichen Abfall in 2011. Die Werte liegen, abgesehen von seltenen einzelnen Ausnahmen, unter -300 mV, was als Grundvoraussetzung der Methanogenese gilt und somit zu erwarten war. Zu Beginn und zum Ende der Untersuchungen lag der pH-Wert bei ca. 7,8, zwischenzeitlich fiel er ab und lag im Minimum bei 7,3. Dieser entgegengesetzte Trend von Redoxpotential und pH-Wert ist chemisch erklärt.

Die zeitliche Entwicklung der Pufferkapazität und des FOS/TAC-Verhältnisses ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

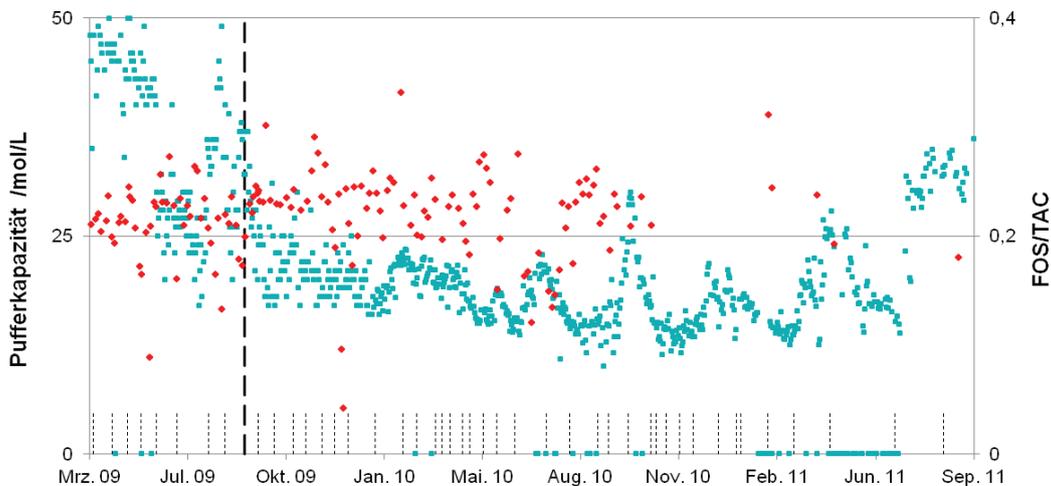


Abbildung 3.10: Graphische Darstellung der Parameter Pufferkapazität (■) und FOS/TAC (◆) des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten GÜlle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die GÜlle an.

Die Entwicklung der Pufferkapazität ergibt sich, wie chemisch nicht anders zu erwarten war, aus den zuvor gezeigten Verläufen des Redoxpotentials und des pH-Wertes. Das FOS/TAC-Verhältnis bleibt weitestgehend konstant, was für einen wenig sensitiven Parameter spricht.

Die Gasbildungsrate, im Folgenden immer pro 24 h aufgetragen, (siehe Abbildung 3.11) wurden bis August 2010 von der kompletten Anlage anhand eines Trommelgaszählers erfasst und ab November 2010 durch die Messung mittels Milligascounter ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt konnte bezüglich der Gasbildungsrate zwischen Fermenter und Nachgärer unterschieden werden.

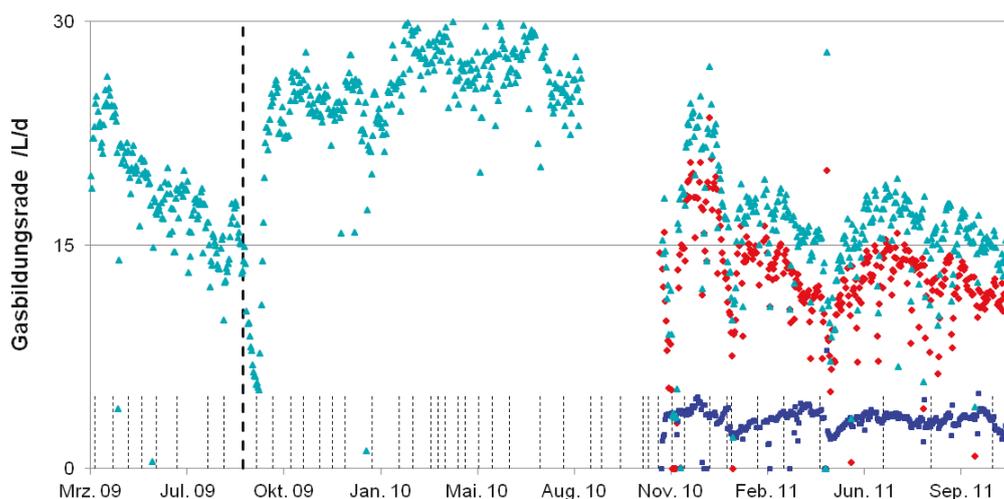


Abbildung 3.11: Graphische Darstellung der Gasbildungsrate der gesamten Anlage (▲), des Fermenters (◆) und des Nachgärs (■) aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten GÜlle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die GÜlle an.

Auffällig in der Grafik ist der starke Anstieg der Gasbildungsrate nach dem Wechsel des Güllelieferanten. Diese hohe Ausbeute hielt nicht dauerhaft an, sondern fiel langsam auf kontinuierliche 15 - 16 L/24 h ab. Die Möglichkeit der differenzierten Erfassung der Gasausbeuten zeigt deutlich, dass ca. 90 % des gebildeten Gases im Fermenter entsteht und somit das Substrat trotz geringer Verweilzeit hauptsächlich dort ausgärt.

Die dominanten Organismen im Laborfermenter sind im Folgenden von Sommer 2009 bis Sommer 2011 dargestellt (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Aufgrund der großen Datenmenge und zur besseren Übersicht sind Bakterien und Archaeen getrennt aufgeführt.

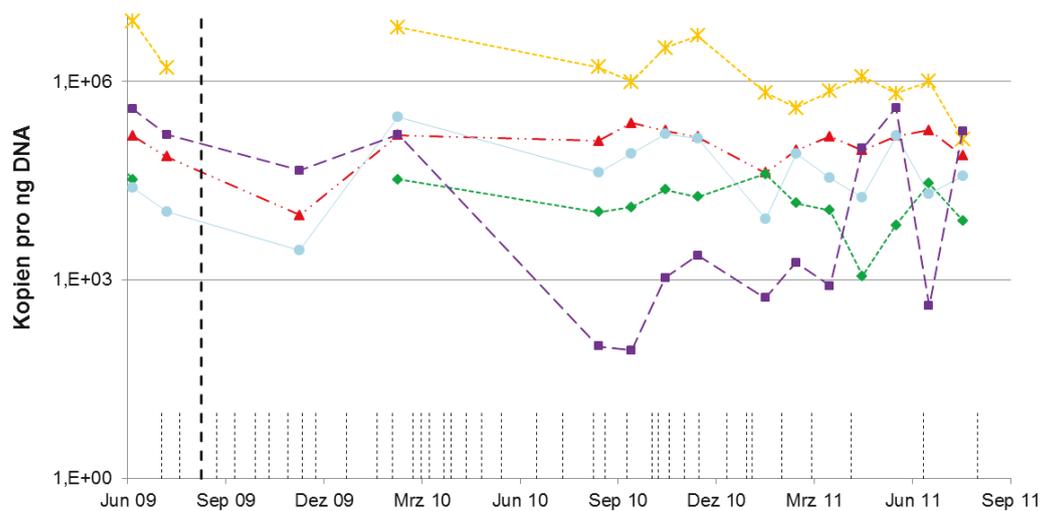


Abbildung 3.12: Kopienanzahl dominanter Bakterien (—*— Bacteroidetes, - -▲ - - Bacteroides, —●— Firmicutes sp., —◆— Mollicutes und —■— „Candidatus Cloacamonas sp.“) pro ng DNA-Isolat des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum (Sommer 2009 bis Sommer 2011). Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (- -) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.

Die Häufigkeit der Bakterien variiert über die Zeit und weist Kopienanzahlen von 100 bis $1 \cdot 10^7$ pro ng DNA auf. Die Verhältnisse der Spezies untereinander verlaufen ähnlich. So ist die Gruppe Bacteroidetes immer die dominanteste; „Candidatus *Cloacamonas sp.*“ und *Mollicutes* sind die subdominantesten Gruppen, wobei „Candidatus *Cloacamonas sp.*“ sehr in der Häufigkeit variiert.

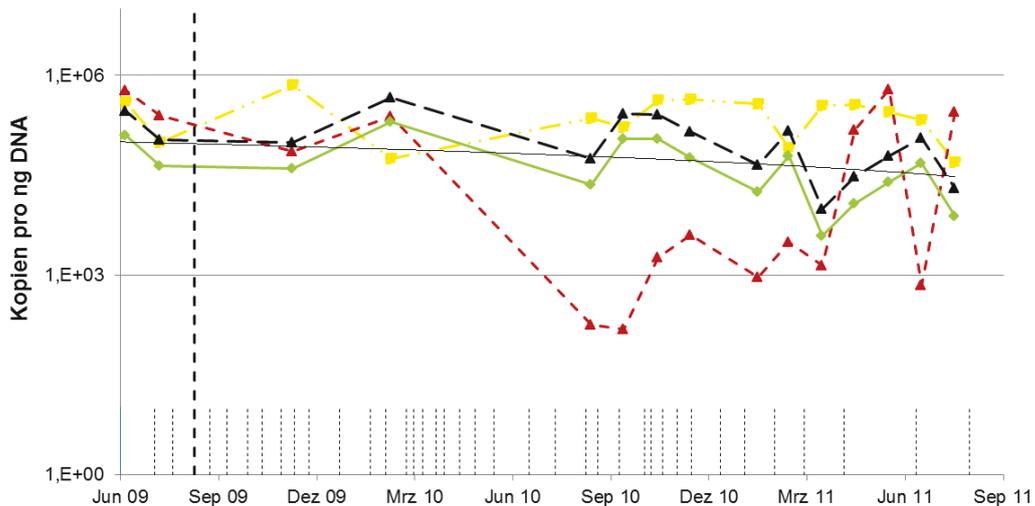


Abbildung 3.13: Kopienanzahl dominanter Archaeen (—■— Crenarchaeota, ---▲--- Euryarchaeota, —◆— Methanomicrobiales und ---▲--- *M. concilii*) pro ng DNA-Isolat des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum (Sommer 2009 bis Sommer 2011). Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (---) den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.

Anhand der Grafik (Abbildung 3.13) wird deutlich, dass die Abundanz der Archaeen hinsichtlich der Dominanz im Laborfermenter genau wie bei den Bakterien Schwankungen unterliegt, die bei den Archaeen jedoch geringer ausfallen. Sie liegen bezüglich ihrer Kopienanzahlen, bezogen auf ein ng Isolat, zwischen 500 und $1 \cdot 10^6$ Kopien pro ng DNA. Die Gruppe der Euryarchaeota weist den größten Schwankungsbereich auf und verläuft parallel zum „Candidatus *Cloacamonas sp.*“. Im Jahr 2009 wurden sie wesentlich häufiger detektiert als im Untersuchungszeitraum von Ende 2010 bis 2011.

3.1.6 Untersuchung von Großanlagen

Im Weiteren wurden unterschiedlichste Typen von Großanlagen analysiert (Abbildung 3.14). Die Auswahl der Anlagen basierte auf den jeweils verwendeten Fütterungsstrategien, wobei die Substrate, einmal eine Gülle/Maismischung mit durchschnittlich $\frac{1}{3}$ Gülle und $\frac{2}{3}$ Maissilage, bei der zweiten Anlage nur Maissilage und die Dritte nur Zuckerrübensilage nutzen. Alle Anlagen liefen am Tag der Probenahme in stabilem Prozess ohne Auffälligkeiten. Die Auswahl von drei Anlagen, die ohne Verfolgung der zeitlichen Änderung einmalig analysiert wurden, diente einer Abschätzung der Variationsbreite der Organismenzusammensetzung, die durch verschiedene Betriebsweisen hervorgerufen werden.

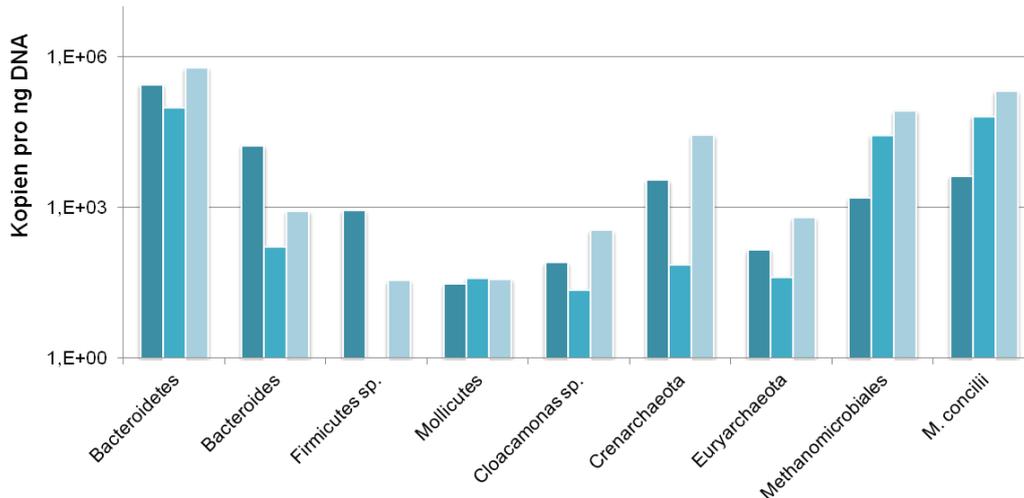


Abbildung 3.14: Kopienanzahl dominanter Organismen pro ng DNA-Isolat aus Proben verschiedener Großanlagen, die mit unterschiedlichem Substrat betrieben wurden (■ 1/3 Rindergülle und 2/3 Maissilage; ■ 100 % Maissilage; ■ 100 % Zuckerrübensilage).

Alle aus der Laboranlage identifizierten Organismengruppen konnten in den Anlagen nachgewiesen werden. Der Vergleich zeigt klare Unterschiede hinsichtlich der relativen Abundanz einzelner Gruppen, aber auch Gemeinsamkeiten, vor allem im Hinblick auf die Dominanz. Die beteiligten Archaeen Methanomicrobiales und *Methanosaeta concilii* sowie das Bakterium Bacteroidetes liegen ähnlich häufig und dominant vor. Auffällig ist, dass die gärenden Organismen *Firmicutes sp.* und *Mollicutes* vor allem in den Anlagen ohne Gülle nur in geringer Anzahl vorlagen.

3.2 Parallelfermentieranlage

3.2.1 Aufbau einer Parallelfermentieranlage

Für den Aufbau wurden Fermenter für die Nassfermentation mit zylinderförmiger Struktur gewählt (Weiland, 2010). Zur Durchmischung wurde eine zentrale Rührwelle in jeden Fermenter implementiert. Der Durchmesser der Rührwerke ist mit ca. $\frac{2}{3}$ des Fermenterdurchmessers etwas größer als üblich dimensioniert. Laut Literaturwerten ist für diesen Rührertyp ein optimales Verhältnis von 0,33 - 0,5 bezüglich Rührerdurchmesser zu Fermenterdurchmesser angegeben (Storhas, 1994). So wäre auch ein Einbau kleinerer Rührer theoretisch möglich gewesen. Aufgrund der Anordnung sehr weit unten im Fermenter schien aber ein Rührer mit größerem Durchmesser zweckmäßiger. Ergänzend zum Rührer wurde die Durchmischung durch eine größtmögliche Entfernung zwischen Fütterung und Überlauf erreicht. Die Fütterung in diesem System erfolgt von unten, der Überlauf befindet sich oben am Flüssigkeitsspiegel. Als Elektroden wurden speziell für den Prozess modifizierte Systeme genutzt. Die Substratzufuhr musste aufgrund der geringen Dimensionen der Zu- und Abläufe mit gesiebter Gülle erfolgen, um Verstopfungen zu verhindern. Dies bewirkte eine leicht veränderte Matrix, da Faserbestandteile nicht in den

Prozess eingetragen wurden (vgl. Jörres, 2010). Im miniaturisierten System mussten diesbezüglich Kompromisse eingegangen werden. Die Regelung und Steuerung, die von Werner und Reimann (Reimann, 2011) entwickelt wurde, erfolgte über die LabVIEW-Software. Somit war eine individuelle Datenaufnahme und Steuerung der Sollparameter Temperatur und Rührgeschwindigkeit und der Elektroden (pH-Wert und Redoxpotential) und Gasanalytik kontinuierlich möglich.

Bevor die Anlage in Versuchsphasen betrieben wurde, wurden alle Einzelparameter ausführlich getestet. Neben einer kontinuierlichen Gasfassung hinsichtlich Qualität und Quantität wurde auch eine automatisierte Fütterung verwirklicht. Die Temperaturregelung ermöglichte eine schnelle und genaue Temperierung, auch nach der Zugabe von nicht vorgewärmter Gulle. Die maximalen Schwankungen lagen bei $\pm 1,5$ °C. Die optimalen Betriebsparameter wurden spezifisch für die Anlage untersucht und werden im Folgenden dargestellt.

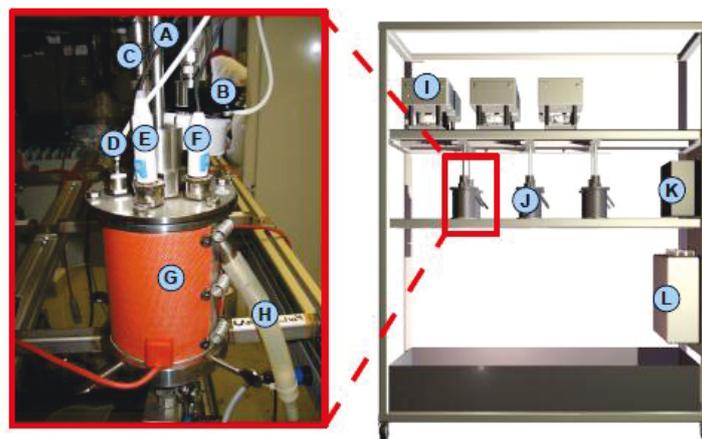


Abbildung 3.15: links: Aufbau eines einzelnen Fermenters; rechts: Aufbau der sechsfach Parallelanlage mit Elektroden: A: Rührwelle; B: Gaskühler; C: Sauerstoffelektrode; D: Temperatursensor; E: Redoxelektrode; F: pH-Elektrode; G: Heizmatte, H: Überlauf; I: Gasanalytik; J: Fermenter, K: Panel-PC, L: Schaltkasten.

3.2.2 Optimale Betriebsweise für das Parallelfermentersystem

Nachdem die sechsfache Parallelanlage aufgebaut worden war, wurde sie aufgrund ihrer optimalen Betriebsparameter untersucht. Zuerst erfolgten Tests bezüglich der maximalen Fütterungssteigerung. Die Fütterung setzte ein, wenn die Gasqualität 50 % Methan überschritten hatte. Diese Untersuchungen ergaben, dass eine Fütterungssteigerung, die $0,2 \text{ kg oTS/m}^3\text{d}$ überschreitet, den Prozess negativ beeinflusst. Daher wurde festgelegt, dass in allen folgenden Versuchen die Fermenterfuttermengen schrittweise um $0,2 \text{ kg oTS/m}^3\text{d}$ erhöht werden sollten, bis die jeweilige Zielfaulraumbelastung erreicht war.

Im zweiten Versuchsansatz wurde die optimale Faulraumbelastung für das System untersucht. Beim ersten Teil dieses Versuchsansatzes erfolgten die Untersuchungen in einem großen Bereich zwischen 0 und $21 \text{ kg oTS/m}^3\text{d}$, wobei jeder Fermenter mit einer

unterschiedlichen Belastung gefahren wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse, die auf ein Optimum zwischen 7 und 14 kg oTS/m³*d hindeuteten, wurde der Bereich weiter eingegrenzt und in einem zweiten Versuchssatz jeweils in Doppelbestimmung die Belastungen 8, 10 und 12 kg oTS/m³*d getestet. Hierbei stellte sich eine Faulraumbelastung von 10 kg oTS/m³*d als für das System optimal heraus. Somit wurde diese Faulraumbelastung als Standard für dieses System definiert.

Nach den gewonnenen Erkenntnissen wurde der Einfluss der Temperatur bei konstanter optimaler Faulraumbelastung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Temperaturbereich von 37 bis 40 °C einen konstanten Prozess mit guter Gasausbeute darstellt. Für die weiteren Versuche wurde eine Temperatur von 37 °C festgelegt.

Zusammenfassend ergaben die Vorversuche, dass die Fermenter zum optimalen Betrieb mit einer Raumbelastung von 10 kg oTS/m³*d, aufgeteilt auf sechs Fütterungen pro 24 h, kontinuierlicher Durchmischung und 37 °C betrieben werden sollten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die parallel betriebenen Fermenter auch parallele Kurvenverläufe bezüglich aller Parameter aufzeigten. Die ausführlichen Analysen, auch hinsichtlich der on- und offline-Parameter wie pH-Wert, Redoxpotential, FOS/TAC-Verhältnis etc., sind in den Arbeiten von Niklas Jörres (2010) und Florian Jansen (2011) dargestellt und erläutert.

3.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf den Anlagenbetrieb

Punktuelle Zugaben von Fettsäure

Die Untersuchungen des Einflusses von Fettsäuren erfolgten in Form einer gezielten Konzentrationserhöhung durch Zugabe kurzkettiger organischer Fettsäuren. Die folgenden Graphen (Abbildung 3.16 – 3.18) zeigen die Verläufe von zwei Fermentern, denen an Tag sieben 150 mmol/L Acetat bzw. 50 mmol/L Butyrat und an Tag 14 300 mmol/L Acetat bzw. 100 mmol/L Butyrat zugesetzt worden waren. In Abbildung 3.16 sind die Methan- und Kohlendioxidkonzentrationen als Stundenmittelwerte und die Gasmengenwerte als Summenparameter über 24 h abgebildet. Die Zugabezeitpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Daten des Kontrollfermenters, der über den Untersuchungszeitraum konstante Werte aufzeigte, sind im Anhang dargestellt (vgl. Abbildung 7.21).

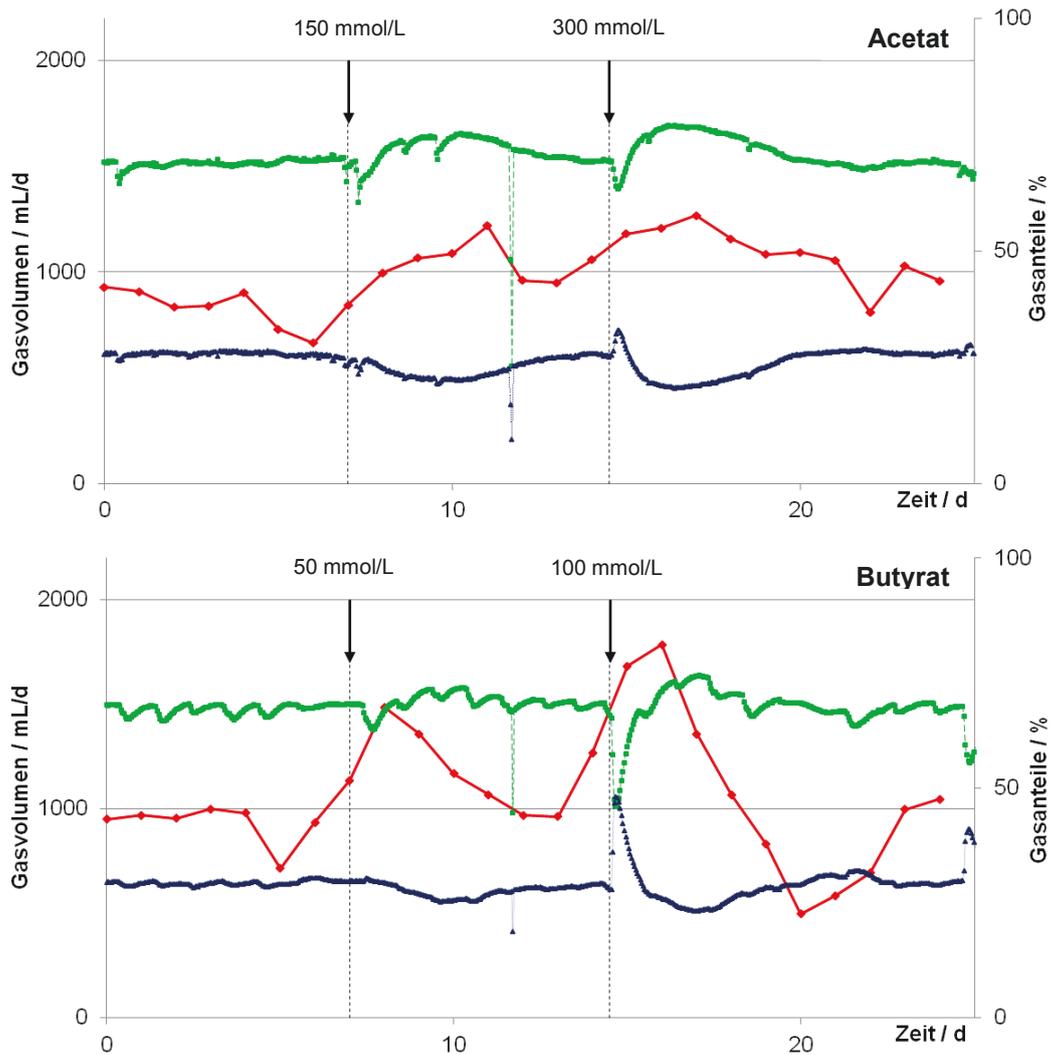


Abbildung 3.16: Entwicklung der Gasbildungsrate (—◆—) und Gasqualitäten (Methan —■— und CO₂ —▲—) während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Die Zugabe von Acetat bewirkt einen zeitverzögerten Anstieg in der Gasbildungsrate, gepaart mit einer geringen Verbesserung der Gasqualität. Einen direkten starken Anstieg des produzierten Gasvolumens erzeugten die Butyratzugaben bei geringem Anstieg des Methangehaltes.

Die real gemessenen Fettsäurekonzentrationen aus den Überläufen der Fermenter wurden über HPLC ermittelt und sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

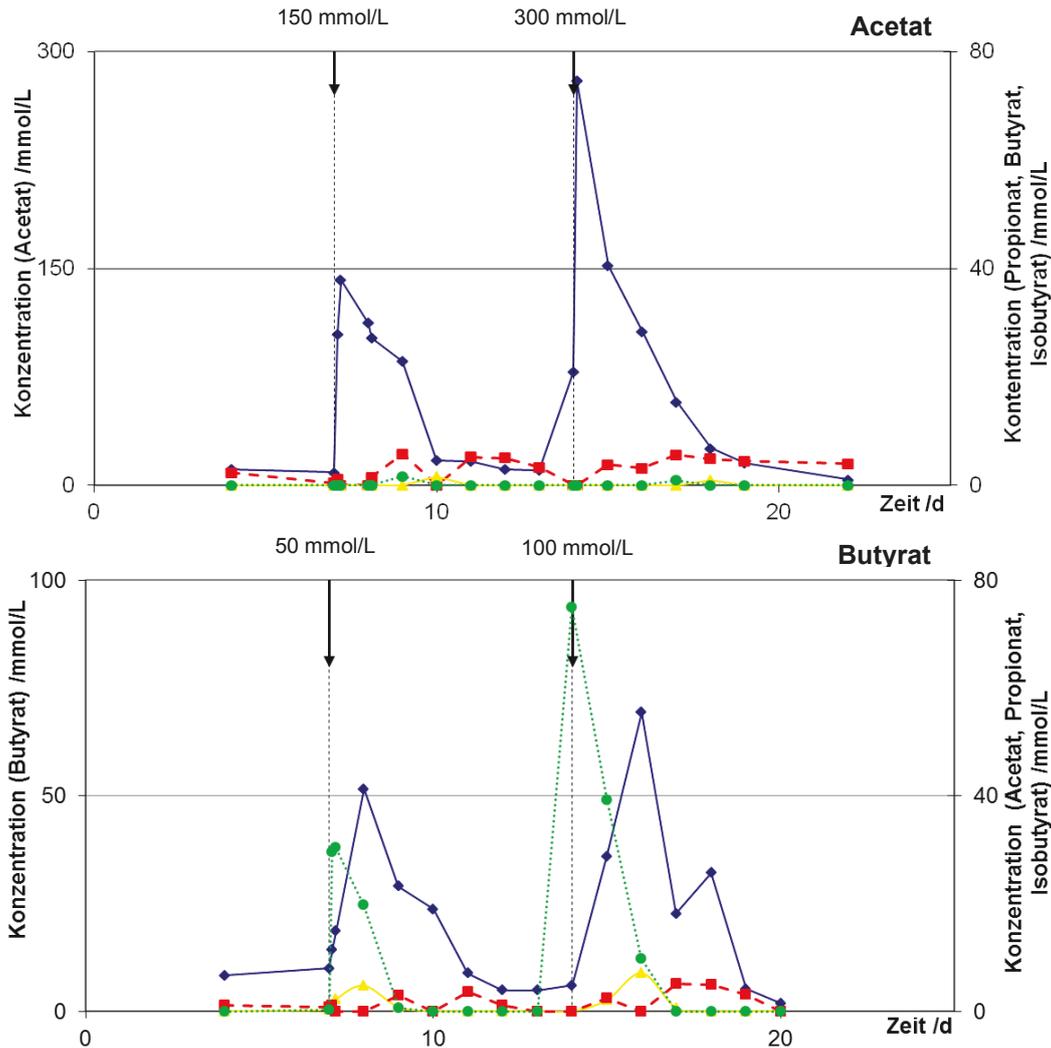


Abbildung 3.17: Gemessene Konzentrationen der flüchtigen organischen Fettsäuren (—●— Acetat, -■- Propionat, -●- Butyrat, -▲- Isobutytrat) während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Die analysierten Fettsäuren Acetat, Propionat, Butyrat und Isobutytrat zeigen im Kontrollfermenter geringe Konzentrationen auf gleichbleibend niedrigem Niveau (Abbildung 7.21, S. XXXIV). Die Acetatzugaben zeigen eine zügige Abnahme des zugesetzten Acetats und ein Normalniveau nach drei Tagen. Während der Abnahme des Acetats stiegen die Konzentrationen des Butyrats transient und des Propionats persistent an. Anhand der Werte der Butyratzugaben ist ebenfalls eine schnelle Abnahme der zugegebenen Säure messbar. Es konnte daraufhin ein starker Anstieg der Acetatkonzentration bestimmt werden. Ebenfalls stiegen die Konzentrationen von Isobutytrat und Propionat an.

Über den gleichen Zeitraum sind im Folgenden die dominanten Organismen des Prozesses anhand Ihrer Kopienanzahl pro ng isolierter DNA aufgetragen (Abbildung 3.18).

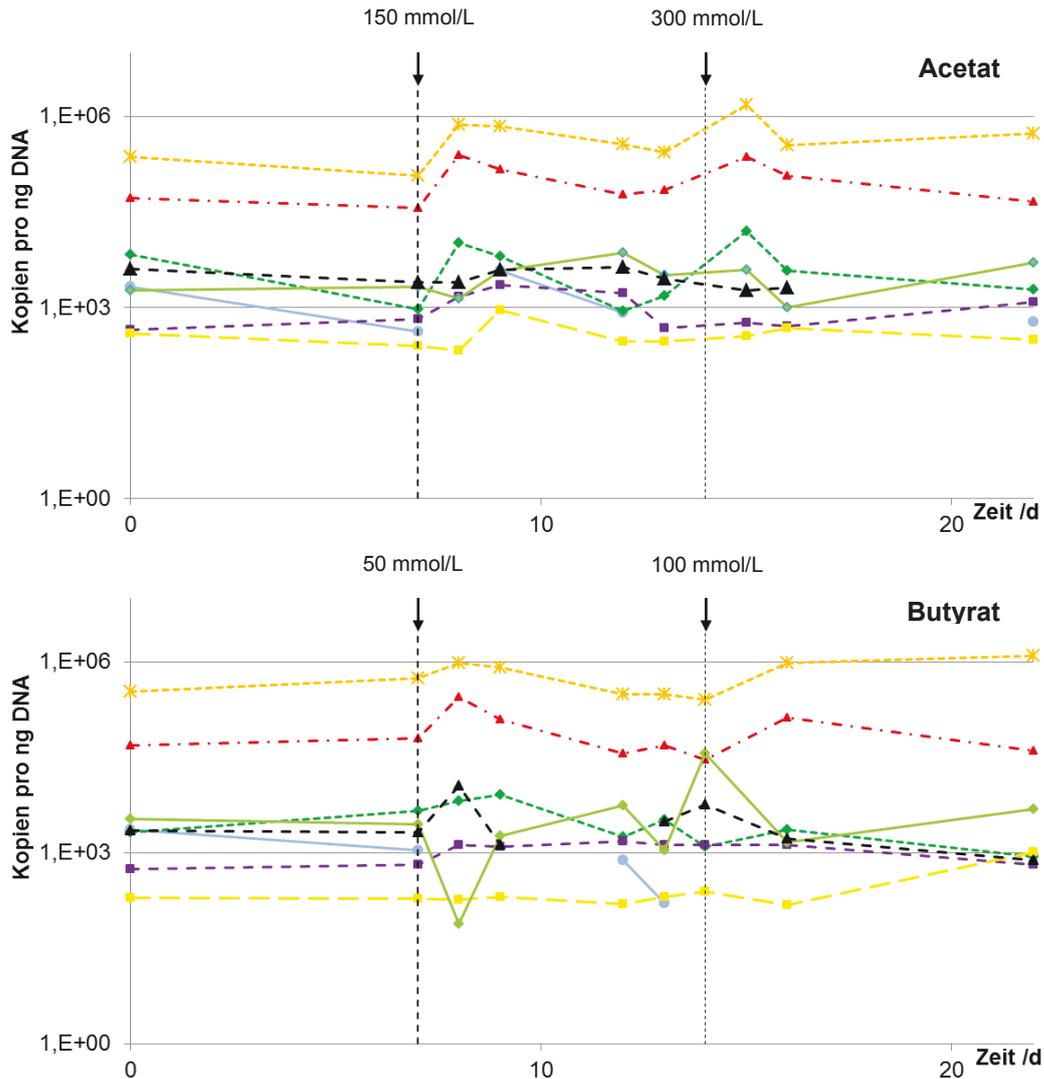


Abbildung 3.18: Entwicklung der Häufigkeiten der dominanten Prozessorganismen (---*--- Bacteroidetes, ---▲--- Bacteroides, ---●--- Firmicutes sp., ---◆--- Mollicutes, ---■--- „Candidatus Cloacamonas sp.“, ---■--- Crenarchaeota, ---◆--- Methanomicrobiales und ---●--- *M. concilii*) pro ng DNA-Isolat während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Zu Beginn der Versuche waren die untersuchten Organismen in ihrer Abundanz in allen Fermentern ähnlich und gleichbleibend (vgl. Abbildung 7.21, S. XXXIV). Die Zugaben von Acetat bewirken kurzzeitige, aber signifikante Anstiege bei *Mollicutes*, *Firmicutes sp.*, *Bacteroides* und Bacteroidetes. *Bacteroides* und Bacteroidetes zeigten dies auch bei Butyratzugaben, wohingegen Methanomicrobiales dort eine große Streuung in den Werten aufwies. Alle anderen Organismen unterlagen nur den natürlichen Schwankungen der Analytik.

Semikontinuierliche Zugabe der Fettsäuren

Nach den ersten beiden Zugaben folgte eine Zeit ohne Zugaben, bis die Ausgangswerte (Nullwerte) wieder erreicht waren (vgl. Abbildung 7.22, S. XXXV). Dem folgte eine regelmäßige Zugabe im Zeitabstand von 48 h mit 300 mmol/L Acetat bzw. 100 mmol/L Butyrat. Die Daten dieses Zeitraums sind in den folgenden Abbildungen (vgl. Abbildung 3.19 und 3.20) für die Versuchsfermenter und im Anhang für den Kontrollfermenter dargestellt.

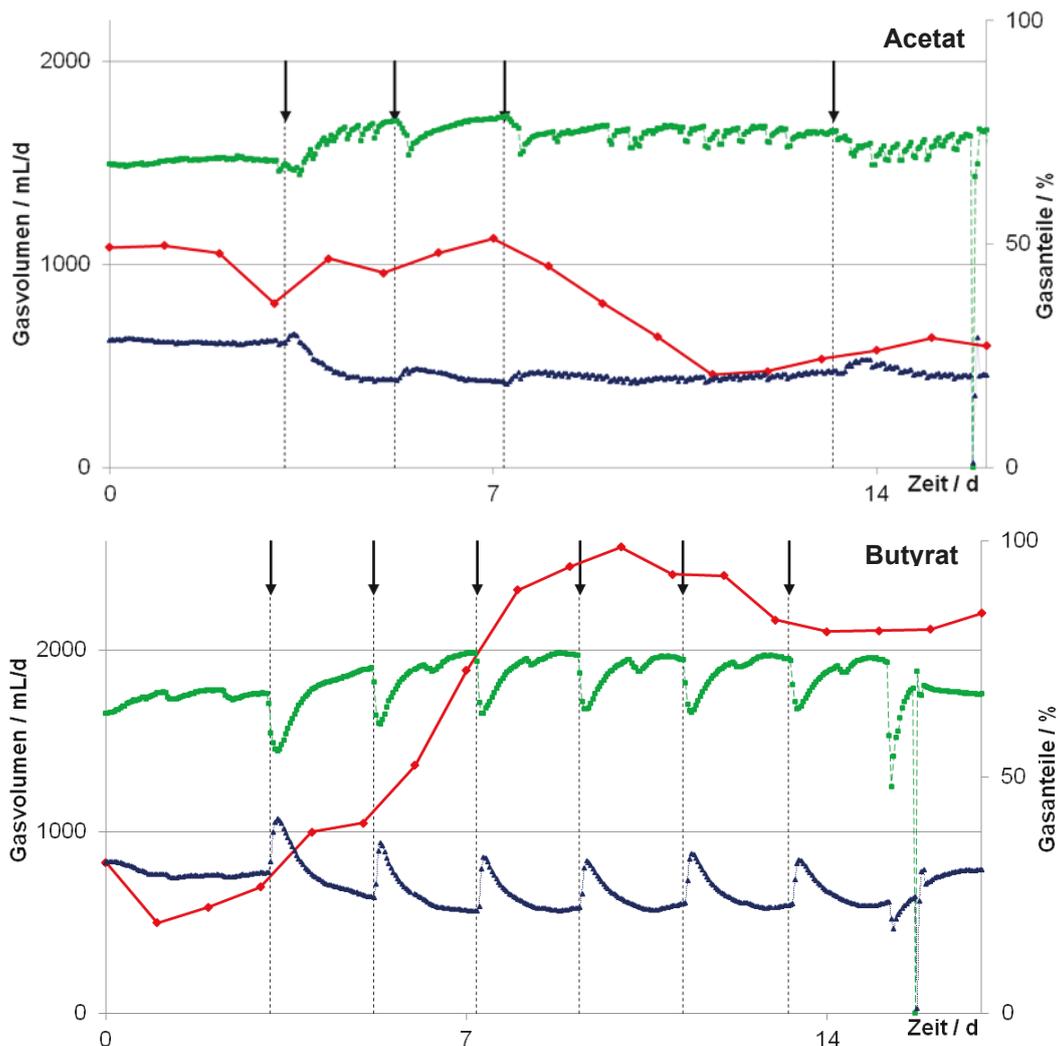


Abbildung 3.19: Entwicklung der Gasbildungsrate (—●—) und Gasqualitäten (---■--- Methan und —▲— CO₂) während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat . Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Die quasikontinuierliche Zugabe von Acetat zeigt nach zwei Zugaben einen konsequenten Rückgang der Gasbildungsrate. Aufgrund dessen wurde die Zugabe nach fünf Zugaben beendet, um einen kompletten Einbruch der Mikrobiologie zu verhindern. Dem Butyrat zugefütterten Fermenter zeigt einen enormen Anstieg der Gasausbeute. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass die Achse der Gaserfassung anstatt ein Maximum von 2200 einen Maximalwert von 2600 mL/d aufweist. Die Gasqualität erfährt durch jede Injektion einen kurzen Einbruch, steigt aber während der Versuchslaufzeit.

Die im gleichen Zeitraum gemessenen kurzkettigen organischen Säuren sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

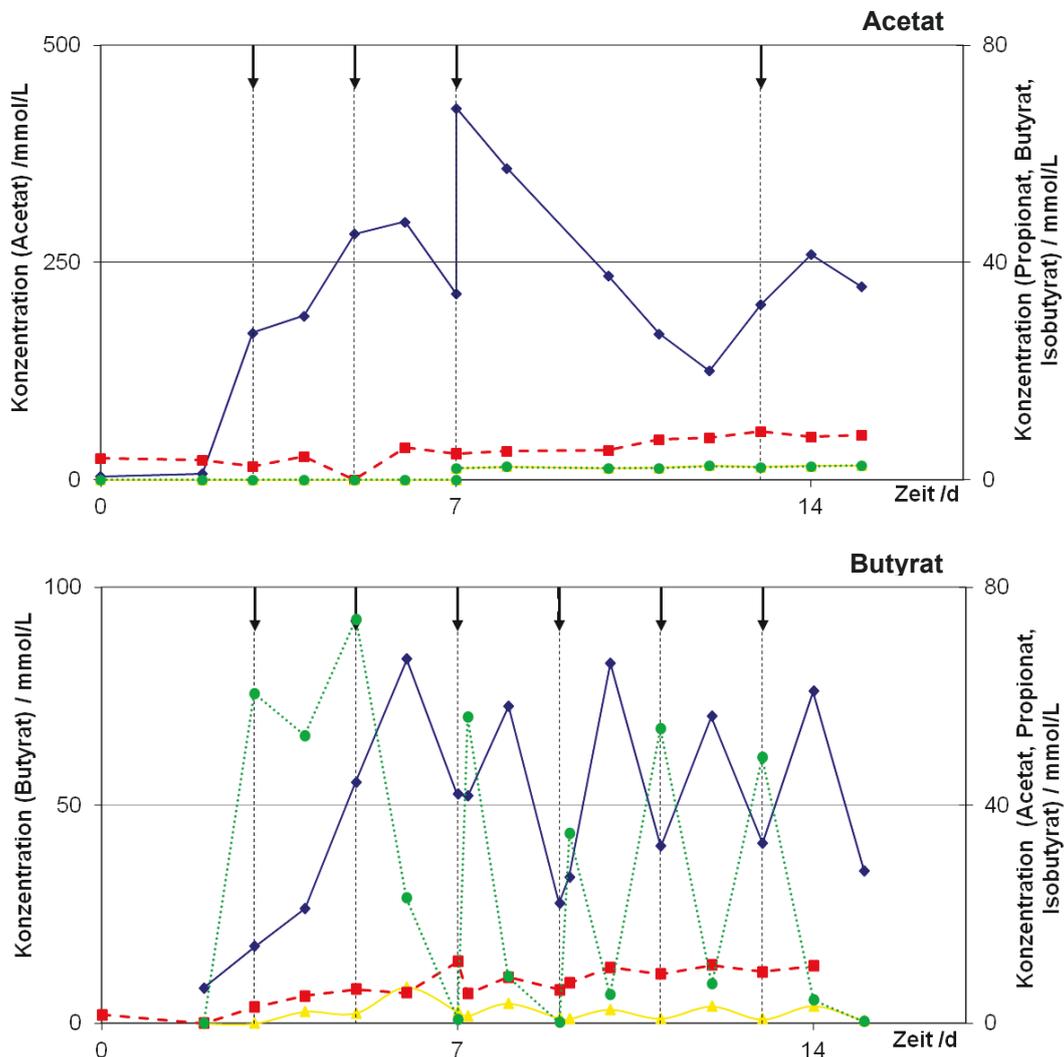


Abbildung 3.20: Gemessene Konzentrationen der flüchtigen organischen Fettsäuren (—◆— Acetat, -■- Propionat,●..... Butyrat, —▲— Isobutyrat) während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Der Acetatfermenter wies über den Versuchszeitraum keine Auffälligkeiten bezüglich der FS-Konzentrationen auf. Die Zugabe von Acetat bewirkte eine steigende Konzentration im Fermenter. Aufgrund des starken Abfalls der Gasbildungsrate wurden die vierte und fünfte Zugabe aufgrund geringer Gasbildungsraten ausgesetzt. In diesem Zeitraum sank die Acetatkonzentration. Die Propionatkonzentration stieg kontinuierlich über den Untersuchungszeitraum an. Gleiche Tendenzen, jedoch in geringerem Ausmaß, zeigten auch Butyrat und Isobutyrat. Die semikontinuierliche Zugabe von Butyrat zeigt sich deutlich in der obigen Abbildung. Entgegengesetzt dazu verlaufen die Konzentrationen von Acetat und Isobutyrat. Über den kompletten Untersuchungszeitraum stieg die Konzentration von Propionat kontinuierlich an.

Ergebnisse

Die Häufigkeit der prozesstragenden Organismen in den drei bereits dargestellten Fermentern sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (vgl. Abbildung 3.21).

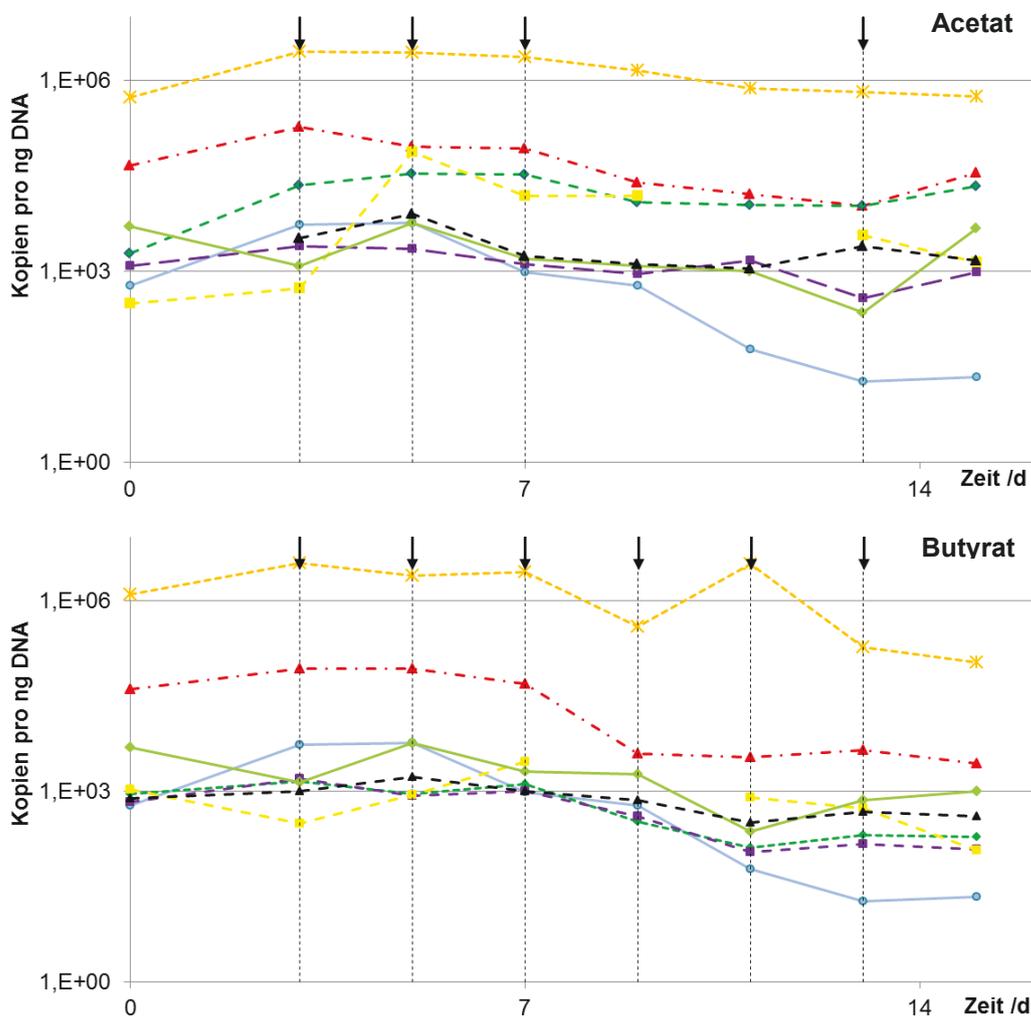


Abbildung 3.21: Entwicklung der Häufigkeiten der dominanten Prozessorganismen (---*--- Bacteroidetes, ---▲--- Bacteroides, ---●--- Firmicutes sp., ---◆--- Mollicutes, ---■--- "Candidatus Cloacamonas sp.", ---■--- Crenarchaeota, ---◆--- Methanomicrobiales und ---▲--- *M. concilii*) pro ng DNA-Isolat während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.

Bei der Betrachtung der Häufigkeit im Vergleich zur ersten Versuchsphase sind keine gravierenden Änderungen der Mikrobiologie zum Startzeitpunkt und im Kontrollfermenter zu verzeichnen (Abbildung 7.22, S. XXXV). Die Acetatzugaben rufen einen spontanen Anstieg an Crenarchaeota und einen Abfall bei *Firmicutes sp.* hervor. Die Butyratzugabe weist über die Zugaben eine kontinuierliche Abnahme aller untersuchten Organismen auf, im speziellen jedoch des Gärers *Firmicutes sp.*.

3.3 Sensormessungen

Nachdem ein Überblick über die dominanten Prozessorganismen vorliegt, kann die Entwicklung einer mikroorganismenbasierten Kontrollmethode erfolgen. Dazu wurde *M. concilii* als Indikatororganismus ausgewählt, da dieser in allen Anlagen nachweisbar und aufgrund seines rein acetoklastischen Stoffwechsels gut für den pH-sensitiven Sensor geeignet war. Dessen Stoffwechselaktivität kann über den Abbau von Acetat und der daraus folgenden pH-Wertänderung ausgelesen werden.

3.3.1 Aufbau

Chipaufbau

Der Chip aus der AG Schöning bietet die Möglichkeit einer Differenzmessung. Zur Realisierung wurde auf die Oberfläche ein ca. 160 µm dicker SU-8 Fotolack aufgebracht, der den Chip umrandete. Zusätzlich wurde ein ca. 1 mm breiter Steg aufgedampft, der so strukturiert wurde, dass zwei Kammern entstehen. Diese haben jeweils die Fläche von 13 x 6 mm (vgl. Abbildung 3.22). Bei Messungen wurden auf der einen Seite die im Gel immobilisierten Organismen aufgetragen. Die andere Kammer wurde als „Nullwert“ genutzt, um den Drift des Sensors bestimmen und errechnen zu können. Dort wurde ein organismenleeres Kontrollgel aufgetragen.

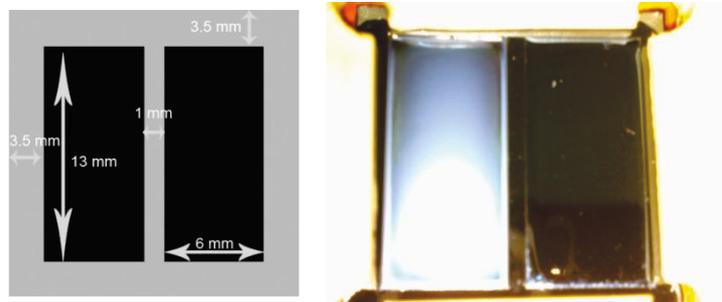


Abbildung 3.22: links: Chipaufbau mit Differenzanordnung und Längenangaben, wobei der Messbereich schwarz dargestellt ist; rechts: Foto eines Chips, der in der linken Kammer ein Acrylamidgel mit immobilisierten *E. coli* und in der rechten Kammer ein Kontrollgel beinhaltet (Quelle: AG Schöning).

Für anaerobe Messungen wurde eine Apparatur aufgebaut (siehe Abbildung 3.23), die Messungen der sauerstoffempfindlichen Organismen im Durchfluss ermöglicht. So wurde in Kooperation zwischen den am Forschungsprojekt arbeitenden Arbeitsgruppen eine Messzelle konzipiert und in der Werkstatt der FH Aachen gefertigt, die aus Plexiglas modular zusammengesetzt wird. Als Basis diente eine Kammer mit ca. 17 mL Volumen, in die der Chip von unten eingebaut wurde. Oberhalb wurden drei Öffnungen für die Referenz-pH-Elektrode, die Temperaturerfassung und einen Gasauslass konstruiert. Zusätzlich wurden zwei seitliche Öffnungen, die als Zu- und Ablauf für Medium dienen, realisiert. Zur

Temperierung konnte das gesamte System in ein Wasserbad eingesetzt werden, das über einen Temperaturfühler (Pt 100) reguliert werden kann.

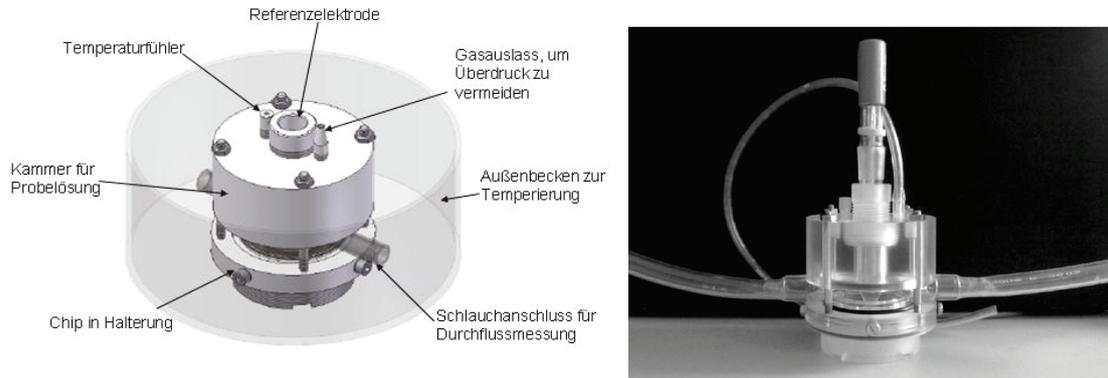


Abbildung 3.23: links: Schematische Darstellung der entwickelten Anaerob-Messzelle mit den Möglichkeiten der Temperierung, der Durchflussmessung, der Temperaturerfassung und einer Messstelle für die Referenzelektrode (Schumacher, 2009); rechts: Foto der Messkammer mit Referenzelektrode ohne Becken zur Temperierung (Quelle: AG Schöning).

3.3.2 Immobilisierung und Organismenaktivität

Nach diversen Versuchen zur Fixierung der Organismen wurde als Standardverfahren für die Sensormessungen die Einschlussimmobilisierung in einem Acrylamid/Bisacrylamidgel ausgewählt.

Test der Organismenverteilung im Gel

Das Acrylamidgel mit *E. coli* wurde direkt nach dem Auspolymerisieren unter dem Mikroskop betrachtet (siehe Abbildung 3.24). Zusätzlich wurde es mit Wasser abgespült, um den Einfluss auf die mechanische Belastung und die Organismen abschätzen zu können.

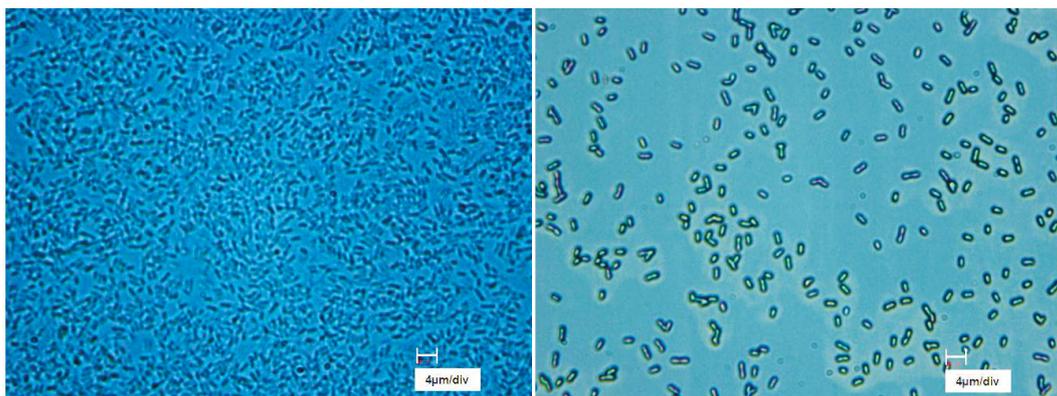


Abbildung 3.24: Lichtmikroskopische Aufnahme von in einem Acrylamidgel immobilisierten *E. coli*; links: *E. coli* im Gel direkt nach Immobilisierung; rechts: *E. coli* im Gel nach Abspülen mit Wasser.

Die Verteilung von *E. coli* im Gel gestaltete sich sehr gleichmäßig. Es waren mehrere Lagen erkennbar. Die Stege und Kanten waren frei von Gel und Organismen. Das Abspülen des

Gels bewirkte ein Abwaschen der oberen Organismen. Aufgrund dessen wurde zur Rückhaltung der Organismen im Gel zusätzlich eine Membran aufgelegt.

3.3.3 Messungen mit *Escherichia coli*

Zur Überprüfung und Optimierung des Aufbaus und des Messprinzips wurden Versuche mit dem Bakterium *Escherichia coli* durchgeführt.

Proof of principle

Die Messung startete mit der Zugabe von zwei Milliliter LB-Medium auf den Tantalpentoxid-Chip. Nach acht Minuten wurde ein Milliliter *E. coli* üN-Kultur zugesetzt. Die Potentialverläufe und die durchschnittlichen Potentialänderungen pro Zeiteinheit sind in Abbildung 3.25 dargestellt (Werner et al., 2011a).

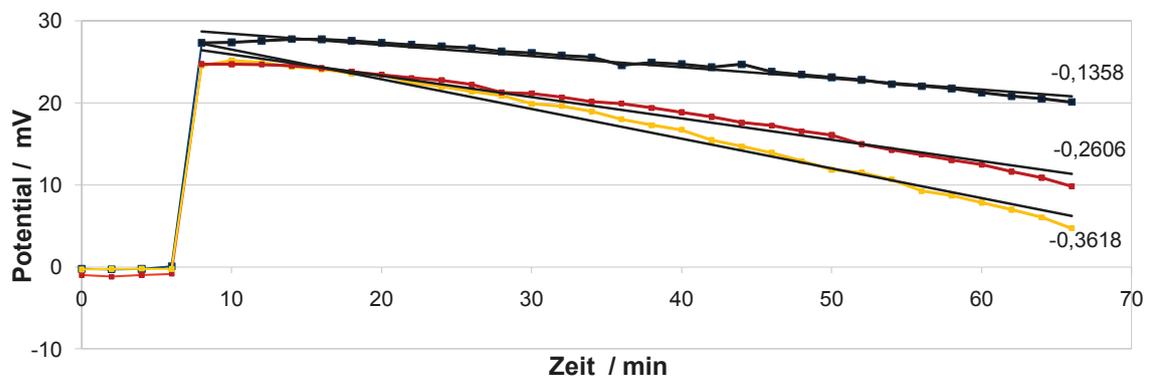


Abbildung 3.25: Entwicklung des detektierten Potentials eines LAPS, auf dem *E. coli* - Suspensionen mit verschiedenen Konzentrationen (—■— $6,0 \cdot 10^9$, —■— $1,2 \cdot 10^{10}$, —■— $2,4 \cdot 10^{10}$) *E. coli* pro mL in LB-Medium aufgegeben waren, dargestellt über die Zeit inklusive der durchschnittlichen Potentialänderungsraten.

Die Verläufe der Potentiale zeigen zu Beginn ein stabiles Signal. Das Potential ändert sich durch die Zugabe von *E. coli* auf 25 - 27 mV. Über die Zeit weisen alle drei Zugaben einen Potentialabfall auf, der stärker ausgeprägt ist, je mehr Zellen sich in Lösung befinden. Die Potentialänderungsraten sind scheinbar in kleinen Zellzahlbereichen linear von der Anfangszellzahl abhängig. So ist bei der Verdopplung der Zellzahl von $6,0 \cdot 10^9$ auf $1,2 \cdot 10^{10}$ Organismen im Ansatz eine Verdopplung der Potentialänderungsrate von ca. -0,13 auf -0,26 mV/min zu verzeichnen. Bei weiterer Verdopplung der Zellzahl ist diese Linearität nicht mehr vorhanden. Eine lineare Korrelation aufgrund der Zellanzahl ist somit im Allgemeinen nicht gegeben.

Die Ansäuerungsraten α liegen bei der geringsten *E. coli*-Konzentration bei $5,41 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$, bei der mittleren Konzentration mit $5,19 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ ähnlich hoch und bei einer Zellzahl von $2,4 \cdot 10^{10}$ bei $3,60 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$. Diese Werte weisen im kleineren Zellkonzentrationsbereich ähnliche Größenordnungen auf.

Test auf Reproduzierbarkeit in Differenzanordnung

Die weiteren Versuche dienten der Realisierung einer Differenzanordnung des Chips, der Immobilisierung der Organismen auf diesem sowie der Reproduzierbarkeit der Werte. Die Differenzanordnung wurde, wie in Abbildung 3.22 dargestellt, realisiert. Die Immobilisierung erfolgte in einem Acrylamidgel. Um alle anderen, nicht den Stoffwechsel der Mikroorganismen betreffenden Einflüsse des Gels auszuschließen, wurde auf die Kontrollseite ebenfalls ein Acrylamidgel aufgetragen. Dies enthielt keine Organismen. Die Zellzahl von *E. coli* im Gel betrug $9,47 \cdot 10^9$. Die Reproduzierbarkeit wurde durch kurzzeitig aufeinanderfolgende Messungen nach Erneuerung des über den Gelen befindlichen Mediums untersucht und ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

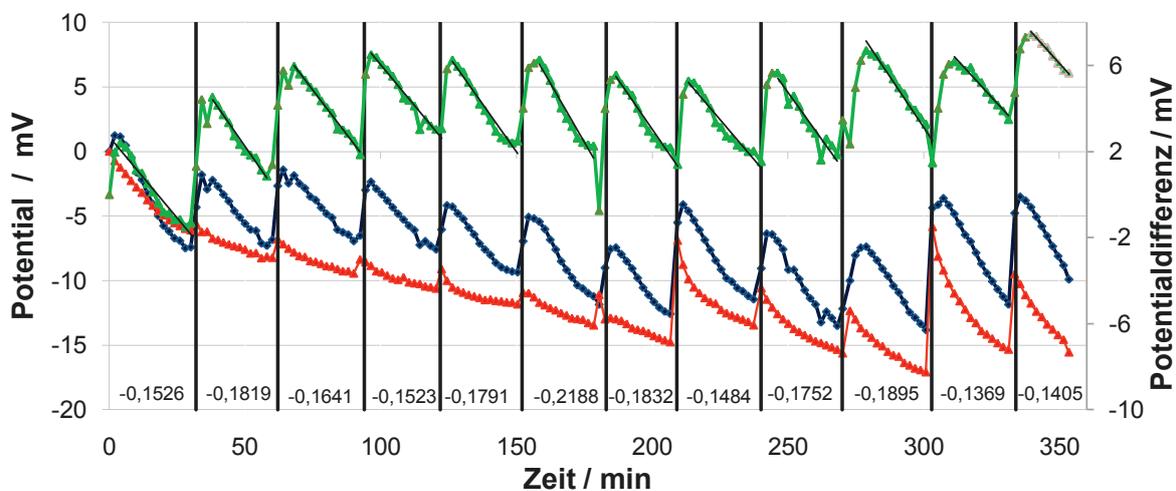


Abbildung 3.26: Darstellung der Potentialverläufe über die Zeit mit häufigem Wechsel des überschichteten Medium; —▲—: Verlauf des Kontrollgels ohne *E. coli*; —■—: Verlauf des mit *E. coli* immobilisierten Gels; —◆—: Potentialdifferenz der Gele; unten: Werte der Potentialänderungsraten.

Der regelmäßige Medienwechsel ist in der Abbildung durch schwarze senkrechte Linien dargestellt. Deutlich erkennbar ist der Einfluss des Mediums oberhalb der Gele. Nach jedem Wechsel zeigen beide Chiphälften einen Anstieg im Potential. Die Abbildung zeigt zusätzlich eine geringe Potentialdrift im Kontrollgel. Eine größere Potentialänderung und damit eine größere Ansäuerung weist das Gel mit immobilisierten *E. coli* auf. Zusätzlich ist neben der Potentialdifferenz die Differenz zwischen Kontroll- und Zellgel inklusive der Steigung der Ausgleichsgeraden, dargestellt. Sie spiegelt die Potentialänderung pro Zeiteinheit im linearen Bereich der Messung wider und weist Werte zwischen -0,14 und -0,22 mV/min auf. Die beiden letzten Medienwechsel zeigen geringere Potentialänderungsraten als zuvor. Eventuell könnte dies im Ausspülen der Organismen aus dem Gel begründet sein. Die Ansäuerungsraten lagen zwischen $1,18$ und $1,84 \cdot 10^4 \text{H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$. Im Mittel über alle Messungen entsprach das $1,42 \pm 0,20 \cdot 10^4 \text{H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$.

Tests des Einflusses einer Schutzmembran

In Abbildung 3.27 sind exemplarisch Messergebnisse weiterer Messungen dargestellt, in denen die Gele der Differenzanordnung mit einer Cellulosemembran überspannt waren. Die Zellzahl im Gel betrug $1,1 \cdot 10^{10}$ Zellen.

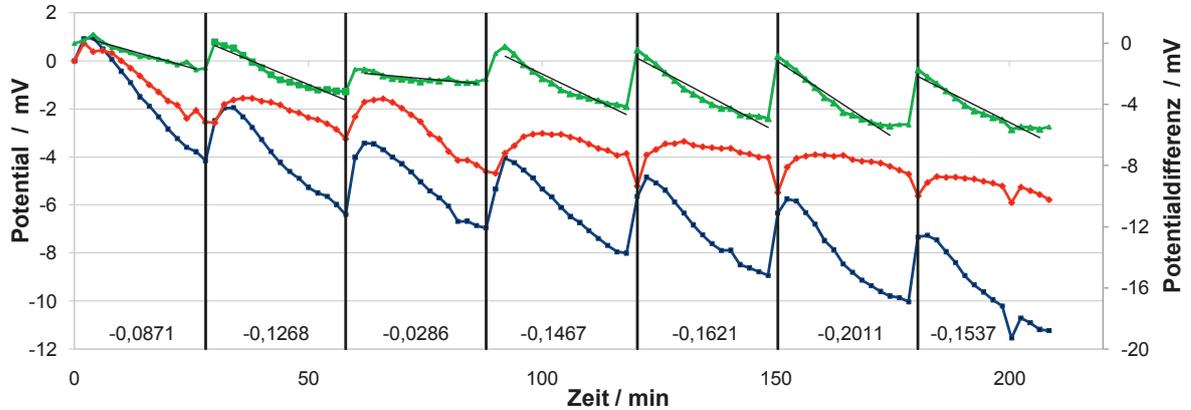


Abbildung 3.27: Aufgezeigt sind die Potentialverläufe gegen die Zeit bei einer Differenzanordnung, die zusätzlich mit einer Celluloseacetatmembran überspannt ist und regelmäßigem Wechsel des überschichteten Mediums unterliegt; **▲**: Verlauf der Kontrolle mit einem Leergel ohne *E. coli*; **■**: Verlauf der mit *E. coli* beschichteten Chiphälfte; **◆**: Potentialdifferenz der zwei Chiphälften; unten: Werte der Ansäuerungsraten.

Die Potentialänderungen zeigen auch hier, dass die Ansäuerung bei der Chiphälfte, die mit *E. coli* immobilisiert ist, stärker ausfällt als auf der Seite mit dem Kontrollgel ohne Organismen. Abgesehen von der ersten und dritten Datenreihe weisen die Steigungen der Ausgleichsgeraden geringfügig geringere Werte auf als die Effekte ohne Membran. Die Ansäuerungsraten lagen im Mittel (mit Ausnahme der ersten und dritten Datenreihe) bei $1,17 \pm 0,20 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ und damit etwas geringer als bei der Messung ohne Membran.

Untersuchungen hinsichtlich einer Konzentrationsabhängigkeit von Glukose

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wurde isotonischer Phosphatpuffer mit einer Pufferkapazität von 0,2 mmol/L als Medium genutzt. Im Versuchsverlauf wurde, wie in Abbildung 3.27 dargestellt, zeitweise Glukose in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die Potentialänderung gemessen. Die Zellzahl im Gel betrug $5,3 \cdot 10^9$.

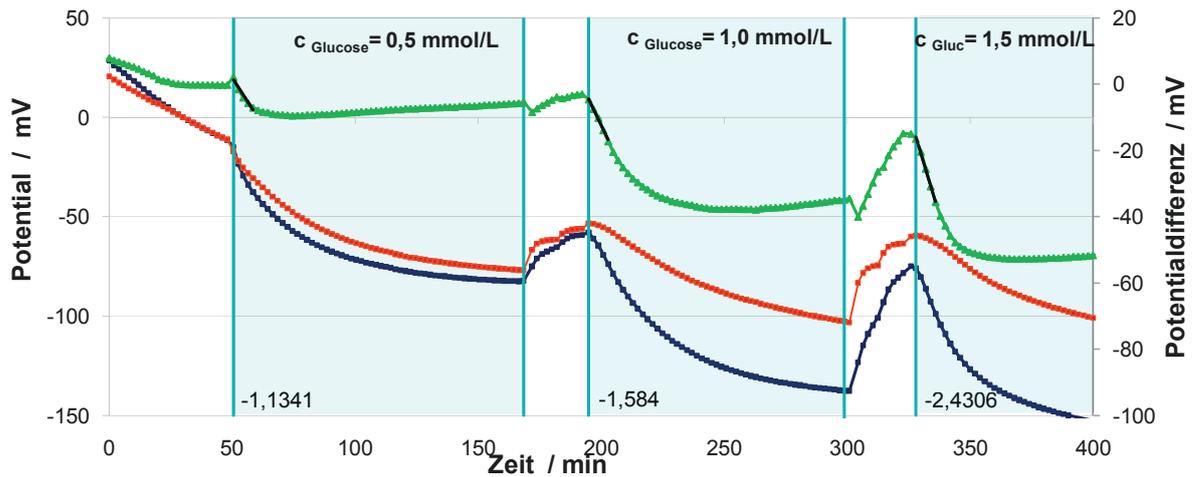


Abbildung 3.28: Aufzeichnung der Potentialentwicklung des Kontrollgels ohne *E. coli* (—), des Gels mit immobilisierten *E. coli* (—) und das Differenzsignal (—) über die Zeit in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen im überstehenden Medium; unten: durchschnittliche Potentialänderungsraten pro Zeit im linearen Bereich unmittelbar nach Glukosezugabe.

Zu Beginn des Versuchs waren die Potentialverläufe beider Chiphälften sehr ähnlich. Nach der Zugabe von Glukose bis auf eine Endkonzentration von 0,5 mmol/L zeigt die Sensorhälfte mit *E. coli* eine leicht stärkere Potentialänderung. Der Wechsel zu Puffer ohne Glukose bewirkte auf beiden Sensorseiten einen Anstieg des Potentials. Der Zugabe von 1 mmol/L Glukose folgt eine sehr viel stärkere Potentialänderung auf der Seite von *E. coli*, bevor durch den Wechsel zum Puffer die Signale wieder ansteigen. Die Zugabe von 1,5 mmol/L Glukose weist die gleiche Tendenz auf wie bei der Zugabe von 1 mmol/L. Der Potentialunterschied mit *E. coli* liegt höher als der der Kontrollseite.

Die Potentialdifferenz ist zu Beginn Null. Die Zugabe von 0,5 mmol/L Glukose zeigt im Maximum eine Differenz von 10 mV, die Differenz bei 1 mmol/L Glukose beträgt 30 mV und bei 1,5 mmol/L Glukose knapp 40 mV. Die maximale Differenz ist bei allen drei Konzentration nach 20 min erreicht, so dass in diesem Bereich die Bestimmung der Potentialänderungsrate erfolgte. Diese Änderungen sind umso größer je höher die Konzentration an Glukose ist. Die Ansäuerungsraten liegen mit 0,47, 0,55 und $1,02 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ weit unter den Werten der Messungen im LB-Medium (Werner et al., 2012).

3.3.4 Messungen mit *Methanosaeta concilii*

Nachdem die Messungen im aeroben Milieu mit *E. coli* erfolgversprechend waren, wurde *M. concilii* auf dem Chip immobilisiert. Dies erfolgte zu Beginn mit einem Chip ohne Differenzanordnung, um eine größere Anzahl von Organismen auf den Chip aufbringen zu können. Hierbei betrug das Gelvolumen statt $2 \times 37 \mu\text{L}$ nun $240 \mu\text{L}$. In Abbildung 3.29 sind die Temperatur und die Potentiale, die von $4,79 \cdot 10^{11}$ Zellen erzeugt wurden, dargestellt.

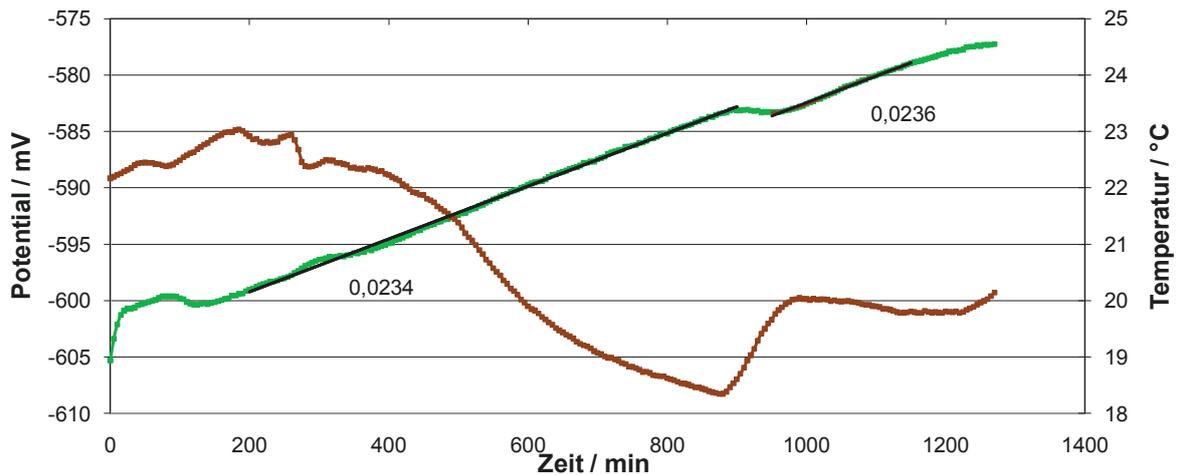


Abbildung 3.29: Darstellung des Potentialverlaufes über die Zeit von *M. concilii* im anaeroben Milieu mit überschichtetem Acetatmedium (—■—), der aufgezeichneten Umgebungstemperatur (—■—) und der Potentialänderungsraten in den linearen Bereichen.

Der Potentialverlauf weist zu Beginn einen starken Anstieg auf und verläuft dann für ca. 150 min fast ohne Veränderung. Im Weiteren steigt das Potential über die Zeit von Minute 200 bis 900 konstant an. Gegenläufig sinkt im gleichen Zeitraum die Temperatur von 23 auf knapp 18 °C ab. Bei einem erneuten Temperaturanstieg auf 20 °C flacht der Potentialverlauf ab und steigt wieder, während die Temperatur geringfügig sinkt. Die Potentialänderung weist dort eine ähnliche Steigung (0,236 mV/min) auf, wie zuvor mit 0,0234 mV/min. Die Alkalisierungsraten betragen in diesem Medium mit einer Pufferkapazität von 8,2 mmol/L $0,12 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$.

4 Diskussion

Die Idee des Projektes war die Erlangung eines besseren Prozessverständnisses für die Biogasbildung, um mit diesem Wissen eine zeitnahe Überwachungsmethode für den Biogasbildungsprozess entwickeln zu können (vgl. Abbildung 1.8, S. 16). Dazu erfolgte die Analyse der prozesstragenden Organismen aus dem güllebasierten Laborfermenter. Daraufhin wurden die natürlichen Schwankungen der Mikroorganismenabundanz im kontinuierlichen Prozess, in Industrieanlagen und bei gezielten Prozessstörungen untersucht und erste Tests zur Erfassung der metabolischen Aktivität gezielter Organismen vorgenommen. Die Methodenauswahl zur Generierung der Basisdaten der mikrobiellen Zusammensetzung ist mannigfaltig und beinhaltet viele Fehlermöglichkeiten, so dass im Folgenden zuerst die methodischen Aspekte diskutiert werden.

4.1 Methodische Aspekte

Repräsentative Probenahme

Die Probenahme ist die Entnahme von Teilmengen aus einer Grundgesamtheit, um Informationen über deren Zusammensetzung zu erhalten. Sie ist die erste Fehlerquelle bei allen Analysen, speziell auch bei der Beurteilung der Prozessbiologie in Biogasanlagen. Eine Stichprobe muss für die Grundgesamtheit repräsentativ sein. Die Richtigkeit und Zuverlässigkeit von Analysedaten hängt im höchsten Maße von einer fachgerechten Probenahme und Lagerung ab (Hein & Kunze, 1994). Ergänzend zu einer durchdachten Probenahme sind die Zeit zwischen Probenahme und Analyse sowie die Geschwindigkeit der Analytik entscheidend, um den Zustand der Biologie abzubilden (Gaul, 2011).

Zur Sicherstellung von repräsentativen Proben wurden die in dieser Arbeit dargestellten Analysen immer aus dem Hauptfermenter der Laboranlage, unmittelbar bevor dieser gefüttert wurde, gezogen. Das Gesamtprobenvolumen betrug 1 L. Die eigentliche Probe von ca. 10 mL wurde während des Abpumpens, nachdem ca. 50 % des Gesamtprobevolumen entnommen waren, abgefüllt. Die Homogenität kann wegen der kontinuierlichen Durchmischung im Fermenter angenommen werden. Der Großteil der Probe wurde im Anschluss direkt weiterverarbeitet. Ein kleinerer Teil diente als Rückstellprobe und wurde bei 4 °C gelagert.

DNA-Isolation

Die Möglichkeiten, DNA zu isolieren sind vielfältig. Die klassischen Methoden erfolgen über mechanisches und chemisches Aufbrechen der Zellen. Bei einem guten Aufschluss erhält man so jedoch häufig DNA niederer Qualität, da durch die physikalischen Kräfte auch die DNA zerschlagen wird und kurze DNA-Fragmente entstehen. Alternativen werden über

Salzfällung oder organische Extraktion ermöglicht. Das Verfahren der DNA-Isolierung sollte dem Ausgangsprodukt und den Verarbeitungsgrad der Probe angepasst werden (Wilson, 1997). Heutzutage sind, basierend auf den klassischen Methoden, viele Isolationsmethoden über spezifische Kitsysteme beschrieben (Grieß et al., 2002).

Schwierigkeiten zeigen sich bei der zeitgleichen Isolierung der bakteriellen und Archaeen-DNA aus einer Probe und der komplexen Probenmatrix. Proben aus Biogasreaktoren enthalten meist hohe Mengen an phenolischen Substanzen, Huminsäuren und Schwermetallen (Wilson, 1997). Die Träger der zu isolierenden DNA weisen zudem unterschiedliche Beschaffenheit bezüglich der Zellwand auf. Grampositive Bakterien sind aufgrund ihrer mehrlagigen (bis zu 40) Mureinschichten, bestehend aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, schwerer zu isolieren als gramnegative, die nur wenige (bis zu fünf) Schichten aufweisen. Archaeen besitzen eine Pseudomureinschicht aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylglucosaminuronsäure. Die beste Lyseeffizienz für methanogene Archaeen aus Biogasanlagen ist laut Bergmann und Mitarbeitern durch den kombinierten Einsatz von Lysozym und SDS möglich (Bergmann et al., 2010).

Zur Isolierung der DNA wurde das innuPREP Stool Kit der Firma Analytik Jena genutzt. Es ist speziell für die Extraktion bakterieller genomischer DNA aus humanen oder tierischen Stuhlproben oder anderen Probenotypen mit hohen Konzentrationen von PCR-Inhibitoren konzipiert worden (Analytik Jena, 2011). Die Methodik beruht auf einer Kombination der Enzyme Lysozym und Proteinase K: Lysozym, einem in Hühnereiweiß oder in Tränenflüssigkeit vorkommendem Enzym, welches glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG) im Murein-Sacculus der Bakterienzellwand spaltet und die Spaltung von Peptidbindungen, bestehend aus aromatischen, aliphatischen oder hydrophoben Aminosäuren, durch Proteinase K. Die DNA sowohl von gramnegativen und grampositiven Organismen als auch die von Archaeen kann mithilfe dieser Methode isoliert werden.

Im Idealfall sollen laut Hersteller 200 – 400 ng Ausgangsmaterial, ausgehend von humanem Kot mit durchschnittlich 10^{11} DMCC (direct microscopy clump count) Organismen pro Gramm Trockensubstanz, eingesetzt werden (Analytik Jena, 2008; Finegold et al., 1974; Holdeman et al., 1976). Nach Tests wurden 400 µL Probe eingesetzt, zur besseren Bearbeitung jedoch 1:4 mit Wasser verdünnt.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Nach der DNA-Isolierung sollte die Ausbeute an genomischer DNA bestimmt werden. Zumeist erfolgt dies photometrisch. Alternativ kann eine Abschätzung durch Gelelektrophorese erfolgen. Die Ausbeute ist abhängig von der Ausgangsmenge, der Art des Probenmaterials und der Isolierungsmethode (Grieß et al., 2002).

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte direkt nach der DNA-Isolation photometrisch mit dem UV/VIS Spektralphotometer „Nanodrop“. Dieses Gerät ermöglicht die Konzentrationsbestimmung ohne Küvetten in geringen Volumina (1 μL) ohne vorherige Verdünnung. Zudem bietet das Gerät einen großen Messbereich von 2 – 3700 $\text{ng}/\mu\text{L}$, so dass alle zu erwartenden Konzentrationen erfasst werden konnten. Nach Bergmann et al. (2010) werden durchschnittliche Ausbeuten von 7 bis 42 $\text{ng}/\mu\text{L}$ nach einer Isolation aus Biogasanlagen erwartet. Dies entspricht auch der Größenordnung der hier untersuchten Proben. Diese DNA-Isolate hatten meistens Konzentrationen im Bereich von 10 – 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, bei Plasmidisolierungen aus Reinkulturen wurden 50 – 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ gemessen.

4.1.1 Datenbankerstellung

Die Erfassung einer unbekanntes Mikroflora kann über die Erstellung von 16S rDNA Datenbanken erfolgen, indem die verschiedenen Gensequenzen getrennt und analysiert werden.

Allgemeine PCR und Separierung der DNA-Fragmente

Zur Anreicherung der DNA wurden gezielt konservierte Bereiche der DNA vervielfältigt. Dazu wurden in der Literatur beschriebene allgemeine Primerpaare, einmal für Bakterien und einmal für Archaeen, genutzt. Obwohl diese als allgemeingültig beschrieben sind, kann nicht jeder Organismus mit gleicher Effizienz erfasst werden.

Bei der anschließenden Ligation, die zur späteren Auftrennung der verschiedenen DNA-Fragmente dient, können in den Vektor Fragmente mit bis zu 10 kb ligiert werden (Thermo Scientific, 2012). Die Fragmente, die zuvor in der PCR erzeugt worden waren, wiesen Größen zwischen 600 und 1500 bp auf. Die Transformation erfolgte in zuvor getesteten, ausreichend kompetenten *E. coli*, so dass genug Ausbeute zu erwarten war.

Die entstandenen Klone mussten aufgrund der zu erwartenden Vielfalt der Organismen in großer Menge analysiert werden, um aussagekräftige Resultate zu erhalten. Jeder Klon enthält nur eine Gensequenz, und somit kann nur anhand der statistischen Häufigkeit auf die Relevanz im Prozess zurückgeschlossen werden (Rivière et al., 2009).

Auswertung der Daten

Die Erstellung der Datenbanken der Domänen Bakterien und Archaeen erfolgte über die phylogenetische Taxonomie. Als Fragmente dienten zuvor aus dem Fermenter isolierte und sequenzierte DNA-Abschnitte, die über die *neighbour-joining* Methode klassifiziert wurden. Oft ist die Auswertung schwierig, da nicht alle Sequenzen zugeordnet werden können und dann als „unklassifiziert“ vom Programm betitelt werden (Saitou & Nei, 1987). Häufig sind Organismen nicht kultivierbar, viele sind noch nicht beschrieben. Je weniger über die

Sequenz und den Organismus bekannt ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, diesen bis zur Spezies eingruppiert zu können. In dieser Arbeit wurden die Sequenzen so weit wie möglich spezifiziert, bei der Domäne der *Archaea* war dies oft nicht sehr spezifisch möglich.

Die Ergebnisse (siehe Tabelle 3.1 und 3.2, S. 38) zeigen, wie aufgrund der Vielfalt der Substratnhaltsstoffe zu erwarten war, eine hohe Diversität bei den Bakterien. Wesentlich geringer war die Vielfalt bei den Archaeen, da diese, egal welches Substrat der Anlage zugeführt wird, immer die Intermediärprodukte CO₂, H₂ und Acetat nutzen. Das erklärt, warum die Zuordnung der Bakterien zu spezifischen Gruppen mit knapp 15 % vergleichsweise gering war, bei den Archaeen hingegen aber 89 % erreichte.

4.1.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dient dem optischen Nachweis zuvor definierter Organismen. Eine Quantifizierung ist nur bedingt möglich, da unter dem Mikroskop nur einzelne Ausschnitte der präparierten Probe betrachtet und ausgewertet werden können (Fall, 2002). Neben der Probenahme ist der persönliche Fehler des Auswerters die größte Schwäche der Methode (Moter & Göbel, 2000; Poppert et al., 2005).

4.1.3 *Real time* PCR

Methodenentwicklung

Die Leistungsmerkmale einer Methode beziehen die Genauigkeit, die Zweckmäßigkeit, die Nachweisgrenze, die Präzision und die Selektivität ein. Daher erfolgte die Probenahme und Methodenerstellung nach den Regeln der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b des GenTG. Diese beschreiben Mindestanforderungen, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen. Zur Eignung der Methode und zur Sicherstellung der Ergebnisse wurden statistische Kenngrößen (hier Mittelwert und Korrelationskoeffizient) genutzt, die auch eine Validierung umfassen (Gentechnik Gesetz, 2010).

Entwickelte Primer

Die Primer, die bei der Erstellung der Datenbanken genutzt wurden, waren in der Literatur beschriebene, allgemeine Primer für die jeweilige Domäne.

Der spezifische Nachweis und die Quantifizierung erfolgten demgegenüber mit eigens designten Primern, bestehend aus 19 bis 23 Basen. Primer sollten Längen zwischen 18 und 24 Basen aufweisen (Dieffenbach et al., 1993). Adb-Elsalam et al. (2003) beschreiben sogar Primer mit Längen bis 30 Basen. Je kürzer der Primer ist, desto unspezifischer, aber umso effizienter ist er. Die Anzahl der Basen bestimmt die Schmelztemperatur (T_M) der Primer. Die *annealing*-Temperatur der Primer, die

durchschnittlich ca. 5 °C unterhalb des Schmelzpunktes liegt, beschreibt die Temperatur, bei der 50 % der DNA als Doppelstrang vorliegen (Mackay, 2004). Die theoretischen Schmelztemperaturen betragen 62 – 64 °C (vgl. Tabelle 3.3, S. 39) und liegen somit, wie von Abd-Elsalam und Mitarbeitern (2003) gefordert, unterhalb von 65 °C. Ergänzend sollten Primerpaare annähernd gleiche Werte aufweisen, was mit den hier designten Primern realisiert wurde. Zusätzlich zur theoretisch berechneten Schmelztemperatur wurden für jedes Primerpaar, wie von Bangsow und Mitarbeitern (2007) empfohlen, immer zusätzlich in einem Versuch die optimale Schmelztemperatur bestimmt, da sie die Ausbeute bzw. die Effizienz des PCR-Ansatzes beeinflusst (Rychlik et al., 1990).

Der GC-Anteil der spezifischen Primer lag, wie von Abd-Elsalam et al. (2003) empfohlen, zwischen 45 und 60 %. Ausnahmen waren lediglich der forward-Primer von „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ mit 39 % und der reverse Primer *Bacteroidetes* mit 63 %. Die Vermeidung von Reihen von vier aufeinanderfolgenden G- und C-Basen und die Vermeidung von drei- oder mehrfachen Wiederholungen von G, C oder T am 3'-Ende konnten aufgrund der geringen Fragmentlänge, bedingt durch die zuvor bei der Datenbankerstellung genutzten Primer, nicht immer berücksichtigt werden. Dies kann jedoch zu Mehrfachbindungen, also unspezifischen Bindungen führen (Abd-Elsalam et al., 2003). Für die Spezifität der Primer wurde auf hohe spezifische Komplementarität am 3'-Ende geachtet (Dieffenbach et al., 1993). Ergänzend wurde beim Design Wert darauf gelegt, dass keine komplementären Sequenzen im Primer selbst enthalten waren, da diese zur Anlagerung der Primer untereinander führen könnte (Abd-Elsalam et al., 2003). Fronhoffs et al. (2002) zitieren Untersuchungen, in denen Amplifikate mit 200 – 400 Basen über *real time* PCR detektiert wurden. Nach Fleige & Pfaffel (2006) können Produkte mit bis zu 950 Basen genutzt werden. Die Amplifikatgrößen, erzeugt durch die selbst designten Primer, lagen zwischen 425 und 578 bp, mit Ausnahme von *Bacteroides*, dessen Größe nur 288 bp betrug.

Nach dem Design der Primer wurden diese auf Monoklonalität getestet. Nach Zimmermann (2005) ist es schwierig, eine umfassende Absicherung der Spezifität zu erreichen, da nicht alle eventuell mit einem Primer hybridisierenden Organismen oder DNA-Abschnitte überprüft werden können. Um eine möglichst hohe Absicherung zu erzielen, wurden sie mit zwei Methoden getestet: Im ersten Ansatz wurde je ein PCR-Produkt jedes spezifischen Plasmids mit einem DNA-Isolat aus einer Biogasanlage nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel verglichen. Die Produkte zeigten jeweils nur eine Bande, also ein Produkt mit der erwarteten Fragmentlänge auf. Anschließend wurde das theoretische enzymatische Verdauemuster auf Basis der Sequenzierungsergebnisse mit den realen Verdauemustern der PCR-Produkte des Plasmids und mit dem des Isolats verglichen. Alle zugehörigen Schnittmuster waren bei allen getesteten Primerpaaren

identisch. In den Isolatproben zeigten sich keine weiteren Fragmente, so dass eine Spezifität für das jeweilige Zielfragment angenommen werden kann.

Verwendete Chemikalien

Die *real time* PCR wurde hinsichtlich der Chemikalienkonzentrationen sowie der Geräteparameter (Zeiten und Temperaturen) optimiert. Als Mastermix, bestehend aus Farbstoff, Taq-Polymerase, dNTP's und Magnesiumchloridlösung, wurde der von Bio-Rad für den Cycler empfohlene Mastermix eingesetzt. Die optimalen Konzentrationen der Primer sind von Lorkowski (2006) mit 50 bis 500 nmol/L, nach Bio-Rad Laboratories (2002) für dieses Kit mit 100 bis 500 nmol/L beschrieben. Die Primerkonzentration wurde zwischen 160 und 1600 nmol/L getestet und das Optimum bei 400 nmol/L festgestellt. Die DNA-Menge zu Beginn darf laut Hersteller zwischen 5 pg und 50 ng pro Ansatz betragen.

Fluoreszenzsignal

Für gesicherte Fluoreszenzdaten empfiehlt Bio-Rad die vorherige Kalibrierung. Diese kann dynamisch intern oder extern erfolgen, wobei die externe Kalibrierung als bewährte und geeignete Methode bei der Nutzung von Kitsystemen beschrieben ist (Bio-Rad Laboratories, 2002). Um die Daten in dieser Arbeit abzusichern, wurde vor jeder Analyse mit einer Well Factor Plate (Gefäße mit definierter Fluoreszenz) kalibriert.

Nachweisgrenzen

Für die Nachweisbestimmung wurden Plasmidverdünnungsreihen genutzt. Eine Menge von $1 \cdot 10^4$ Anfangsmolekülen pro Ansatz lag bei allen Primerpaaren im linearen Bereich. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Nachweisgrenze für die beschriebenen Primer darunter liegt und somit unterhalb der für diese Untersuchungen relevanten Mengen an Ausgangsmaterial.

Die obere Nachweisgrenze zeigt sich in dem Punkt der Amplifikationskurven, oberhalb dessen kein oder nur ein sehr geringer Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen ist. Darüberhinaus folgt häufig eine Abnahme der Fluoreszenz. Diese Grenze, die ebenfalls mit Hilfe der Standards getestet wurde, lag bei diesen Untersuchungen bei mehr als $5 \cdot 10^8$ Molekülen pro Ansatz.

Standards

Beim Ansetzen der Standards wurde von allen benötigten Lösungen mindestens ein Volumen von 4 μ L pipettiert. Dies diente der Minimierung der Pipettierfehler und deckt sich mit der Methode von Fronhoffs und Mitarbeiter (2002). Ergänzend dazu wurden Mehrfachbestimmungen (dreifach) durchgeführt, um repräsentative Basisdaten zu erhalten.

Die graphische Darstellung erfolgt, indem die logarithmierte Standardkonzentration gegen den C_T -Wert aufgetragen wird. Systembedingt wird zur Auswertung eine lineare Funktion zugrunde gelegt. Die Korrelationskoeffizienten sollten dabei über 99 % liegen (Larionov et al., 2005). Die ermittelten Standardgeraden wiesen Korrelationskoeffizienten zwischen 99,08 und 99,73 % auf.

Effizienz

Laut Bustin sollte eine gut optimierte *real time* PCR eine Effizienz von nahezu 100 % erreichen (Bustin, 2005). Standard und Proben sollten dabei die gleiche Effizienz aufweisen (Fronhoffs et al., 2002), wobei von einem Einsatz von Standards (Plasmiden) mit identischer Zielsequenz ausgegangen wird. Die Effizienz musste für jeden Primer und Standard getestet werden und kann aus der Steigung der Standardgeraden berechnet werden (vgl. Formel 3.4, S. 46) (Larionov et al., 2005). Die Effizienzwerte der hier verwendeten Standards bewegen sich zwischen 88 und 101 %. Pfaffl et al. (2002) beschrieben, dass bei PCR-Effizienz von nahezu 100 % von einer hohen Sensitivität und einer exakten Reproduzierbarkeit auszugehen ist. Außerhalb dieses Bereiches lag die Effizienz des Standards für *Bacteroidetes*, dessen Primerauswahl ebenfalls nicht optimal war. Dieser unterschreitet mit 68 % den Idealwert erheblich. Eventuell kann dies durch die Fragmentlänge von 547 bp begründet sein, die nach Fronhoff (2002) eigentlich für *rt* PCR als zu lang beschrieben ist. Jedoch weisen nur minimal kürzere Fragmente der *Crenarchaeota* mit 563 bp eine Effizienz von 88 % auf. Dies entspricht der These von Fleige & Pfaffl (2006), die eine hohe Effizienz auch bei Fragmenten bis zu 900 bp postulieren. Da die Plasmidkonzentrationen ein breites Spektrum von sechs Potenzen je Plasmid aufweisen und diese Konzentrationen zudem analog zu den anderen Standards liegen (interpolierte Werte), sind Fehler dahingehend auszuschließen. Somit wurden die Proben bezüglich *Bacteroidetes* unter Vorbehalt betrachtet, wobei die Effizienz, die bei allen Proben gleich ist. Beim Vergleich innerhalb der Gruppe sollte dies keine Auswirkung haben, jedoch ist ein zahlenmäßiger Vergleich mit anderen Organismen eventuell kritisch (Pfaffl et al., 2002).

Schmelzkurve

Bei der Nutzung der oben beschriebenen Methode wurde zur Kontrolle jedes Mal eine Schmelzkurve im Anschluss durchgeführt. Mit dem Vergleich der entstandenen Amplifikate mit dem Standard hinsichtlich der Schmelztemperatur konnte sichergestellt werden, dass die Zielsequenzen vorlagen und ausgewertet wurden (Ririe et al., 1997).

Reproduzierbarkeit

Für eine möglichst gute Reproduzierbarkeit wurden, soweit wie möglich, alle Ansätze mit Mehrfachbestimmung und durch Ansatz vom „Mastermix“ durchgeführt. Jede Probe wurde zweifach gemessen, um die Reproduzierbarkeit dieses Systems zu kontrollieren und die Werte abzusichern. Die Standardabweichungen lagen bei durchschnittlich $\pm 0,2$, bezogen auf den C_t -Wert.

4.1.4 Methodenvergleich

Vergleich Datenbank mit *rt* PCR

In der direkten Gegenüberstellung der prozentualen Verteilung der identifizierten Klone der Datenbank gegen die Kopienanzahl (vgl. Abbildung 3.8, S. 48) zeigen die Ergebnisse der Bakterien, abgesehen von „*Candidatus Cloacamonas sp.*“, im Gegensatz zu den Archaeen, eine gute Korrelation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Auswahl der allgemeinen Primer ausschlaggebend für die Richtigkeit der erzeugten Datenbanken ist. Der ausgewählte allgemeine Archaeenprimer beeinflusst die Datenbankergebnisse erheblich, da einige Arten, wie beispielsweise *M. concilii*, diese Primersequenz nicht aufweisen. Somit ist es möglich dass Organismen in der Datenbank fehlen, obwohl sie in der Probe vorliegen.

Vergleich *rt* PCR mit FISH

Der Vergleich der Ergebnisse der optischen Methode FISH und der quantifizierenden Methode *rt* PCR sowohl für Bakterien als auch für Archaeen zeigt Unterschiede trotz Verwendung identischer Primer bzw. Sondensequenzen (vgl. Abbildung 3.8, S. 48). Lediglich bei „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ sind die Daten aus beiden Methoden vergleichbar. Das ist einerseits nicht verwunderlich, da mit FISH nur qualitativ und nicht quantitativ verlässliche Werte erzielt werden können (Fall, 2002). Andererseits bestand die Hoffnung, dass die Intensität der Fluoreszenz zumindest in erster Näherung eine gewisse Genauigkeit hinsichtlich der quantitativen Abschätzung erlaubt. Die Ergebnisse untermauern dies jedoch nicht. Allerdings wird bei Betrachtung der Bilder der Methode FISH sehr gut deutlich, in welcher räumlichen Nähe zueinander die verschiedenen detektierten Organismen im Biogasprozess agieren, eine Information, die sich aus der *rt* PCR nicht ableiten lässt (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3, S. 42 und 43). Die offensichtlich syntrophe Beziehung der verschiedenen Organismengruppen zueinander erklärt, warum der prozessbedingt ohne Zweifel freiwerdende Wasserstoff nicht analytisch nachweisbar ist: er wird nach Freisetzung durch Bakterien beispielsweise von Euryarchaeota sofort aufgenommen und verstoffwechselt.

4.2 Analyse der Mikroorganismen

4.2.1 Identifizierte Organismen

Um den komplexen mikrobiologischen Abbau von Organik bis zum Biogas zu untersuchen, wurden Datenbanken von Bakterien und Archaeen anhand einer Probe der Laborbiogasanlage erstellt. Dies erfolgte anhand der taxonomischen Einordnung der DNA-Sequenzen, soweit dies anhand des bisherigen Standes der Wissenschaft möglich war, in Phylum/Stamm, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung oder Spezies/Art.

Die Domäne der Bakterien zeigt große Varianz in der Laboranlage auf, so dass nur 15 % von 1266 untersuchten Klonen in Gruppen zusammengefasst werden konnten. Die fünf dominanten Gruppen sind *Bacteroidetes*, *Bacteroides*, *Mollicutes*, *Firmicutes sp.* und „*Candidatus Cloacamonas sp.*“. Diese Vielfalt war aufgrund der Diversität der Substrate und der damit einhergehenden Stoffwechselvielfalt zu erwarten.

Die Daten der Domäne *Archaea* ergaben drei dominante Gruppen, die bezüglich ihrer Varianz nicht so vielfältig wie die Bakterien sind. Fast 89 % aller Klone konnten in dieser Domäne den Gruppen Crenarchaeota, Euryarchaeota oder Methanomicrobiales zugeordnet werden. Diese, im Vergleich zu den Bakterien, wesentlich geringere Diversität entspricht der zuvor getroffenen Vermutung. Die Substrate der Archaeen sind Acetat, CO₂ und H₂, ungeachtet der Herkunft und Art des organischen Materials, welches zuvor bakteriell zersetzt wurde. Somit ist eine große Diversität bei den methanogenen Archaeen nicht unbedingt zu erwarten.

Bacteroidetes

Bei der Erstellung der Datenbank auf Basis einer Probe der güllebasierten Laboranlage wurden fünf OTU mit 60 Klonen gefunden, die dem Phylum *Bacteroidetes* zugeordnet werden konnten. Diese Klone waren als unkultivierbare Bakterien des Phylum *Bacteroidetes* zuvor in mesophilen, anaeroben Fermentern gefunden worden sind (Narihiro & Sekiguchi, 2007). Mit 4,74 % entsprechen sie damit der zweithäufigsten Gruppe.

Das Phylum *Bacteroidetes* (vormals Phylum *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides*) umfasst gramnegative Bakterien mit den Klassen *Bacteroides*, *Flavobacteria* und *Sphingobacteria* (Ottow, 2011), welche Cellulose, Hemicellulose und Xylan, Stärke und Amylose als Substrat nutzen können. Zumeist ist das Endprodukt Propionat aus der Propionsäuregärung.

Nach Krause et al. (2008) entspricht die Gruppe *Bacteroidetes* 3,7 % der Gesamt-DNA einer Fermenterprobe, in dem Mais und Grünroggen das vorwiegende Substrat darstellen. Levén et al. (2007) hingegen beschreiben *Bacteroidetes* mit 34 % als dominanteste Bakteriengruppe in dem untersuchten mesophilen, hausmüllverwertenden Fermenter. Klocke et al. (2007) finden mit 22 % ähnliche Häufigkeiten in einer mesophilen

Maisanlage. Bacteroidetes wird neben *Firmicutes* ebenfalls von Kröber und Chouari als am meisten abundantes Phylum in Biogasanlagen beschrieben (Chouari et al., 2005; Kröber et al., 2009). Aufgrund des Stoffwechsels von Bacteroidetes, der zumeist auf Polysaccharide, die den Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden darstellen, ausgelegt ist, ist ihr Vorkommen in Biogasanlagen zu erwarten. Die Diversität und Abundanz in Biogasfermentern dieses Phylums ist laut Klocke et al. (2007) stark abhängig von der Komplexität des Substrates.

Bacteroides

Die Datenbankerstellung ergab, dass 3,87 % der untersuchten Bakterien der güllebasierten Laboranlagen der Gattung *Bacteroides* zugeordnet werden konnten.

Die Gattung *Bacteroides* des Phylum Bacteroidetes umfasst gramnegative, strikt anaerobe, unbewegliche Stäbchen, die keine Sporen bilden (Ottow, 2011). Der Stoffwechsel der fakultativen oder obligaten Anaerobier ist vielfältig. So können Monosaccharide, Aminosäuren, kurzkettige Peptide, langkettige Fettsäuren und Glycerin zu VFA, Alkohole, Kohlendioxid und Wasserstoff umgesetzt werden. Bevorzugt fermentieren sie Zucker saccharolytisch zu Acetat und Succinat als Gärprodukte (Ottow, 2011), gelten aber auch als Celluloseverwerter.

Das Vorkommen von *Bacteroides* ist in mesophilen, mit Schweinegülle betriebenen Anlagen beschrieben worden (Lui & Whiteman, 2009). Ebenfalls wurden sie in mesophilen Anlagen, betrieben mit Abwasser oder Klärschlamm, nachgewiesen (McHugh et al., 2004; Chouari et al., 2005). Die Vielfältigkeit der Stoffwechselwege ließ eine große Häufigkeit von *Bacteroides* erwarten. Zudem sind sie oft in der Darmflora vertreten, so dass das vermehrte Vorkommen in mit Fäkalien betriebenen Anlagen begründet sein kann (Lui & Whiteman, 2009). In den Fermentern finden die unbeweglichen, strikt anaeroben Organismen aufgrund der Ähnlichkeit zur Darmflora daher gute Entwicklungsbedingungen.

Firmicutes sp.

Bei der Datenbankerstellung wurden drei OTU, bestehend aus 16 Klonen, dem Phylum *Firmicutes* und der Klasse *Bacilli* mit hoher Wahrscheinlichkeit zugeordnet. Dies entspricht 1,26% der Bakterien und stellt damit die vierthäufigste Gruppe dar.

Die stoffwechselphysiologischen Eigenschaften der *Firmicutes* sind zusammenfassend ausführlich beschrieben (Ottow, 2011). Demnach handelt es sich um grampositive, meist aerob lebende Stäbchen. Sie besitzen alternativ jedoch auch die Möglichkeit zur anaeroben Atmung über dissimilatorische Nitratreduktion, Denitrifikation, Mangan- oder Eisenatmung. Viele anaerobe Arten sind saccharolytisch und hydrolysieren Zucker, Polysaccharide und Kohlenhydrate. Zusätzlich sind proteolytische Fähigkeiten

beschrieben, bei denen Eiweiße durch hydrolytische Enzyme zersetzt werden. Die Hydrolyse von Harnstoff mit Urease (konstitutiv ureologisch), zum Beispiel zur Nutzung von stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukten, können die meisten der 150 *Bacillus*-Arten vollziehen.

Analysen der 16S rDNA von Proben aus einer NaWaRo-Großanlage bzw. einer rübengefütterten Anlage weisen *Firmicutes bacilli* als dominante Organismengruppe auf (Klocke et al., 2007). Ebenfalls werden sie von Levén auch in mesophilen und thermophilen Anlagen, betrieben mit organischem Hausmüll, gefunden (Levén et al., 2007). Aufgrund des Stoffwechsels, der konstitutiv ureologisch sein kann (Ottow, 2011), erklärt sich das Vorkommen in güllebasierten Anlagen. Die Nutzung des vorhandenen Stickstoffs bringt in diesen Anlagen einen klaren Vorteil. Das Vorkommen von *Firmicutes sp.* in rübengefütterten oder NaWaRo-Anlagen könnte eventuell durch die Animpfeschlämme oder das Eintragen von Ackerboden hervorgerufen werden. Jedoch ist auch ein Einbringen über pflanzliche Substrate möglich, da *Bacillus*-Arten auch als Bodenbewohner und als Epiphyten auf Pflanzen beschrieben werden (Ottow, 2011).

Mollicutes

Mollicutes kann entsprechend der durchgeführten Untersuchungen im Rahmen der Datenbankerstellung mit einer Häufigkeit von 1,74 % zugeschrieben werden. Dies entspricht damit der dritthäufigsten Gruppe.

Die Klasse *Mollicutes* gehört in das Phylum Firmicutes (Garrity et al., 2007), obwohl sie dort aufgrund ihres Zellaufbaus (z.B. gelten sie als gramnegativ) eine Sonderstellung einnehmen. Morphologisch und mikrobiologisch werden *Mollicutes* auf Basis der 16S rRNA taxonomisch als Firmicutes klassifiziert und umfassen die sechs eubakteriellen Gattungen *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*a, *Asteroleplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* und *Ureaplasma*. Vertreter der Gattung *Anaeroplasm*a, wie sie hier nachgewiesen wurden, sind obligat anaerob und vergären Stärke zu Acetat sowie zu Ethanol und Kohlendioxid (Madigan et al., 2006).

Die Klasse der *Mollicutes* ist in Biogasanlagen nur gering abundant (Krause et al., 2008; Klocke et al., 2007). Von Levén wurden weder im mesophilen noch im thermophilen Fermentern Organismen der Klasse *Mollicutes* detektiert (Levén et al., 2007). Die geringe Abundanz kann eventuell darin begründet sein, dass es sich bei den detektierten Organismen wahrscheinlich um Organismen der Gattung *Anaeroplasm*a handelt (vgl. Abbildung 7.19, S. XXXII). Diese wurden im Pansen von Rindern und Schafen gefunden (Madigan et al., 2006), sowie aus dem Darmtrakt von Säugetieren isoliert (Robinson et al., 1975). Die in dieser Arbeit nachgewiesene geringe Abundanz beruht wahrscheinlich aus der

Betriebsweise, da die untersuchte Biogasanlage mit Rindergülle als Monosubstrat betrieben wurde.

„Candidatus *Cloacamonas sp.*“

Bei der Erstellung der Datenbank wurden vier OTU aufgefunden, die 5,61 % der Bakterienklone ausmachten. Somit war diese Gruppe die dominanteste bei den untersuchten Bakterien.

„Candidatus *Cloacamonas sp.*“, phylogenetisch dem Phylum Spirochaetes zugeordnet, ist wahrscheinlich ein syntrophes Bakterium, welches seine Energie aus der Fermentation von Aminosäuren zu Zucker und H₂ gewinnt (Pelletier et al., 2008). Die strikt anaeroben, nur in Gesellschaft mit anderen Organismen wachsenden Mikroben sind schwer zu kultivieren und daher weitestgehend unerforscht.

„Candidatus *Cloacamonas sp.*“ wurde von Kröber in einer maisgefütterten Biogasanlage und von Lienen in einer anaeroben Abwasservergärung nachgewiesen (Kröber et al., 2009; Lienen et al., 2011). 10 % der Bakterien in einer abwassergeführten Anlage entsprachen diesem Klon (Pelletier et al., 2008). Bei Untersuchungen an sieben Fermentern aus Frankreich, Chile und Deutschland gab es große Unterschiede. So wurde „Candidatus *Cloacamonas sp.*“ einmal recht dominant mit 12 %, ein anderes Mal gar nicht detektiert (Rivière et al., 2009).

„Candidatus *Cloacamonas sp.*“ scheint in mesophilen Biogasfermentern häufig ideale Bedingungen vorzufinden. Da sie jedoch nur mit ihren entsprechenden syntrophen Partnern leben können, besteht die Vermutung, dass diese für das Vorkommen bzw. die Abwesenheit dieser Organismen ausschlaggebend sind. Symbiosen von Bakterien und Archaeen können über die Methode FISH (vgl. Abbildung 3.2 und 3.3, S. 42 und 43) und über parallele Verläufe bei der quantifizierenden *rt* PCR (vgl. Abbildung 3.12 und 3.13, S. 51 und 52) nachgewiesen werden.

Crenarchaeota

In den Untersuchungen bildeten die Crenarchaeota das dominanteste Phylum der Archaeen mit 58,25%. Eine genauere Spezifizierung ist aufgrund der bisherigen geringen Kenntnisse dieser Gruppe nicht möglich. Nicht-thermophile Crenarchaeota sind bis heute im Hinblick auf ihre physiologischen Eigenschaften und ihre ökologische Rolle weitgehend unerforscht (Collins et al., 2005; Schleper, 2007). Anhand der Daten konnte nur die Aussage getroffen werden, dass kein OTU dem als einzigen bisher kultivierten Organismus *Thermoprotei* entsprach.

Das Phylum der Crenarchaeota gehört zur Domäne der Archaeen. Es umfasst viele extremophile Klassen, bildet aber auch den häufigsten Stamm der Archaeen in marinen

Gebieten. Lange Zeit wurde den Crenarchaeota nur thermophile oder extrem thermophile Spezies zugeordnet (Madigan et al., 2006). Ende des 20. Jahrhundert gelang es mit der Etablierung neuer molekularbiologischer Methoden, über 16S rDNA Sequenzen aus mesophilen Bereichen wie Ozeanen, Sedimenten in Seen, landwirtschaftlichen Böden, Waldböden, Pflanzenwurzeln und Biogasanlagen, diese nachzuweisen (Schleper, 2007; Ottow, 2011).

Ähnliche Häufigkeiten wie in dieser Arbeit fanden Collins und Mitarbeiter. Demnach erzielen nicht-thermophile Crenarchaeota bis zu 50 % der Archaeen und 25 % der gesamten Mikroflora in verschiedenen Fermentern (Collins et al., 2005). In Untersuchungen in einem mesophilen Biogasreaktor, betrieben mit organischem Hausmüll, wurden Crenarchaeota mit 3% charakterisiert (Levén et al., 2007). In unterschiedlichen Untersuchungen in mit Mais betriebenen Anlagen konnten Crenarchaeota weder in einer Laboranlage und einer Pilotanlage (120 m³ Reaktorvolumen) noch in einem Anaerobfermenter mit granuliertem Schlamm als Substrat, nachgewiesen werden (Sekiguchim et al., 1998; Klocke et al., 2008).

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind, anders als erwartet war, sehr signifikant und wahrscheinlich substratbedingt. Güllebasierte Anlagen, wie diese hier untersuchte Laboranlage und die Anlagen von Zhang und Lui weisen Crenarchaeota in hoher Anzahl auf (Lui et al., 2009; Zhang et al., 2011). Die bisher beschriebenen mesophilen Crenarchaeota, die in landwirtschaftlichen Böden und Pflanzenwurzeln nachgewiesen wurden, könnten über das Futter der Tiere und deren Verdauungstrakt in die Gülle gelangen. Dafür spricht auch, dass die Anlage, die von Levén mit organischem Hausmüll betrieben wird, nur ein geringes Vorkommen aufweist.

Die große Dominanz der Crenarchaeota in güllegeführten Anlagen kann dadurch bedingt sein, dass viele Arten Biofilme bilden. Laut Collins sind viele Organismen dieses Phylum biofilmbildend in Abwasser- und Laborbiogasanlagen. Die Folge könnte ein Anreicherungseffekt sein, da sie nicht durch die Flüssigphase aus dem Fermenter ausgetrieben werden können (Collins et al., 2005).

Euryarchaeota

Organismen des Phylum Euryarchaeota bildeten nach den Crenarchaeota mit 125 Klonen und 30,34 % die zweitdominanteste Gruppe der untersuchten Archaeenklone.

Die *Euryarchaeota* sind eine Abteilung der Archaeen, die meist extremophile Eigenschaften aufweisen. Neben den Acidophilen, den Halophilen und den Hyperthermophilen gehören auch die Methanogenen in dieses Phylum, wo sie in die Klassen *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci* und *Methanopyrri* aufgeteilt werden.

In jeder mikrobiologisch untersuchten Biogasanlage werden Euryarchaeota nachgewiesen, da nur hier in diesen Stämmen alle Methanproduzenten eingruppiert sind.

Allerdings kann meist nur das Phylum (Amann et al., 1995) selten der Stamm festgestellt werden (Lui et al., 2008; Zhang et al., 2011). Da die Euryarchaeota das Phylum der methanbildenden Organismen darstellt, war die Dominanz der Organismen zu erwarten. Ausschließlich Euryarchaeota können Biogas erzeugen. Da alle untersuchten Anlagen Methan produzierten, mussten diese Organismen folglich vorhanden sein. Die Varianzen bezüglich der Arten sind wahrscheinlich abhängig von der Konzentration der Substrate und physikalischen Parametern wie dem Wasserstoffpartialdruck im Fermenter.

Methanomicrobiales

Die Ordnung Methanomicrobiales und dabei wahrscheinlich der Organismus *Methanoculleus bourgensis* ist mit 48 Klonen anhand der Daten der Genbank der güllebasierten Laboranlage als die dritthäufigste Gruppe detektiert worden.

M. bourgensis, der auch unter den Bezeichnungen *Methanogenium olentangyi* oder *Methanogenium bourgense* beschrieben wird (Asakawa & Nagaoka, 2003), gehört zum Phylum Euryarchaeota in der Ordnung der Methanomicrobiales. Die 1 - 2 µm kokkenförmigen, beweglichen Organismen können H₂, CO₂, Formiat und sekundäre Alkohole verstoffwechseln; unter anderem wird Acetat für das Wachstum obligat benötigt (Asakawa & Nagaoka, 2003).

Die Gattung *Methanoculleus* wird von Levén und Mitarbeitern, welche mit organischem Hausmüll betriebene Anlagen untersuchten, im mesophilen Reaktor mit einer Präsenz von 18 %, im thermophilen mit 10 % beschrieben (Levén et al., 2007). In Anlagen, deren Fütterung hauptsächlich aus Maissilage bestand, wird *Methanoculleus* mit 38 % als häufigste Gattung der Archaeen beschrieben (Klocke et al., 2008).

Die hohe Abundanz von *M. bourgensis* liegt wahrscheinlich an den physikalischen Prozessparametern. Diese sind mit einem neutralen pH-Wert (6,7 – 8), einem Temperaturoptimum zwischen 37 und 45° C und einer NaCl-Konzentration von ca. 0,1 M beschrieben (Asakawa & Nagaoka, 2003) und entsprechen damit denen der meisten Biogasanlagen.

Nach neueren Erkenntnissen bezüglich des Biogasbildungsprozesses war die Abundanz dieser Gruppe zu erwarten. So spekulieren Krause und Mitarbeiter (2008), dass in Biogasanlagen mit hohen Faulraumbelastungen Methan vorzugsweise aus H₂ gebildet wird. Aktuelle Untersuchungen von Schnürer, Bauer und Lebhuhn & Gronauer unterstützen diese Vermutung, genau wie die Daten der vorliegenden Arbeit (Schnürer et al., 1999; Bauer et al., 2008; Lebhuhn & Gronauer, 2009). *M. bourgensis* weist einen hydrogenotrophen Stoffwechsel auf und nutzt somit Wasserstoff als Substrat. Nur bei geringer RZB ist Acetat entsprechend Lehrbuchmeinung das bevorzugte Substrat (Bauer et al., 2008; Lebhuhn et al., 2008). Diese neue Theorie könnte darin begründet sein, dass die Detektion von Wasserstoff

aufgrund der direkten Aufnahme der in Syntrophie lebenden Organismen kaum erfasst werden kann. Daraus wurde eventuell der falsche Rückschluss gezogen, dass kaum Wasserstoff vorhanden ist und in Folge dessen diese Organismen keine tragende Rolle im Prozess darstellen. Die molekularbiologischen Methoden ermöglichen demnach neue, detailliertere Einblicke in den Abbauprozess.

4.2.2 Besonderheiten der Ergebnisse der Datenbank

Neben den beschriebenen, detektierten Organismen konnten zwei zu erwartende Organismen nicht nachgewiesen werden: vom Phylum der Firmicutes die Klasse Clostridien und aus dem Phylum Euryarchaeota *Methanosaeta concilii*. In diversen Untersuchungen bezüglich der mikrobiellen Zusammensetzung in Biogasanlagen sind diese Organismen jedoch beschrieben (Krause et al., 2008; Klocke et al., 2008; Zhang et al., 2011). Vermutungen dazu werden im Folgenden erläutert.

Clostridien

Die vielseitigen, grampositiven *Clostridien* wurden in dieser Arbeit nicht detektiert, obwohl das Vorkommen als ubiquitär beschrieben ist. Dies ist in der Vielfältigkeit der Substrate begründet. Es können Polysaccharide, Proteine, Aminosäuren etc. vergoren werden. Dadurch werden Clostridien sowohl im Pansen und in der Umwelt überall da, wo anaerobe Zersetzung stattfindet, nachgewiesen.

Nach Lynd et al. (2002) sind Clostridien besonders in NaWaRo-Anlagen besonders dominant, da die cellulolytischen Organismen den Abbau des Lignocellulose-Komplexes durchführen. Eventuell ist die Häufigkeit nicht gegeben, wenn es sich wie in diesen Untersuchungen, um eine rein güllebasierte Anlage handelt. Dohrmann und Mitarbeiter (2011), die schweine- und rindergüllebasierte Anlagen untersuchten, beschreiben, dass die Häufigkeiten der Clostridien in güllebasierten Systemen wesentlich geringer sind als in Anlagen mit cellulosehaltigen Cosubstraten. Unterstützt wird die Vermutung, dass Clostridien keine Relevanz in der Biogasbildung aus Gülle haben, durch quantitative Analysen, die eine Abnahme der Clostridien von der Gülle über die Fermentation bis zum Gärrest beschreibt (Dohrmann et al., 2011). Somit ist der fehlende Nachweis von Clostridien wahrscheinlich nicht auf einen Fehler in der Methodik zurückzuführen, sondern in der fehlenden Prozessrelevanz der Clostridien begründet.

Methanosaeta concilii

M. concilii wurde ebenfalls bei der Erstellung der Datenbank in dieser Arbeit nicht detektiert. Da dies nicht zu erwarten gewesen ist (Klocke et al., 2008), wurde das DNA-Isolat, anhand dessen die Datenbank erstellt worden ist, mit spezifischen, aus der Literatur beschriebenen

Primern für *M. concilii* überprüft, so dass der Organismus dann doch mit hoher Abundanz nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3.13, S. 52).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen sich zeigte, dass die als „allgemein“ beschriebene Archaeenprimer keine Komplementarität auf *M. concilii* aufweisen. Die Ergebnisse von Baker und Mitarbeitern (2003) zeigen die Spezifität der Primer wie folgt: Der Primer UA571F zeigt eine 100 %ige Übereinstimmung zu mehr als 100 Sequenzen der Methanomicrobiales, thermophilen Crenarchaeota und nicht-thermophilen Crenarchaeota und zu 25 bis 100 Sequenzen der *Methanococcales*, *Methanobacteriales* und *Thermococcales*. Auch der Primer UA1204R zeigt eine 100% ige Übereinstimmung zu mehr als 100 Sequenzen der Methanomicrobiales, zu 25 bis 100 Sequenzen der thermophilen Crenarchaeota, nicht-thermophilen Crenarchaeota, *Methanobacteriales* und *Thermococcales* und zu weniger als 25 Sequenzen der *Methanococcales* (Baker et al., 2003). Trotz ausführlicher Tests und hoher Übereinstimmung vieler Archaeen ist *M. concilii* durch die vorgeschaltete PCR bei der Datenbankerstellung nicht vervielfältigt und nachgewiesen worden. Das bestätigen auch die Ergebnisse von Levén und Mitarbeiter. Dort wurde ebenfalls eine Datenbank mit identischen allgemeinen Primern erstellt und in zwei Reaktoren ebenfalls keine *M. concilii* nachgewiesen (Levén et al., 2007).

Methanosaeta concilii, früher aufgrund seiner äußeren Merkmale unter der Bezeichnung *Methanothrix concilii* beschrieben, gehört zu der Klasse Methanomicrobia, der Ordnung Methanosarcinales und der Familie Methanosaetaceae (Patel & Sprott, 1990). Er zeichnet sich im Besonderen durch seinen rein acetoklastischen Stoffwechsel aus (Patel, 1984). In einer Vielzahl von Untersuchungen bezüglich der Organismen in Biogasfermentern wurde *M. concilii* bereits frühzeitig beschrieben (z.B. Leclerc et al., 2000). Sekiguchim und Mitarbeiter (1998) beschreiben *M. concilii* bereits 1998 als dominanteste Archaeae (98,5 %) in mesophilen anaeroben Reaktoren, betrieben mit granulösem Schlamm aus Abwasser. In einem Bericht von der LfL (Institut für Landtechnik und Tierhaltung), der TU München (Lehrstuhl für Rohstoff- und Energietechnologie), dem Forschungszentrum für Erneuerbare Energien und Conpower Energie GmbH wird beschrieben, dass Methanosaetaceae häufig gefunden werden, wenn die Fermenter mit langer Verweilzeit betrieben werden (Schieder et al., 2010).

Zusammenfassend spiegeln verschiedene Forschungen die hohe Abundanz von *M. concilii* wider. Dies kann darin begründet sein, dass Acetat, das häufig als das wichtigste Intermediärprodukt beschrieben wird, in allen Anlagen mit einer mittleren Konzentration von 1380 mg/L vorliegt (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2009). Nach Mladenovska und Ahring bevorzugen *Methanosaeta* Acetatkonzentrationen unter 1 mmol/L (Mladenovska & Ahring, 2000). Zudem wirken sich lange Verweilzeiten

positiv auf die Häufigkeit aus. Zumeist liegen die Verweilzeit zwischen 30 und 60 Tagen, häufig auch darüber (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 2009), was den langen Generationszeiten und dem geringen Energiegewinn durch die Spaltung von Acetat entgegenkommt. Dem gegenüber steht die Ausschwemmung, die bei hoher Verweilzeit jedoch nur geringen Einfluss hat. Somit ist die große Dominanz dieser Organismen in Großanlagen nachvollziehbar (Schieder et al., 2010).

Im Rahmen des Projektes, in dem ein organismenbasierter Sensor entwickelt werden sollte, musste aus organisatorischen Gründen vor Fertigstellung der Gendatenbanken eine Entscheidung getroffen werden, welcher Organismus auf diesem Sensor immobilisiert werden sollte. Aufgrund der häufigen Nennung von *M. concilii* wurde die Annahme getroffen, dass es sich hierbei um einen prozessrelevanten Organismus handelt. Zudem ermöglicht sein rein acetoklastischer Stoffwechsel gute Rückschlussmöglichkeiten auf die Stoffwechselaktivität, da die pH-Wert-Änderung mit dem Sensor erfasst werden kann.

4.2.3 Zeitliche Quantifizierung der dominanten Organismen in der Laboranlage

Über einen Zeitraum von mehr als 1,5 Jahren wurde die Laboranlage nasschemisch und mikrobiell analysiert. Die Organismen ließen sich hinsichtlich ihrer Spezifizierungen bezüglich Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Spezies jedoch nur in unterschiedlichem Maße klassifizieren. Um dennoch nur den in der Gendatenbank nachgewiesenen Organismus und nicht eine Familie oder Ordnung mittels FISH und *rt* PCR untersuchen zu können, wurden die Primer und Sonden spezifisch anhand des Genabschnittes der Datenbank abgeleitet. Dazu wurden die Unterschiede zu den zehn genetisch ähnlichsten Organismen besonders berücksichtigt, um nur die Art nachzuweisen, die zuvor als prozessrelevant beschriebene Spezies erkannt worden war. Daher lassen sich im Folgenden die jeweiligen Häufigkeiten anhand der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sowie der Kopienanzahlen der *rt* PCR miteinander vergleichen. Ergänzt wurden diese weiteren Untersuchungen um *M. concilii*, der in vielen Literaturquellen beschrieben ist.

Wichtig bei der Betrachtung der Daten ist, dass im September 2009 der Güllelieferant wechselte. Der Landwirt, der zuerst die Gülle seiner Rinder zur Verfügung gestellt hatte, fütterte konventionell mit Krafftutter. Zudem lagerte die Gülle in einer Güllegrube und war unter Umständen mehrere Tage alt. Der neue Bauer arbeitet nach ökologischen Gesichtspunkten und füttert hauptsächlich ohne Krafftutter. Zudem erfolgt dort keine Lagerung der Gülle. Dies hat den Vorteil, dass keine Veränderung der Gülle durch Ausgasung oder chemische Prozesse angenommen werden kann und das Rohprodukt zur Vergärung in den Laboranlagen genutzt wurde. Nötig wurde der Wechsel, da sich die chemisch/physikalischen Parameter langsam von Mai 2009 an verschlechterten, indem sich

die Gasbildungsrate, die Pufferkapazität und der pH-Wert verringerten (vgl. Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11, S. 49 und 50). Im Zeitraum Mai bis September 2009 sanken ebenfalls alle untersuchten Organismen in ihrer Häufigkeit (siehe Abbildung 3.12 und 3.13, S. 51 und 52). Vermutlich waren die Bedingungen im Fermenter nicht mehr ideal für die vorherrschende Populationsgemeinschaft.

Nach dem Wechsel stabilisierten sich zunächst die Werte, bevor ab Februar 2010 der pH-Wert und die Pufferkapazität anstiegen und das Redoxpotential und im Mittel die Gasmenge sanken. In diesem Zeitfenster (Februar bis Juni 2010) ist ein signifikanter Anstieg von *Firmicutes sp.* zu verzeichnen. Vermutlich beinhaltete die neue Gülle saccharolytische Substrate aus dem Futter der Rinder. Im Winter und Frühling musste der Landwirt Krafffutter zufüttern, das vermutlich mehr Zucker enthält als Gras und Heu. Nach dem Anstieg der gärenden *Firmicutes sp.* sank aufgrund der entstehenden Säuren der pH-Wert im Fermenter. Über den Herbst stabilisierten sich alle Werte wieder, bevor sich im Frühjahr 2011 die chemisch/physikalischen Werte analog zum Frühjahr 2010 veränderten. Auch hier sank das Redoxpotential und der pH-Wert, die Pufferkapazität stieg und die Gasmenge fiel minimal ab. Eine signifikante Änderung bei den Organismen war nicht erkennbar. Vermutlich hatte die Fütterung der Tiere einen direkten Einfluss auf den Prozess, der jedoch nur bei enger Beprobung der Anlage nachweisbar ist.

Auffällig bei den Analysen der Organismen ist jedoch, dass „Candidatus *Cloacamonas sp.*“ und Euryarchaeota die Organismen mit den größten Schwankungen waren. Zudem wiesen sie eine direkte Korrelation zueinander auf. Eventuell sind es die quantifizierten Euryarchaeota hydrogenotrophe Organismen, die in direkter Syntrophie mit „Candidatus *Cloacamonas*“ leben und das entstehende H_2 als Substrat nutzen. Diese Art von syntrophem Abbau wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Schink, 1980; Boone & Bryant, 1980; Krumholz & Bryant, 1986; Schink, 1997; Cord-Ruwisch et al., 1998).

4.2.4 Untersuchungen von Großanlagen mit unterschiedlichen Substraten

Neben Untersuchungen im Labor wurden drei industrielle Anlagen getestet. Die kontinuierlich, mesophil betriebenen Anlagen unterschieden sich hinsichtlich der Fütterung in Maismono-, Mais/Gülle- und rübenbasierte Anlage (vgl. Abbildung 3.14, S. 53). Obwohl alle untersuchten Organismen in allen Anlagen nachgewiesen werden konnten, lagen, vor allem bei den Bakterien, wie erwartet große Unterschiede vor. So scheinen die gärenden Organismen (*Firmicutes sp.* und *Mollicutes*) bei Anlagen, die mit Silagen betrieben werden, keine große Rolle zu spielen. Eventuell sind die aus dem güllebasierten System nachgewiesenen Gärer in celluloseelastigen Anlagen nicht so dominant, da die vorliegenden

Substrate anderer Natur sind. In Folge dessen könnten alternative Gärer wie beispielsweise Clostriden in diesen Anlagen häufiger vorliegen.

In den Untersuchungen konnte eine hohe Abundanz von Bacteroidetes und *Bacteroides* nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Organismen erfolgte in der Literatur ebenfalls häufig (Levén et al., 2007, Kröber et al., 2009). Auch in rübenverwertenden Anlagen wurden sie beschrieben (Klocke et al., 2007). Das vielfältige Phylum scheint in allen Anlagen prozessrelevant zu sein. Die cellulose- und stärkeverwertenden Organismen, die häufig im Darm von Warmblütern vorkommen, lassen vermuten, dass *Bacteroides* aus dem Darm über Fäkalien in die Systeme eingebracht werden. Diese Vermutung kann dadurch unterstützt werden, dass die geringsten Abundanzen in der Maismonovergärung gefunden wurden. Der Nachweis hingegen spricht eventuell für eine gute Adaption der Organismen an das Milieu im Fermenter, da in dieser Anlage über lange Zeit keine Fäkalien mehr zugegeben worden waren. Von einigen *Bacteroides*-Arten sind gute Adhärenzen beschrieben (Oyston & Handley, 1991; Eiring, 1995), die auf Anheftungen im Fermenter hindeuten können. Zudem verstoffwechseln *Bacteroides* Kohlenhydrate und Polysaccharide, so wie sie im Mais vorliegen, wodurch das Vorkommen ebenfalls begründet sein könnte. Organismen der Gruppe „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ wurden in der Regel mit einer Häufigkeit im unteren Drittel detektiert. Dies entsprach damit den Befunden der Laboranlage.

Bei den Archaeen sind alle vier Organismen, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Methanomicrobiales und *M. concilii*, häufig und dominant vorhanden. Crenarchaeota sind bei der Zuckerrübenvergärung dominant, wie es bei einem saccharolytischen Stoffwechsel zu erwarten ist. Die geringe Häufigkeit der wahrscheinlich hydrogenotrophen Euryarchaeota lässt vermuten, dass Organismen mit acetoklastischen Eigenschaften in erster Linie hier für die Methanbildung verantwortlich sind. Dafür spricht, dass *M. concilii* die Archaeengemeinschaft durchweg dominierte (vgl. Abbildung 3.14, S. 53). Zudem sind die als vermutlich hydrogenotroph einzuordnenden Euryarchaeota in nur geringen Mengen nachgewiesen worden. Interessant ist das ebenfalls gehäufte Auftreten von Methanomicrobiales, welches mit dem von *M. concilii* hoch korreliert. Die Kopienanzahlen liegen wie in den Untersuchungen der Laboranlage (vgl. Abbildung 3.13, S. 52) etwas unter denen von *M. concilii*. Vermutlich ist diese Korrelation eine Folge der Acetatkonzentration. Obwohl Methanomicrobiales kein Acetat verstoffwechseln, so wird es als Wachstumssubstrat benötigt (Asakawa & Nagaoka, 2003). Im güllebasierten Laborbetrieb, in dem die Acetatkonzentrationen immer sehr gering waren, hat sich eventuell die Symbiose von „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ und den Euryarchaeota besonders ausgeprägt, da für beide Gruppen die Symbiose essentiell und überlebensnotwendig ist.

4.3 Parallelfermenter

4.3.1 Aufbau und Bilanzierung des Prozesses

Systematische Studien stellen aufgrund der Vielfalt an Biogasfermentern eine große Schwierigkeit dar. Für vergleichbare Untersuchungen, in denen der Einfluss eines Parameters untersucht werden kann, wurde daher ein Parallelfermentersystem aus sechs identischen Fermentern aufgebaut. Über eine Pumpe wurden alle Fermenter mit identischem Substrat gefüttert. Zudem erfolgten an jedem Fermenter zeitgleich Online- und Offlineanalysen von chemisch/physikalischen und mikrobiologischen Parametern. Diese zeigen bei identischer Betriebsweise gleiche Ergebnisse. Beispielhaft ist im Anhang der Vergleich der Gaszusammensetzung und der Gasbildungsraten aller sechs Fermenter dargestellt (Abbildung 7.20, S. XXXIII), die eine Vergleichbarkeit belegen. Somit ist es möglich, einzelne Parameter zu variieren, um deren Einfluss zu testen, wenn zeitgleich ein Kontrollfermenter ohne Veränderungen weiterbetrieben wird.

Aufbau des Systems

Zur systematischen Untersuchung des Biogasbildungsprozesses erfolgte der Aufbau von sechs realitätsnah arbeitenden Miniaturfermentern in Zusammenarbeit der beiden Projektarbeitsgruppen (siehe Kapitel 1.2 Motivation und Zielsetzung, S.16). Die Ziele während der Planung waren, einerseits möglichst viele Sensoren und Elektroden in das System integrieren zu können, andererseits sollten Geometrie, Aufbau und Betriebsweisen analog denen von realen Großanlagen sein (vgl. Kapitel 3.2.1 Aufbau einer Parallelfermenteranlage, S.53).

Für die optimalen anlagenspezifischen Parameter wie die Verweilzeit (HRT) gibt es zur Zeit Orientierungswerte, jedoch müssen sowohl im Labor als auch in Großanlagen diese anlagenspezifisch ausgetestet werden. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es dafür keine allgemeingültige Beschreibung. Diese Tests erfolgten im Rahmen der Abschlussarbeiten von Jörres (2010) und Jansen (2011).

Bilanzierung des Prozesses

Um die Biogasbildung abschätzen zu können, erfolgt die Bilanzierung üblicherweise über die organische Trockensubstanz (oTS) oder die Werte des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) und Gesamtkohlenstoffs (TOC) (Weißbach, 2009). Alternativ werden auch Berechnungen nach Baserga (1998) oder Buswell & Müller (1952) durchgeführt. Dabei werden immer die theoretischen Gasausbeuten (auf Standardwerte normiert) und Methananteile berechnet. Als Basisdaten aller hier aufgeführten Berechnungen dienen die Werte des Kontrollfermenters, der bei einer Fütterung von $10 \text{ kg oTS/m}^3\cdot\text{d}$ und einem Reaktorvolumen

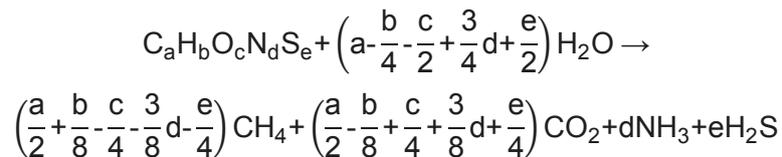
von ca. 800 mL durchschnittlich 850 mL Biogas pro 24 h mit einem Methangehalt von ca. 68% während der Versuchsphase generierte (vgl. im Anhang Abbildung 7.21, S. XXXIV).

Der Abbau der ermittelten Organik betrug durchschnittlich 1,8 g/d. Für das hier genutzte System entspricht dies rechnerisch, bezogen auf 380 L_N/kg oTS eine Gasbildungsrate von 0,684 L/d (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2009). Eine Berücksichtigung der Verdaulichkeit muss hier nicht erfolgen, da die Abbauwerte auf realen Messwerten beruhen (Weißbach, 2009).

Nach Antranikian (2006) erfolgt die Abschätzung der Gasmenge und Gasqualität anhand von CSB- und TOC-Werten. Als Faustregel gilt, dass eine Abnahme des CSB von 64 g einer Methanausbeute von 22,4 L entspricht. Über den CSB bilanziert, ergibt ein durchschnittlich gemessener Abbau von 9.300 mg/kg CSB/d (Frischgülle besitzt ca. 17.000 mg/L, der Gärrest ca. 7.700 mg/L) bei dieser Fütterung (ca. 200 mL/d) eine Methanbildungsrate von ca. 650 mL/d. Zur Ermittlung der Gesamtgasmenge wird in einem ersten Schritt die Methanmasse über die Molmasse und die Gaskonstanten errechnet. Dies entspricht in diesem Prozess 0,46 g Methan. Daraufhin kann über das Verhältnis des TOC zur Methanmasse von 0,75 g TOC zu 1 g Methan (da 12 g Kohlenstoff zu 16 g Methan umgesetzt werden) der gebundene Kohlenstoff mit 0,35 g TOC angenommen werden. Über die Differenz der realen TOC-Abnahme von 0,45 g und dem Methananteil ergibt sich eine Masse von 0,10 g TOC, der auf CO₂ entfällt. Mit der Annahme, dass 0,27 TOC/g CO₂ entstehen, hat CO₂ in diesem Prozess eine theoretische Masse von 0,38 g bzw. ein Volumen von 0,19 L. Das Gesamtgasvolumen der Hauptkomponenten Methan und CO₂ entspricht danach ca. 860 mL, wobei aufgrund des Verhältnisses ein Methananteil von 77 % zu erwarten wäre.

Die Kalkulation nach Baserga (1998) erfolgt aufgrund der Daten der Weender Futtermittelanalytik (vgl. im Anhang Tabelle 7.10, S. XXXIII). Die Analysen der Gülle diesbezüglich, ermittelt durch die LUFA NRW, ergaben 8 g Rohprotein (XP), weniger als 4 g Rohfett (XL) und weniger als 30 g Kohlenhydrate, bestehend aus Rohfasern (XF, <4 g) und N-freien Extraktstoffen (26 g), jeweils bezogen pro kg Frischmasse. Die Gasmenge und Gasqualität kann anhand dieser Werte und des Verdauungsquotienten errechnet und abgeschätzt werden.

Die genaueste Vorhersage kann über Buswell & Müller erfolgen. Diese stellten bereits 1952 die auf der Stöchiometrie basierende Gleichung zur Errechnung der theoretischen Gasausbeute auf (vgl. Formel 4.1). Diese wurde 1977 von Boyle weiterentwickelt und um Stickstoff und Schwefel ergänzt (Boyle, 1977).



Formel 4.1: Stöchiometrische Gleichung zur Berechnung der Gasausbeute von Buswell & Müller (1952), modifiziert durch Boyle (1977).

Die Bilanzierung ermittelt unter Anwendung der Summenformel $C_{10}H_{19}O_3N$, die eigentlich für Schweinegülle beschrieben ist (Reuters, 2011), die Faktoren 6,25 für Methan, 3,75 für CO_2 und 1 für NH_3 . Mit der abgebauten Menge an oTS (1,8 g/d) und der theoretischen Molmasse der Gülle von 201 g/mol errechnet sich damit eine Gasmenge von 9 mmol. Anhand des Faktors der Gleichung und der idealen Gasgleichung mit 22,4 L/mol könnten somit 1,25 L Methan, 0,75 L CO_2 und 0,20 L NH_3 entstehen. Der Methananteil entspräche danach 56,8 %. Nachteilig ist bei dieser Kalkulation, dass eine vollständige Stoffumwandlung auch nicht verdaubarer Inhaltsstoffe voraussetzt, dass die Biomasseneubildung nicht berücksichtigt wird und die genaue chemische Zusammensetzung bekannt sein muss.

Zusammenfassend sind die theoretischen Gaserträge und Methananteile der verschiedenen Methoden sowie die real gemessenen Werte in der folgenden Tabelle (Tabelle 4.1) aufgeführt.

Tabelle 4.1: Übersicht der theoretisch berechneten Gasausbeute und Methankonzentration bezogen auf einen Fermenter und 24 h.

Methode	Methankonzentration (%)	Gasausbeute (L/d)
oTS (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2009)		0,684
CSB & TOC (Weißbach, 2009)	77	0,86
Baserga (1998)	55	4,7
Buswell & Müller (1952)	57	2,2
Analysierte Werte	67	0,85

Die errechneten Werte weichen voneinander ab. Dies beruht hauptsächlich auf den zugrunde gelegten Daten der jeweiligen Berechnung. Durch die komplexe Matrix und der nur schwer abzuschätzenden Abbaubarkeit der Substrate ermöglichen alle Methoden nur eine Abschätzung. Bei den meisten Methoden wird davon ausgegangen, dass ein Abbau von 100% stattfindet, was aber nie der Realität entspricht.

Beim Vergleich mit empirisch ermittelten Literaturwerten bezüglich der Gasausbeuten aus Rindergülle liegen die Gasbildungsrate im Mittel zwischen 0,63 und 0,72 L/d (350 und 400 L/kg oTS). Die Methananteile weisen mit Werten zwischen 55 und 62 % eine hohe Spanne auf (Baserga, 1998; Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2009). Die Abweichungen könnten durch unterschiedliche Betriebsparameter (Verweilzeit, Güllelagerung etc.) oder die Zusammensetzung der Gülle bedingt sein. Zudem

werden Großanlagen durchschnittlich mit einer RZB von 3,5 kg oTS/m³*d beschickt, die Laboranlage jedoch mit 10. Daraus resultierend ist auch die Verweilzeit im Laborfermenter geringer, nämlich anstelle von ca. 30 d nur knappe 4 d. Vermutlich werden durch die kurze Verweilzeit nur schnell umsetzbare Stoffe mit hohem Anteil an Protein verstoffwechselt. Die Schwankungen der Methankonzentrationen könnten durch die unterschiedlichen Löslichkeiten der Gase bedingt sein. CO₂, NH₃ und H₂S, deren Löslichkeiten erheblich höher liegen, werden zu einem größeren Anteil mit der Flüssigphase aus dem Fermenter gespült. Die Folge ist ein höherer gemessener CH₄-Gehalt als der theoretisch bestimmte Wert (Märkl, 2006).

Die Literaturwerte ähneln den Gasmengen der hier untersuchten Fermenter. Bei den theoretisch berechneten Werten liegt die Methode über CSB & TOC den real gemessenen Werten am nächsten, gefolgt von der Methode über den oTS-Abbau. Die Methoden der Gasmengenberechnung über Buswell & Müller (1952) und Baserga (1998) weisen viel zu hohe Werte auf, da dort mit einer 100 %igen Substratumsetzung kalkuliert wird. Die Gasqualität ist zumeist niedriger als errechnet. Vermutlich kann dies auf die verkürzte Verweilzeit und einen geringen Abbaugrad komplexerer Substanzen zurückgeführt werden. So werden vermutlich durch die Gülle eingetragene FS bevorzugt verstoffwechselt, wobei gilt, je länger die FS, desto mehr verschiebt sich das Verhältnis der Gasausbeute zum Methan (Buswell & Müller, 1952).

Mikrobiologie

In Voruntersuchungen wurden die sechs Fermenter bezüglich der vorherrschenden Organismen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass alle dominanten Organismen der Laboranlage ebenfalls in der Parallelanlage auftraten. Aufgrund des gleichen Substrates (Rindergülle) sind diese Resultate zu erwarten. Ebenfalls konnte anhand dieser Werte gezeigt werden, dass bei identischem Betrieb die Häufigkeiten der untersuchten Organismen sehr ähnlich sind.

4.3.2 Einfluss von Acetatzugaben

Der Einfluss von Acetat wurde durch Zugaben von pH-neutralem Acetatsalz in den kontinuierlich betriebenen Fermenter untersucht. Die einmaligen Zugaben verursachten kurzzeitige Anstiege in der Gasqualität und -quantität (vgl. Abbildung 3.16, S. 56), die semikontinuierlichen Zugaben zeigten nach Beginn die gleiche Tendenz, gefolgt von einem starken Gasmengeneinbruch nach der dritten Zugabe. Der Anstieg der Gasmenge könnte ein Effekt der zusätzlich zugeführten leicht zugänglichen Organik sein. Die Gaspotentialkalkulation nach Buswell & Müller (1952), die über den Säureabbau unter Berücksichtigung des natürlichen Wash-out und des durch die Fütterung neu eingebrachten

Inputs berechnet werden kann, bestätigte dies nur zum Teil. Es wurden pro Tag 3,6 g Kohlenstoff zusätzlich eingetragen, was 36 % zusätzlichem Kohlenstoff entsprach. Die Gasausbeute wurde jedoch lediglich um maximal 20 % gesteigert. Der Anstieg der Gasqualität um ca. 3% zugunsten des Methans kann theoretisch nicht durch Acetat hervorgerufen worden sein, da pro Mol Acetat jeweils ein Mol Methan und ein Mol Kohlenstoffdioxid entsteht. Theoretisch hätte die Qualität aufgrund der Verschiebung der Zusammensetzung zu niedrigeren Methangehalten abnehmen müssen. Die Erhöhung des Methananteils muss wahrscheinlich durch hydrogenotrophe Organismen erfolgt sein, die das vermehrt entstandene CO₂ in einem weiteren Schritt zu CH₄ umsetzten. Die kurzzeitigen Qualitätseinbrüche direkt nach der Zugabe könnten durch ausgasendes CO₂, das sich in der Acetatlösung in Form von Carbonatpuffer befand, bedingt sein.

Die untersuchten VFA zeigen (vgl. Abbildung 3.17, S. 57), dass die nachgewiesenen Konzentrationen immer unterhalb der errechneten lagen. Begründet sein könnte dies durch das Ausspülen eines Teils des zugegebenen Acetats, was jedoch durch die maximale Entfernung zwischen Zugabeöffnung und Überlauf verhindert werden sollte. Andererseits sind ein direkter Abbau kleinerer Mengen Acetat sowie eine inhomogene Verteilung im Fermenter vorstellbar.

Die punktuellen Erhöhungen der Acetatkonzentrationen hatten immer einen kurzzeitigen Anstieg an Propionat zur Folge. Die dritte Zugabe innerhalb von sechs Tagen, bei der ein Maximum von Acetat mit ca. 300 mmol/L gemessen wurde, scheint die Toleranzgrenze des Prozesses zu überschreiten, weshalb es zu einem Einbruch der Gasqualität kam. Laut Weiland (2010) wirkt sich meist ein zu hoher Propionatanteil bzw. ein falsches Verhältnis von Acetat zu Propionat (idealerweise 2:1) negativ auf die Biogasbildung aus (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2009). Dies scheint hier der Fall zu sein, wobei nicht klar differenziert werden kann, ob die Hemmung aus der Acetat- oder aus der Propionatkonzentration resultiert. Wahrscheinlich ist, dass die Acetatzugabe den Propionatabbau hemmt und es dadurch zu einer Anreicherung dieser Säure kommt. Im Vergleich zu Daten von Ahring und Mitarbeitern, die ebenfalls Einflüsse auf die Methanbildungsraten durch die Zugabe von Acetat untersuchten, zeigen sich ähnliche Effekte (Ahring et al., 1995; Ahring, 2003). Untersuchungen von Batchansätzen zeigten bei Konzentrationen von Acetat bis 100 mmol/L eine erhöhte Methanausbeute. Ab 200 mmol/L sank der Methangehalt langsam ab. Die niedrigere Grenze für die Acetatbelastung könnte durch den Batchansatz bedingt sein, da dort keine Säuren direkt wieder ausgetragen werden. Bei Großanlagen gilt im Allgemeinen, dass der Prozess gestört wird, wenn der Wert über 3.000 mg/L steigt. In diesen Experimenten lagen die Grenzen der Konzentration bei einmaligen Zugaben bei ca. 8.000 und 16.000 mg/L. (bzw. 150 und 300 mmol/L). Obwohl Gegenteiliges in verschiedenen Literaturquellen beschrieben wird (Kuratorium für Technik

und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. ((KTBL), 2009), scheint Acetat bei einmaligen Zugaben keinen negativen Einfluss zu haben. Eventuell sind die Acetatkonzentrationen nicht prozessentscheidend, sondern lediglich eine Folge von einem gestörten Prozess. So führt eine Schädigung der Organismen, beispielsweise durch falsches Substrat, zu einer Anreicherung der Säuren, da diese nicht mehr abgebaut werden können.

Die Organismenanalyse hat gezeigt (vgl. Abbildung 3.18, S. 58), dass, anders als erwartet, die Häufigkeit von säurebildenden Organismen (*Bacteroidetes*, *Bacteroides* und *Mollicutes*) angestiegen ist. Die Archaeen, die den Abbau von Acetat bewirken, beispielsweise *M. concilii*, zeigten keine Veränderungen. Eventuell sind diese Organismen in der Lage, ihren Stoffwechsel bei punktuell überschüssigem Substrat bei gleichbleibenden Bedingungen wie pH-Wert etc. zu beschleunigen. Die wiederholten Zugaben bewirken in erster Linie einen Anstieg an Crenarchaeota, bevor nach der dritten Zugabe, wo die Acetatkonzentration den Wert von 400 mmol/L überschreitet und die Gasproduktion einbricht, alle Organismenkonzentrationen absinken. Wahrscheinlich haben sich die Bedingungen für die adaptierten Organismen im Fermenter verändert. Die sensible anaerobe Biozönose, die genau auf die Prozessbedingungen wie pH-Wert etc. eingestellt ist, reagiert sensibel auf Veränderung (Weiland, 2010). So könnte es sein, dass die Organismen ihren Stoffwechsel, aber auch ihr Zellwachstum reduzieren bzw. einstellen. Somit wurden mehr Organismen über die Fütterung ausgewaschen als nachgewachsen sind. Da die Gasqualität in dieser Phase nahezu gleich bleibt, scheint sich die Hemmung dabei gleichermaßen auf alle Archaeen auszuwirken und nicht auf die acetatverwertenden Organismengruppen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* begrenzt zu bleiben. Zu erwarten war ein Anstieg von acetoklastischen Organismen wie *M. concilii*, die das Acetat als Substrat umsetzen. Wahrscheinlich wurden die maximal verträglichen Substratkonzentrationen oder andere Parameter überschritten, so dass eine vollständige Umsetzung verhindert wurde.

4.3.3 Einfluss von Butyratzugaben

Der Einfluss von Butyrat wurde in einem ebenfalls kontinuierlich betriebenen Fermenter zeitgleich zum Acetateinfluss untersucht. Dabei wiesen die Zugaben schon in geringen Mengen bei kleiner Qualitätssteigerung des Gases eine deutliche Steigerung der Gasmenge auf. Bei einer semikontinuierlichen Zugabe wurde die Gasmenge mehr als verdoppelt. Eine Zunahme, bedingt durch den zusätzlichen Kohlenstoffanteil, konnte anhand von Berechnungen nach Baserga (1998) als Ursache ausgeschlossen werden. Anhand der zusätzlich zugeführten Organik, die ohne Wash-out-Effekt knapp 4,8 g (48 %) betrug, kann keine Zunahme von bis zu 300 % begründet werden. Nach Buswell & Müller (1952) hat das Gas, das aus Butyrat entstehen kann, einen Methananteil von 62,5% (vgl. Abbildung 3.19, S. 59). Dieser Wert war jedoch schon vor der Zugabe überschritten, was für eine schnelle

Umsetzung der längerkettigen FS spricht. Je länger die FS, desto höher ist nach Buswell (1952) die zu erwartende Methankonzentration im Biogas. Die minimalen, kurzzeitigen Verschlechterungen des Methangehaltes direkt nach der Säurezugabe könnten, bedingt durch ausgasendes CO₂ aus der Butyratlösung, analog der Acetatzugabe, verursacht worden sein.

Die Zugabe von pH-neutralem Butyrat konnte direkt mittels VFA-Analyse nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.20, S. 60). Auch hier wurde, analog zum Acetat, die angestrebte Zielkonzentration immer knapp unterschritten. Der Abbau des Butyrat erfolgte nach allen Zugaben sehr schnell, so dass bei semikontinuierlicher Zugabe die Werte nach 48 h annähernd der Ausgangskonzentration vor der Zugabe entsprachen. Die Folge des Abbaus war ein signifikanter Anstieg von Acetat und ein geringerer Anstieg von Propionat und Isobutyrat. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Butyrat zu Acetat abgebaut wird. Die Anstiege von Propionat, Isobutyrat etc. sind wahrscheinlich, analog zu den Acetatzugaben, in einer Hemmung des Abbaus und somit einer Anhäufung bei semikontinuierlichem Eintrag von Gülle begründet. Nach Untersuchungen von Schieder et al. (2010) ist ein verstärktes Auftreten von Propionsäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Oenanthsäure ein Indikator für einen instabilen Prozess, in dem die folgenden Schritte der Acetogenese und der Methanogenese nicht effizient ablaufen. Dies konnte über den untersuchten Zeitraum nicht bestätigt werden. Eventuell ist dies in der punktuellen Störung begründet, da der Butyratabbau nachweislich sehr schnell erfolgte. Nach Ahring et al. (1995 & 2003), die ebenfalls den Einfluss von Butyrat untersuchten, ist eine ähnliche Erhöhung der Methanausbeute durch Butyratzugaben beschrieben. Die Abhängigkeit der Steigerung von der Konzentration hat demnach ein Maximum bei 100 mmol/L, bei dem das vierfache Volumen an Methan gebildet wurde. Die dauerhafte Belastung mit durchschnittlich ca. 70 mmol/L Butyrat erzeugte im Maximum das dreifache Gasvolumen. Nach KTBL liegen die maximal verträgliche Konzentrationen für Butyrat unter 50 mg/L (5,7 mmol/L) im Großfermenter (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. ((KTBL), 2005).

Die Mikroorganismen (vgl. Abbildung 3.21, S. 61), die zuvor ein ähnliches Niveau wie der Kontroll- und Acetatfermenter aufwiesen, zeigten bei den punktuellen Zugaben einen Anstieg der säurebildenden *Bacteroides* und *Bacteroidetes*. Die Ordnung *Methanomicrobiales* wies sehr große Schwankungen ohne erkennbare Ursache auf. Die wiederholte Zugabe von Butyrat zeigte, anders als zu erwarten, keine Anstiege sondern Rückgänge von *Bacteroides* und *Firmicutes sp.* auf. Da der Verlauf von *Firmicutes sp.* analog dem bei Zugabe von Acetat verläuft, könnte der negative Einfluss auf diese Organismen auch durch den Acetatanstieg bedingt sein, der einer Butyratzugabe folgt.

4.4 Sensor

4.4.1 Sensoraufbau und Messanordnung

Die Überwachung von Biogasanlagen soll entsprechend dem Projekt „Bio-LAPS“ anhand der Aktivität der Mikroorganismen erfolgen. Dazu wurde von der Arbeitsgruppe Chemo- und Biosensorik unter Leitung von Prof. Schöning ein Sensor entwickelt und optimiert, mit dem es möglich ist, die Veränderung der H⁺-Ionenkonzentration an der Sensoroberfläche zu bestimmen. Die Idee ist, prozesstragende Mikroorganismen auf diesem Chip zu immobilisieren, deren stoffwechselphysiologische Aktivität in der Freisetzung oder Umsetzung von H⁺-Ionen resultiert. Die damit einhergehende pH-Wert-Änderung kann dann als hochsensibles Tool zur Überwachung des Prozesses erfolgen.

Der Messung erfolgt als Differenzmessung (vgl. Abbildung 3.27), um Einflüsse, die den Sensor im Medium beeinflussen, zu erfassen. Zusätzlich können Sensordrifts, die bei allen Sensoren bei längeren Messzeiträumen natürlicherweise auftreten, vom realen Signal unterschieden werden.

4.4.2 Immobilisierung und Stoffwechselaktivität

Für das Ziel, die Erfassung der Stoffwechselaktivität von Organismen auf einem Sensor realisieren zu können, wurden verschiedene Methoden der Immobilisierung getestet. Nach Untersuchungen bezüglich der zelleigenen Adhäsion, der kovalenten Bindung und Immobilisierung mittels Antibiotika wurde die Einschlussimmobilisierung in einer Gelmatrix aus Polyacrylamid als optimale Methode ausgewählt. Dieses Polymer, welches als chemisch neutral, resistent gegen Mikroorganismen und enzymatischen Abbau und mit geringer unspezifischer Adsorptionskapazität beschrieben ist, ermöglicht den Ganzzeleinschluss mit definierten Zellzahlen und Porengrößen in der Matrix (Yankov, 2004). Die Zelldichten sollten zwischen 10⁸ und 10⁹ Zellen pro mL betragen (Owicki & Parce, 1992). Zusätzlich können aufgrund der Gelmatrix die Diffusionsmöglichkeit, die Porengröße, die mechanische Stabilität, die Wasserlöslichkeit, die Abbaubarkeit, das Wachstum der Organismen und die Toxizität beeinflusst werden. Ebenfalls sind die Kosten der Methode gering und die Handhabung einfach. Vorteile der Gelimmobilisierung sind der Schutz der Organismen hinsichtlich Abrieb und Desorption sowie eine bessere Stabilität. Die Optimierung des Gels in dieser Arbeit erfolgte am Modellorganismus *E. coli*. Der Vernetzungsgrad wurde mit einem Acrylamidgehalt von 4 % und einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 37,5:1 so gewählt, dass eine ausreichende Stabilität, ein geringes Quellverhalten, eine gute Haftung auf der Sensoroberfläche gepaart mit einer Stabilität über mehrere Tage erfolgte. Die errechnete Porengröße liegt bei ca. 0,01 – 0,1 µm (Microdyn Nadir, 2010) und ermöglicht somit die Diffusion von gelösten Salzen, Zuckern und anderen Stoffen als notwendige Voraussetzung für die Substratversorgung der immobilisierten Organismen. Die

Mikroorganismen wie *E. coli* und *M. concilii* können aufgrund ihrer Größe (über 1 µm) nicht diffundieren und verbleiben somit auf der Sensoroberfläche.

Die Untersuchungen bezüglich der Organismenverteilung zeigten eine gewünschte gleichmäßige Verteilung (vgl. Abbildung 3.24, S.63). Wichtig ist jedoch, dass die ersten Messungen erst nach dem Spülen des Gels begonnen werden, um das Abwaschen der nicht fixierten Organismen zu ermöglichen. Die Anzahl an lebenden, aktiven Zellen ließ sich optisch nicht ermitteln.

4.4.3 Messungen mit *Escherichia coli*

Proof of Principle

Der Nachweis der Messbarkeit der Stoffwechselaktivität über die pH-Wert Änderung mit Hilfe eines LAPS konnte an *E. coli*-Kulturen in Suspension geführt werden. Die Änderung des Potentials in Folge der Säurebildung ist dabei zwar abhängig von der Anzahl der Organismen, korreliert jedoch nicht direkt mit der Zellzahl. Dies könnte eventuell darin begründet sein, dass bei hohen Organismenkonzentrationen eine Limitierung vorliegt, die beispielsweise durch das Substrat hervorgerufen wird. Dafür spricht auch, dass die Ansäuerungsraten der beiden geringeren Zellkonzentrationen mit 5,41 bzw. $5,19 \cdot 10^4 \text{H}^+$ pro Sekunde und Organismus entsprechend vergleichbar waren. Von Owicki & Parce (1992), die Säugerzellen untersuchten, wurden Ansäuerungsraten von ca. $1 \cdot 10^8 \text{H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ ermittelt. Diese Größenordnung wird von Booregaard, der neutrophile Granulozyten untersuchte und Umsatzraten von $1,3 \cdot 10^7 \text{H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ bei ruhenden und $5,5 \cdot 10^7 \text{H}^+ \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ bei atmungsaktiven Zellen fand, bestätigt (Booregaard et al., 1982). Der sehr viel geringere Umsatz könnte im geringeren Volumen der Bakterienzelle begründet sein. Diese Zellen sind im Vergleich zu Säugerzellen um das 1000-fache kleiner. Ebenfalls könnte eine geringere Stoffwechselrate eine mögliche Begründung liefern.

Messungen immobilisierter *E. coli* in Differenzanordnung

Die Messungen von immobilisierten *E. coli* weisen, wie in Abbildung 3.26 (S. 65) dargestellt, eine relativ reproduzierbare Ansäuerung auf. Auffällig ist, dass auch das organismenleere Gel scheinbar Ansäuerungen aufzeichnet. Dies bestätigt die zu Projektbeginn angedachte Idee der Differenzmessung. Der Drift könnte durch die Diffusion von frischem Medium oder aber auch von benachbarten Organismen ausgehen. Dennoch ist die Potentialänderung immer geringer als bei immobilisierten Organismen.

Die Reaktionszeit des Sensors mit Gelmatrix zeigt im Kontrollgel eine direkte Reaktion. Das Maximum ist direkt nach Medienwechsel in der ersten Messung erreicht. Das bestätigen die von Scott (1987) beschriebenen Ergebnisse, bei denen davon ausgegangen wird, dass die Diffusionsgeschwindigkeit bei niedermolekularen Stoffen eine untergeordnete

Rolle spielt, wenn zur Einschlussimmobilisierung Hydrogele mit hohem Wassergehalt und hoher Porosität, die ähnliche Diffusionskoeffizienten wie wässrige Lösungen aufweisen, genutzt werden. Demnach kann die Diffusion als vernachlässigbar geringer Faktor angesehen werden. Anders hingegen verlaufen die Signale, wenn *E. coli* im Gel immobilisiert wird. Im Mittel ist das Maximum erst nach drei Messungen, also nach sechs Minuten erreicht. Da die Diffusion in beiden Gelen identisch sein wird, ist dies wahrscheinlich die Zeit, die benötigt wird, bis der Stoffwechsel der Organismen reagiert, die pH-Wert Änderung erzeugt und die Diffusionsstrecke der Wasserstoffionen bis zum Sensor überwindet (Werner et al., 2011).

Die Differenzsignale weisen Potentialänderungsraten zwischen -0,14 und -0,22 mV/min mit einer Standardabweichung von $\pm 0,02$ mV/min auf. Die Stabilität der Werte über den Untersuchungszeitraum von 6 h deutet auf eine gute Immobilisierung ohne Auswaschung der Organismen hin. Mit den Ansäuerungsraten mit durchschnittlich $1,5 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ liegen die Werte jedoch nur bei ca. $\frac{1}{3}$ der Ergebnisse der nicht immobilisierten Organismen. Da der Einfluss der Immobilisierung als gering angenommen wird, könnten dies Effekte sein, die durch die Behandlung der Organismen hervorgerufen werden. Die Organismenanzahl ist vermutlich durch die verschiedenen Waschschriffe geringer als die aus der Kultur bestimmte Zellzahl, und auch die Lebendzellzahl mag deutlich kleiner sein als erwartet. Eventuell sind auch Zellen im Gel immobilisiert, die nicht mehr leben und daher keine Stoffwechselaktivität haben.

Der Vergleich mit Messungen, in denen über den Chip und das Gel eine Cellulosemembran gespannt wurde, weisen geringfügig geringere Ansäuerungsraten auf. Es lässt sich jedoch anhand der Kurvenverläufe vermuten, dass die Diffusion der Peptide und Aminosäuren, den Hauptbestandteilen des LB-Mediums, verlangsamt abläuft. Beide Kurvenverläufe, sowohl das Leergel als auch das mit Organismen beladene Gel, zeigen die maximale Potentialänderung erst zeitverzögert.

Ein konzentrationsabhängiges Signal bezüglich Glukose konnte mit immobilisierten *E. coli*-Bakterien, wie in Abbildung 3.28 auf Seite 67 gezeigt, nachgewiesen werden. Ersichtlich ist, dass auch bei Puffer der Sensor ein Driftsignal aufweist. Der zeitliche Diffusionsverzug, der zuvor durch die Membran ersichtlich wurde, ist bei diesem Versuch nicht erkennbar. Vermutlich ist die Diffusion der kleinen Glukosemoleküle schneller als die Messung, die erst nach Zugabe gering zeitverzögert gestartet wird.

Unter Betrachtung des Differenzsignals wird deutlich, dass die Umsatzrate zeit- und konzentrationsabhängig ist. Je geringer die Konzentration an Glukose, desto kürzer und desto geringer ist die Potentialdifferenz. Die Ansäuerungsrate von mehr als $1 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ bei 1,5 mmol/L Glukose liegt vom Wert her im Bereich der Änsäuerungsraten mit *E. coli* und

der Schutzmembran in LB-Medium. Vermutlich entspricht dies der maximalen Ansäuerungsrate.

Messungen mit *Methanosaeta concilii*

Analog zu *E. coli* wurde *M. concilii* auf einen Chip immobilisiert und Messungen durchgeführt, wobei alle Arbeitsschritte unter anaeroben Bedingungen erfolgten. Anhand der Messungen ist ein Anstieg des Potentials und damit eine Alkalisierung auf der Sensoroberfläche ersichtlich. Es kann daher angenommen werden, dass die immobilisierten *M. concilii*, die im Rahmen ihres Stoffwechsels Essigsäure abbauen, noch aktiv im Gel vorliegen. Die Immobilisierungsmethode scheint auch zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität dieser Organismen praktikabel zu sein. Die Alkalisierungsrate liegt mit $0,12 \cdot 10^4 \text{H}^+ \text{s}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$ um fast Faktor zehn unter der Stoffumsatzrate von *E. coli*. Dies könnte durch einen wesentlich langsameren Stoffwechsel bedingt sein. Würde der Stoffwechselumsatz analog zu den Verdopplungszeiten stehen - *E. coli* mit ca. 20 – 30 min und *M. concilii* mit ca. 65 – 70 h - wäre ein Faktor um 200 zu erwarten gewesen. Ähnlich verhält es sich zudem mit der Michaeliskonstante. Der K_S -Wert von 1,2 mmol/L liegt sehr hoch und weist damit auf einen langsamen Stoffumsatz hin (Lens et al., 1998).

Ebenfalls zeigen die Messungen, dass die unterschiedliche Stoffwechselaktivität auf die Höhe der Umgebungstemperatur zurückgeführt werden kann (vgl. Abbildung 3.29, S. 68). Bei geringeren Temperaturen ist die Umsatzrate geringer. Wichtig ist daher, die Messungen bei konstanten, bestenfalls optimalen Temperaturbedingungen des jeweiligen Organismus durchzuführen, um diese Einflüsse so gering wie möglich halten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Erfassung der metabolischen Aktivität mittels LAPS so sensibel möglich ist, dass Einflüsse von Temperatur und Substratkonzentration erfasst werden können. Problematisch ist jedoch die Erfassung, je höher die Pufferkapazität im umgebenden Medium ist. Dies und die geringe Alkalisierungsraten der *M. concilii* sind Fragestellungen, die im weiteren noch der Optimierung bedürfen, bevor der Sensor eine praktikable Überwachungsmethode für Biogasanlagen darstellen kann. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen aber, dass das angedachte Verfahren grundsätzlich erfolgreich sein kann.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit, die ein besseres mikrobiologisches Verständnis des Biogasbildungsprozesses im Zusammenhang mit den physikalischen und chemischen Beziehungen zum Ziel hatte, gliederte sich in drei Arbeitspakete: die Erfassung der Mikrobiologie in Labor- und Großanlagen, dem Aufbau von sechs identischen, parallel betriebenen Laborfermentern und die Entwicklung einer mikrobiellen Überwachungsmethode.

Im ersten Schritt wurde anhand von molekularbiologischen Methoden die Biozönose erfasst. Dabei wies die Gendatenbank für die Organismen des güllebasierten Laborfermenters eine große bakterielle Diversität auf, was anhand von 1266 untersuchten Klonen gezeigt werden konnte. Die Vielfalt der Archaeen, es wurden 412 Klone untersucht, war, wie erwartet, geringer. Als dominant und somit prozesstragend wurden die Bakterien *Bacteroides*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes sp.*, *Mollicutes* und „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ und die Archaeen Crenarchaeota, Euryarchaeota, Methanomicrobiales und *Methanosaeta concilii* gewertet, die im weiteren bezüglich ihrer Stabilität im kontinuierlichen Prozess, ihrer Empfindlichkeit gegenüber Fettsäuren in der Parallelanlage und ihrer Dominanz in Großanlagen untersucht wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass die Organismen im kontinuierlichen Betrieb einer güllebasierten Laboranlage ohne große Auffälligkeiten der physikalischen und chemischen Parameter in ihren Abundanzen sehr schwankten. Die Einflüsse von Fettsäuren, die in der Literatur als groß und ausschlaggebend beschrieben werden, konnten jedoch auf mikrobieller Ebene nicht bestätigt werden. Sowohl punktuelle als auch semikontinuierliche Zugaben bewirkten keine Effekte bezüglich der Häufigkeit der Archaeen und hatten nur geringe Auswirkungen auf die Abundanz der Bakterien. Der Einfluss auf die Stoffwechselaktivität war jedoch sehr groß. So wurden die Gasbildungsraten positiv beeinflusst und stiegen sowohl bei Acetat als auch bei Butyratzugaben. In diesen Versuchsreihen zeigten die chemischen und physikalischen Parameter kaum Änderungen, jedoch erwies sich die Gasbildungsrate als schneller Indikator. Der Vergleich der Ergebnisse bezüglich der prozessdominanten Organismen in den Laboranlagen mit denen in Großanlagen zeigte, dass diese ebenfalls in Großanlagen mit diversen Fütterungen (Mais/Gülle-, Maismono- und Zuckerrübenmonovergärung) wiedergefunden werden konnten. Jedoch variieren die Abundanzen, besonders die der Bakterien, erheblich. Die gärenden Organismen *Firmicutes sp.* und *Mollicutes* zeigten geringe Häufigkeiten bei silagegefütterten Anlagen (hier Mais und Zuckerrüben), *Bacteroides* und die *Bacteroidetes* hingegen waren immer dominant. Die Archaeen weisen in allen Anlagen annähernd gleich hohe Abundanzen auf.

Ein Sensor, der die mikrobiologische Aktivität der Organismen erfasst und somit eine Überwachungsmethode für die Biogasanlagen liefert, wurde in der AG Schöning so weit

entwickelt, bis das Funktionsprinzip im aeroben und anaeroben Milieu gezeigt werden konnte. Zusätzlich konnte ein substratkonzentrationsabhängiges Messsignal mit *E. coli* generiert werden (Werner et al., 2012). Leider konnte der Sensor mit immobilisierten acetoklastischen methanbildenden Archaeen nicht bis zur sicheren Anwendung als Überwachungsmethode weiterentwickelt werden, da die metabolische Aktivität des ausgewählten Organismus wahrscheinlich zu gering ist. Aufgrund der Ergebnisse aus Versuchen an der Parallelanlage ist der Ansatz, über die metabolische Aktivität den Prozess zu kontrollieren, jedoch sinnvoll, da einerseits ein starker Anstieg der Gasbildungsrate nicht unbedingt mit einem Anstieg der Organismenanzahl einhergeht, andererseits aber zu erwarten ist, dass Störungen schneller als mit herkömmlichen Methoden zu detektieren sind.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist deutlich geworden, dass die mikrobiellen Zusammenhänge in Biogasanlagen nicht einheitlich und konstant sind. Es bedarf somit weiterhin intensiver Forschungen zur Erfassung der komplexen mikrobiellen Zusammenhänge. Ein Ansatz dazu wird zur Zeit im Rahmen eines Forschungsprojektes „MiProBa“ – **Mikrobielle Prozessentschlüsselung der Biogasbildung mittels Batchversuchen an verschiedenen Substraten** (Förderkennzeichen: 005-1007-0053, gefördert vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen) erarbeitet, das bei gleicher Ausgangsmikrobiologie den Einfluss der Cosubstrate auf die Mikrobiologie untersucht. Zusätzlich sind die Einflüsse von Intermediärprodukten auf den Prozess nicht zu unterschätzende Parameter, die weiter untersucht werden müssen. Die Parallelfermenter haben dazu bereits einen großen Beitrag geliefert und können dazu eingesetzt werden. Mit solchen strukturierten Untersuchungen wird es vielleicht möglich, den Prozess der Biogasbildung effektiver zu gestalten und im idealen Fall Biogas als Regelenergie nutzen zu können. Damit würde Biogas seine Stellung innerhalb der regenerativen Energien stärken und ausbauen.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Amoniumpersulfat
BG	Biogas
BHKW	Blockheizkraftwerk
bp	Basenpaar
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
Cy-3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FS	Fettsäuren
FFS	Flüchtige Fettsäuren
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FOS	flüchtige organische Säuren
GC	Gaschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	Hydraulic-Retention-Time (Verweilzeit)
LAPS	lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor
NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe
oTS	organische Trockensubstanz
OTU	operative taxonomische Einheiten (<i>operational taxonomic units</i>)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RZB	Raum-Zeit-Belastung
RT	Raumtemperatur
<i>rt</i> PCR	<i>real time</i> PCR
StrEG	Stromeinspeisevergütung
TAC	gesamter anorganischer Kohlenstoff (total anorganic carbon)
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine
TOC	Gesamtkohlenstoff (total organic carbon)
TS	Trockensubstanz

6.2 Literaturverzeichnis

- Abd-Elisalam, K.A.**, (2003) Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design [Artikel] // African Journal of Biotechnology 2 (5). - S. 91-95.
- Ahring, B.**, (2003) Perspectives for Anaerobic Digestion [Buchabschnitt] // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 81 / Buchverf. Scheper.
- Ahring, B.**, (2003a) Biomethanation I [Buch] // Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I.**, (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors [Artikel] // Applied Microbiology and Biotechnology 43. - S. 559-565.
- Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, A.**, (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 6 (56). - S. 1919-1925.
- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H.**, (1995) Phylogenetic Identification and in situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation [Artikel] // Microbiological Reviews 59 (1). - S. 143-169.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A.**, (1990a) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology [Artikel] // Journal of Bacteriology 172. - S. 762-770.
- Amtsblatt der Europäischen Union**, (2009) Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. April 2009 zur Förderung der Nutzung von Energien aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG [Buchabschnitt].
- Analytik Jena**, (2011) innuPREP Stool DNA Kit // Produkte und Applikationen [Buch].
- Analytik Jena**, (2008) innuPREP Stool DNA Kit - Manuel [Buch].
- Ansede, J.H., Friedman, R., Yoch, D.C.**, (2001) Phylogenetic Analysis of Culturable Dimethyl Sulfide-Producing Bacteria from Spartina-Dominated Salt Marsh and Estuarine Water [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 3 (67). - S. 1210-1217.
- Antranikian, G.**, (2006) Angewandte Mikrobiologie [Buch]. - [s.l.] : Springer-Verlag Berlin Heidelberg. - S. 460-487.
- Asakawa, S., Nagaoka, K.**, (2003) *Methanoculleus bourgenisi*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus odenburgensis* are subjective synonyms [Artikel] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53. - S. 1551-1552.
- Aurich, H.G., Rinze P.**, (1993) Chemisches Praktikum für Mediziner, 2. überarbeitete Auflage [Buch]. - Stuttgart : B.G. Teubner. – S. 39-52.
- Bachmaier, H., Mitterleitner, H., Gronauer, A.**, (2004) Aus vielen Einzelteilen - Woraus besteht eine Biogasanlage [Artikel] // Energie. - S. 30-34.
- Baker, G.C., Smith, J.J., und Cowan, D.A.**, (2003) Review an re-analysis of domain-specific 16S primers [Artikel] // Journal of Microbiological Methods 55. - S. 541-555.
- Bangsow T., Huch, R., Male, D., Müller, S.**, (2002) Gentechnische Methoden Bd. 3 [Buch]. - Heidelberg; Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH. - S. 147-168.
- Bangsow, T., Deutsch, U., Engel, H., Korfhage, C., Löffert, D.**, (2007) Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Bd. 4 [Buchabschnitt] // Gentechnische Methoden / Buchverf. Jansohn M. (Hrsg.). - [s.l.] : Spektrum Akademischer Verlag.
- Baserga, U.**, (1998) Landwirtschaftliche Co-Vergärungs-Biogasanlagen - Biogas aus organischen Reststoffen und Energiegras [Bericht]. - [s.l.] : FAT-Berichte 512. - S. 1-12.
- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A., Lebhuhn, M.**, (2008) Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach [Artikel]. // Water Science and Tecnology 58 (7). - S. 1433-1439.
- Bayrisches Landesamt für Umwelt (LfU)** (2007) Biogashandbuch Bayern - Materialienband [Buch]. - Augsburg : [s.n.]. - S. 12.

- Bergmann, I., Mundt, K., Sontag, M., Baumstark, I., Nettmann, E., Klocke, M.,** (2010) Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters [Artikel] // *Systematic and Applied Microbiology* 33. - S. 78-84.
- Besgen, S.,** (2005) Energie- und Stoffwechsellumsetzung in Biogasanlagen - Ergebnisse messtechnischer Untersuchungen an landwirtschaftlichen Biogasanlagen im Rheinland. [Bericht]. // Landesamt für Ernährungswirtschaft und Jagd, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Bonn.
- Bickerstaff, G.F.,** (1997) Immobilization of Enzymes and Cells [Buchabschnitt] // *Methods in Biotechnology* 1. - S.1-11.
- Bio-Rad Laboratories** (2002) iCycler iQ Real-Time PCR Detection System - Instruction Manual [Buch]. - S. 51-54.
- Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K., Seyfried, C. F., Böhnke, B.,** (2005) Anaerobtechnik, Bd. 2 [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.
- Boone, D.R., Bryant, M.P.,** (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems [Artikel] // *Applied and Environmental Microbiology* 40. - S. 626-632.
- Borregaard, N., Herlin, T.,** (1982) Energy Metabolism of Human Neutrophils during Phagocytosis [Artikel] // *The Journal of Clinical Investigation* 70. - S. 550-557.
- Boyle, W.C.,** (1977) Energy recovery from sanitary landfills - a review [Journal] // *Microbial Energy Conversion UNITAR*. - S. 119-138.
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU),** (2011) Erneuerbare Energien in Zahlen - Nationale und internationale Entwicklung [Bericht].
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU),** (2010) Erster/Zweiter/Dritter/Vierter/Fünfer/Sechster/Siebter und Achter nationaler Bericht zur Umsetzung der Richtlinie 2003/30/EG vom 8.5.2003 zur Förderung der Verwendung von Biokraftstoffen oder anderer erneuerbarer Kraftstoffe im Verkehrssektor [Bericht] // Richtlinie 2003/30/EG / Buchverf. BMU.
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktortechnik (BMU),** (2010a) Das Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) - Kritik und Missverständnisse [Bericht].
- Bundesrepublik Deutschland,** (2010) Nationaler Aktionsplan für erneuerbare Energie gemäß der Richtlinie 2009/28/EG zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen [Bericht].
- Bustin, S.A.,** (2005) Real-Time PCR [Artikel] // *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. - S. 1117-1125.
- Buswell, A.M., Müller, H.F.,** (1952) Mechanism of Methane Fermentation [Artikel] // *Industrial and Engineering Chemistry* 3 (44). - S. 550-552.
- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., Verstraete, W.,** (2011) Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors [Artikel] // *Applied Microbiology and Biotechnology* 89. - S. 303-314.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A.,** (2005) Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester [Artikel] // *Environmental Microbiology* 7 (8). - S. 1104-1115.
- Christensen, B., Characklis, W.G.,** (1990) Physical and chemical Properties of Biofilms [Buchabschnitt] // *Biofilms / Buchverf. Characklis W.G. und Marshall K.C.* - New York : [s.n.]. – S. 93-130.
- Collins, G., O'Connor, L., Mahony, T., Gieseke, A., de Beer, D., O'Flaherty, V.,** (2005) Distribution, Localization, and Phylogeny of Abundant Populations of Crenarchaeota in Anaerobic Granular Sludge [Artikel] // *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11). - S. 7523-7527.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., Conrad, R.,** (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to complete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor [Artikel] // *Archives of Microbiology* 149. - S. 350-357.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R.,** (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of the single cells [Artikel] // *Science* 243 (4896). - S. 1360-1363.

- Desantis, D., Tryon, V.V., Pollack, J.D.,** (1989) Metabolism of *Mollicutes*: the Embden-Meyerhof-Parnas Pathway and the Hexose Monophosphate Shunt [Artikel] // Journal of General Microbiology 135. - S. 683-691.
- Deublein, D., Steinhauser, A.,** (2008) Biogas from waste and renewable resources [Buch]. - Weinheim : Wiley-VCH Verlag. – S. 87-148.
- Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH,** (2010) Unternehmen, Entwicklung, Energie [Bericht].
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S.,** (1993) General Concepts for PCR Primer design [Artikel] // PCR Methods and Applications 3. - S. 30-37.
- Dohrmann, A.B., Baumert, S., Klingebiel, L., Weiland, P., Tebbe, C.C.,** (2011) Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members [Artikel] // PCR Applied Microbiology and Biotechnology 89. - S. 1991-2004.
- Eder, B., Schulz, H.,** (2006) Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit [Buch]. - Staufen bei Freiburg : Ökobuch Verlag.
- Ehhalt, D.H., Schmidt, U.,** (1978) Sources and Sinks of Atmospheric Methane [Artikel] // Pure and Applied Geophysics 116. - S. 452-464.
- Eiring, P., Manncke, B., Gerbracht, K., Werner, H.,** (1995) *Bacteroides fragilis* adheres to laminin significantly stronger than *Bacteroides thetaiotaomicron* and other species of the genus [Artikel] // Zentralblatt für Bakteriologie 282 (3). - S. 279-286.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR),** (2011) Basisdaten Bioenergie Deutschland [Buch].
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR),** (2009) Biogas-Messprogramm II [Bericht]. - 1. Auflage - S. 13-21.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR),** (2010) Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung [Buch]. - Bd. 5.
- Fall, P.A.D.,** (2002) FISH zur Überwachung von Biogasreaktoren [Bericht]. - München : Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Technische Universität München. - Bd. 172.
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J.,** (1999) How Stable is Stable? Function versus Community Composition [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 65 (8). - S. 3697-3704.
- Finegold, S.M., Attebery, H.R., Sutter, V.L.,** (1974) Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets [Artikel] // The American Journal of Clinical Nutrition 27. - S. 1456-1469.
- Fleige, S., Pfaffl, M.W.,** (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance [Artikel] // Molecular Aspects of Medicine 27. - S. 126-139.
- Fronhoffs, S., Totzke, G., Wernert, N., Rothe, M., Brüning, T., Koch, B., Sachinidis, A., Vetter, H., Ko, Y.,** (2002) A method for the rapid construction of cRNA standard curve in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction [Artikel] // Molecular and Cellular Probes 16. - S. 99-110.
- Fuchs, G.,** Allgemeine Mikrobiologie Bd. 8 [Buch]. - Stuttgart : Thieme Verlag. - S. 678.
- Fukui, S., Tanaka A.,** (1982) Immobilized microbial cells [Artikel] // Annual Review of Microbiology 36. - S. 145-172.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G.,** (2003) Taxonomic outline of the prokaryotes - Bergey's manual of systematic bacteriology, Bd. 2 [Buch]. - Michigan State University : Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg.
- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall, B.J.,** (2007) Part 8 - The Bacteria: Phylum "Firmicutes": Class *Mollicutes* [Buchabschnitt] // Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea / Buchverf. Garrity G.M..
- Gaul, T.,** (2011) Probe fürs Labor [Artikel] // Joule 3. - S. 51-55.
- Gentechnik Gesetz,** (2010) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG 00.00-5 [Gesetz].

- Gerardi, M.H.**, (2003) The microbiology of anaerobic digesters [Artikel] // John Wiley & Sons Inc.. - Hoboken, New Jersey, : [s.n.] - S. 177.
- Giovanni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R.**, (1988) Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells [Artikel] // Journal of Bacteriology 2 (170). - S. 720-726.
- Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R.**, (1997) Molecular microbial Diversity of an anaerobic digester as determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 7 (163) - S. 2802-2813.
- Görisch, U., Helm, M.**, (2006) Biogasanlagen, 2. überarbeitete Auflage [Buchabschnitt]. - Stuttgart : Eugen Ulmer KG.
- Griß, E., Meckelein, B., Schulz, K., Seranski, P., Setzke, E.**, (2002) Isolierung von DNA [Buchabschnitt] // Gentechnische Methoden / Buchverf. Schrimpf G. (Hrsg). - [s.l.] : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Bd. 3.
- Hafner, F.**, (2000) Cytosensor® Microphysiometer: technology and recent applications [Artikel] // Biosensors and Bioelectronics 15. - S. 149.
- Hartmeier, W.**, (1985) Immobilisierte Biokatalysatoren - Auf dem Weg zur zweiten Generation [Artikel] // Naturwissenschaften 72. - Aachen : Springer-Verlag. - S. 310-314.
- Hecht, M., Clemens, J., Wulf, S.**, (2007) Entwicklung eines einfachen und für den Landwirt durchführbaren Verfahrens zur Überwachung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen [Bericht]. - Bonn : [s.n.].
- Heid C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams P.M.**, (1996) Real time quantitative PCR [Artikel] // Genome Research 6 (10). - S. 986-994.
- Hein, H., Kunze, W.**, (1994) Umweltanalytik mit Spektroskopie und Chromatographie - Von der Laborausstattung bis zur Dateninterpretation, Bd. 46 [Buch] // Starch - Stärke / Buchverf. Ocker H.-D..
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R.**, (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [Artikel] // Biotechnology 10. - S. 413-417.
- Hohensee, J., Salewski, M.**, (1993) Energie - Politik - Geschichte [Buch]. - Stuttgart : [s.n.], Bd. 5. - S. 8-74.
- Holdeman, L.V., Good, I.J., Moore, W.E.C.**, (1976) Human Fecal Flora: Variation in Bacterial Composition within Individuals and a Possible Effect of Emotional Stress [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 31 (3) - S. 359-375.
- Jansen, F.**, (2011) Untersuchung von Einflußgrößen auf die Biogasproduktion einer Parallelfermentieranlage [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- John, H.A., Birnstiel, M.L., Jones, K.W.**, (1969) RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level [Artikel] // Nature 223. - S. 582-587.
- Jörres, N.**, (2010) Aufbau einer Parallel-Fermentations-Anlage zur Biogasproduktion und Versuche zur Raum-Zeit-Belastung [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Jothikumar, N., Griffiths, M.W.**, (2002) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 68 (6). - S. 3169-3171.
- Jülicher, A.**, (2010) Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt in einem güllebasierten Biogasfermenter [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Jung, R., Soondrum, K., Neumaier, M.**, (2000) Quantitative PCR [Artikel] // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 9 (38). - S. 833-836.
- Kaiser, F.L., Metzner, T., Effenberger, M., Gronauer, A.**, (2008) Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen [Bericht]. - Freising : 2. Auflage, Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Kaspers, K.**, (2012) Effekt von verschiedenen Fettsäuren und Ethanol auf den Biogasbildungsprozess [Bericht]. - Jülich : [s.n.].

- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G.,** (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases [Artikel] // *Journal of Molecular Biology* 56. - S. 341-361.
- Klocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K., Linke, B.,** (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate [Artikel] // *Systematic and applied microbiology* 30. - S. 139-151.
- Klocke, M., Nettman, E., Bergmann, I.,** (2009) Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems [Bericht]. - Potsdam-Bornim : Leibnitz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.. S. 9-90.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B.,** (2008) Characterisation of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass [Artikel] // *Systematic and Applied Microbiology* 31. - S. 190-205.
- Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S., Scherer, P.,** (2010) Anaerobic digestion of renewable biomass: Thermophilic temperature governs methanogen population dynamics [Artikel] // *Applied and Environmental Microbiology* 76 (6) - S. 1842-1850.
- Krakat, N., Schmidt, S., Scherer, P.,** (2010a) Mesophilic fermentation of renewable biomass: does hydraulic retention time regulate methanogen diversity? [Artikel] // *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18) - S. 6322-6326.
- Krause, L., Diaz, N.N., Edwards, R.A., Gartemann, K.H., 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 biogas reactor [Artikel] // *Journal of Biotechnology* 136. - S. 91-101.
- Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N.N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K.J., Viehöver, P., Pühler, A., Schlüter, A.,** (2009) Phylogenetic characterization of a biogas microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing [Artikel] // *Journal of Biotechnology* 142. - S. 38-49.
- Krumholz, L.R., Bryant, M.P.,** (1986) *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. Requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin [Artikel] // *Archives of Microbiology* 144 (1). - S. 8-14.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K.,** (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [Artikel] // *Briefings in Bioinformatics* 4 (9). - S. 299-306.
- Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),** (2005) Gasausbeuten in landwirtschaftlichen Biogasanlagen [Buch]. - Darmstadt. - KTBL-Heft 88.
- Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),** (2009) Faustzahlen Biogas [Buch]. - Darmstadt. - 2. Auflage.
- Küppers, C.,** (2009) Vergärung von *Chrysanthemum x morifolium* in einem güllebasierten Fermentersystem zur Produktion von Biogas [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Lang, G.,** (2006) Histotechnik - Praxislehrbuch für medizinische Analytik [Buch]. - [s.l.] : Springer Wien New York. - S. 303.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W.,** (2005) A standard curve based method for relative *real time* PCR data processing [Artikel] // *BMC Bioinformatics* 62 (6).
- Lebhuhn, M., Bauer, C., Gronauer, A.,** (2008) Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik [Artikel] // *VDLUFA-Schriftenreihe*, Bd. 64. - S. 118-125.
- Lebhuhn, M., Gronauer, A.,** (2009) Microorganisms in the biogas-process – the unknown beings [Artikel] // *Journal of Agricultural Engineering Research* 64 (2). - S. 127-130.
- Leclerc, M., Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.-J.,** (2000) Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester [Artikel] // *FEMS Microbiology Ecology* 34. - S. 213-220.

- Lens, J.P., Terlingen, J.G.A., Engbers, G.H.M., Feijen, J.,** (1998) Mechanism of the Immobilization of Surfactants on Polymeric Surfaces by Means of an Argon Plasma Treatment: Influence of the Chemical Structure of Surfactant and Substrate [Artikel] // Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 36. - S. 1829-1846.
- Levén, L., Eriksson, A.R.B., Schnürer, A.,** (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste [Artikel] // Federation of European Microbiological Societies 59. - S. 683-693.
- Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H.,** (2011) Influence of Microbial Biocenosis on the Stability of the Biogas Production Process [Bericht] // 1st international Conference on biogas microbiology. - S. 96.
- Liu, F.H., Wang, S.B., Zhang, J.S., Yan, X., Zhou, H.K., Zhao, G.P., Zhou, Z.H.,** (2009) The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis [Artikel] // Journal of Applied Microbiology 106. - S. 952-966.
- Lorkowski, S., Thiemann, F.,** (2006) Die Amplifikation von Nukleinsäuren [Buchabschnitt] // Leitfaden Molekulare Diagnostik / Buchverf. Thiemann F., Cullen, P., Klein, H.-G.. - [s.l.] : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – S. 112-156.
- Lui, Y., Whiteman, W.B.,** (2008) Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea [Artikel] // Annals of the New York Academy of Sciences 1125. - S. 171-189.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S.,** (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [Artikel] // Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 (3). - S. 506-577.
- Mackay, I.M.,** (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory [Artikel] // Clinical Microbiology and Infection 10. - S. 190-212.
- Mäder, N.,** (2009) Identifizierung von methanogenen Archaeen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung aus einem güllebasierten Biogasbildungssystem am Beispiel von *Methanosarcina barkeri* [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Madigan, M.T., Martinko, J. M.,** (2006) Brock Mikrobiologie [Buch]. - München : Pearson Studium. - Bd. 11., überarbeitete Auflage.
- Märkl, H., Friedmann, H.,** (2006) Biogasproduktion [Buchabschnitt] // Angewandte Mikrobiologie / Buchverf. Antranikian G.. - [s.l.] : Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. – S. 459-488.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G., O'Flaherty, V.,** (2004) Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewater at 16-37 °C [Journal] // FEMS Microbiology Ecology 48. - S. 369-378.
- Microdyn Nadir,** (2010) The art to clear solutions.[Bericht] - S. 1-5.
- Mladenovska, Z., Ahring, B.K.,** (2000) Growth kinetic of thermophilic *Methanosarcina sp.* isolated from full-scale biogas plants treating animal manures [Artikel] // FEMS Microbiology Ecology 31. - S. 225-229.
- Moter, A., Göbel, U.B.,** (2000) Fluorescence-*in-situ*-hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms [Artikel] // Journal of Microbiological Methods 41 (2). - S. 85-112.
- Narihiro, T., Sekiguchi, Y.,** (2007) Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update [Artikel] // Current Opinion in Biotechnology 18(3). - S. 283-291.
- Neikes, L.,** (2008) Untersuchungen zu Vergärung und Biogasbildungspotenzial von Kakaobohnenschalen des Kakaobaumes *Theobroma cacao* in einem güllebasierten Biogasproduktionssystem [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Ottow, J.C.G.,** (2011) Mikrobiologie von Böden [Buch]. - Berlin-Heidelberg : Springer-Verlag. - S. 157-233.
- Owicki, J.C., Bousse, L.J., Hafeman, D.G., Kirk, G.L., Olson, J.D., Wada, H.G., Parce, J.W.,** (1994) The light-addressable potentiometric sensor: principles and biological applications [Artikel] // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 23. – S. 87-114.

- Owicki, J.C., Parce, J.W.**, (1992) Biosensor based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification [Artikel] // *Biosensors & Bioelectronic* 7. - S. 255-272.
- Oyston, P.C.F., Hardley, P.S.**, (1991) Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination [Artikel] // *Journal of Medical Microbiology* 34. - S. 51-55.
- Paradue, M.L., Gall, J.G.**, (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations [Artikel] // *Proceedings of the National Academy of Sciences* 64 (2). - S. 600-604.
- Patel, G.B.**, (1984) Characterisation and nutritional properties of *Methanotheroxillum concilii* sp. nov., a mesophil, acetoclastic methanogen" [Artikel] // *Canadian Journal of Microbiology* 30. - S. 1383-1396.
- Patel, G.B., Sprott, G.D.**, (1990) *Methanosaeta concilii* gen nov.. sp. nov. ("Methanotheroxillum") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev. comb. nov. [Artikel] // *International Journal of Systematic Bacteriology* 40. - S. 79-82.
- Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G.N., Médigue, C., Weissenbach, J., Le Paslier, D.**, (2008) Candidatus *Cloacamonas Acidaminovorans*: Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division [Artikel] // *Journal of Bacteriology* 7 (190). - S. 2572-2579.
- Pfaffel, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W.**, (2002) Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF- 2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. [Artikel] // *Domestic Animal Endocrinology* 22. - S. 91-102.
- Poppert, S., Essig, A., Stoehr, B., Steingruber, A., Wirths, B., Juretschko, S., Reischl, U., Wellinghausen, N.**, (2005) Rapid Diagnostics of Bacterial Meningitis by Real-Time PCR and Fluorescence-*in-situ*-Hybridisierung [Artikel] // *Journal of Clinical Microbiology* 7 (43). - S. 3390-3397.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A.**, (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens [Artikel] // *Applied and Environmental Microbiology* 4 (60). - S. 1232-1240.
- Reimann, M.**, (2010) Erstellung einer LabVIEW-basierten Mess-, Steuer- und Regelsoftware für eine Biogasversuchsanlage mit sechs Fermentern [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Reuters, R.**, (2011) Methodenvergleich und -erweiterung zur Vorhersage der Biogasausbeute [Bericht] / Hochschule Neubrandenburg.
- Rieger, C., Weiland, P.**, (2006) Prozessstörungen frühzeitig erkennen [Artikel] // *BIOGAS Journal*. - S. 18-20.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T.**, (1997) Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction [Artikel] // *Analytical Biochemistry* 245. - S. 154-160.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A.**, (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge [Artikel] // *The ISME Journal* 3. - S. 700-714.
- Robinson, I.M., Allison, J.M., Hartmann, P.A.**, (1975) *Anaeroplasmabactoclasticum* gen.nov., sp.nov.: an Obligately Anaerobic Mycoplasma from the Rumen. [Artikel] // *International Journal of Systematic Biology* 25 (2). - S. 173-181.
- Rutledge, R.G., Côté, C.**, (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves [Artikel] // *Nucleic Acids Research* 16 (31). - S. 93.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E.**, (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro [Artikel] // *Nucleic Acids Research* 21 (18). - S. 6409-6412.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.**, (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes [Artikel] // *Nature* 324. -1986. - S. 13-19.
- Saitou, N., Nei, M.**, (1987) The neighbour-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [Artikel] // *Molecular Biology and Evolution* 4. - S. 406-425.

- Schieder, D., Gronauer, A., Lebuhn, M., Bayer, K., Beck, J., Hiepp, G., Binder, S.,** (2010) Prozessmodel Biogas [Bericht]. - [s.l.] : Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e.V.. - S. 1-39.
- Schiffels, J., Baumann, M.E.M., Selmer, T.,** (2011) Facile analysis of short-chain fatty acids as 4-nitrophenyl esters in complex anaerobic fermentation samples by high performance liquid chromatography [Artikel] // Journal of Chromatography A 34 (1218). - S. 5848-5851.
- Schiffer, K.,** (2011) Identifizierung der dominanten Organismen in einem Biogasfermenter anhand der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Schink, B.,** (1980) Syntrophism among Prokaryotes [Buchabschnitt]. - In A. Balows (ed.), The Prokaryotes. - Springer Verlag. - S. 276-299.
- Schink, B.,** (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation [Artikel] // Microbiology and Molecular Biology Reviews 34 (61). - S. 262-280.
- Schleper, C.,** (2007) Ammonium-oxidierende Archaea [Artikel] // BIOspektrum 13. - S. 620-621.
- Schneider, E., Fuchs, G.,** (2007) Allgemeine Mikrobiologie [Buch]. - Stuttgart : Georg Thieme Verlag, Bd. 8. - S. 44-48.
- Schnürer, A., Zellner, G., Svenson, B.H.,** (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors [Artikel] // FEMS Microbiology Ecology 29. - S. 249-261.
- Schöning, M.J., Brinkmann, D., Rolka, D., Demuth, C., Poghossian, A.,** (2005) CIP (cleaning-in-place) suitable "non-glass" pH sensor based on a Ta₂O₅-gate EIS structure [Artikel] // Sensors and Actuators B 111-112. - S. 423-429.
- Schumacher, K.,** (2009) Entwicklung einer modularen Probenzellenkonfiguration für anaerobe Kultivierungsexperimente und LAPS-Untersuchungen zur Charakterisierung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen [Bericht]. - Jülich : [s.n.].
- Scott, C.D.,** (1987) Immobilized cells: a review of recent literatur [Artikel] // Enzyme and Microbial Technology 9. - S. 66-69.
- Sekiguchim, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K.,** (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis [Artikel] // Microbiology 144. - S. 2655-2665.
- Spies, P.,** (1986) Anaerobe Behandlung fetthaltigem Abwassers am Beispiel einer Wollwäscherei [Bericht]. - Aachen. - S. 48-59.
- Storhas, W.,** (1994) Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Buch]. - Braunschweig/Wiesbaden : Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
- Tamura, K., Dudely, J., Nei, M., Kumar, S.,** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [Artikel] // Molecular Biology and Evolution 8 (24). - S. 1596-1599.
- Tescon,** (2012) www.tescon.de [Online]. - 7. Februar 2012.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K.,** (1977) Energy Conversion in Chemotrophic Anaerobic Bacteria [Artikel] // Bacteriological Reviews 41 (1). - S. 100-180.
- Thermo Fisher Scientific Inc.,** (2012) Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit [Bericht].
- United Nations,** (1998) Kyotot Protocol to the United Nations Framework convention on climate change [Konferenz].
- Volta, A.,** (1778) Briefe über die entzündbare Luft der Sümpfe [Buch]. - Straßburg : [s.n.]. - S. 1-226.
- Weiland, P.,** (2010) Biogas production: current state and perspectives [Artikel] // Applied Microbiology and Biotechnology 85. - S. 849-860.
- Weißbach, F.,** (2009) Ausnutzungsgrad von Nawaros bei der Biogasgewinnung [Journal] // Landtechnik 64 (1). - S. 18-21.
- Wilson, I.G.,** (1997) Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification [Artikel] // Applied and Environmental Microbiology 10 (63). - S. 3741-3751.

- Werner, C.F., Groebel, S., Schumacher, K., Spelthahn, H., Wagner, T., Selmer, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J.,** (2009) Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen während des Biogasbildungsprozesses [Bericht] // 9. Dresdner Sensor-Symposium. - S. 201-205.
- Werner, C.F., Schusser, S., Spelthahn, H., Wagner, T., Yoshinobu, T., Schöning, M.J.,** (2011) Field-programmable gate array based controller for multi spot light-addressable potentiometric sensors with integrated signal correction mode [Artikel] // *Electrochimica Acta* 56 - S. 9656-9660.
- Werner, C.F., Krumbe, C., Schumacher, K., Groebel, S., Spelthahn, H., Stellberg, M., Wagner, T., Yoshinobu, T., Selmer, T., Keusgen, M., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J.,** (2011a) Determination of the extracellular acidification of *Escherichia coli* by a light-addressable potentiometric sensor [Artikel] // *Physica Status Solidi A* 208 (6). - S. 1340–1344.
- Werner, C.F., Groebel, S., Krumbe, C., Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Baumann, M.E.M., Keusgen, M., Schöning, M.J.,** (2012) Nutrient concentration-sensitive microorganism-based biosensor [Artikel] // *Physica Status Solidi A* 209 (5). - S. 1-5.
- Wolf, M., Müller, T., Dankekar, T., Pollack, J.D.,** (2004) Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (*Mollicutes*) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data [Artikel] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54. - S. 871-875.
- Yankov, D.,** (2004) Diffusion of glucose and maltose in polyacrylamide gel [Artikel] // *Enzyme and Microbial Technology* 34. - S. 603-610.
- Yo, 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 [Artikel] // *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6). - S. 670-679.
- Zhang, Y., Canas, E.M.Z., Zhu, Z., Linville, J., Chen, S., He, Q.,** (2011) Robustness of archaeal populations in anaerobic co-digestion of dairy and poultry wastes [Artikel] // *Bioresource Technology* 102. - S. 779-785.
- Zimmermann, C.,** (2005) Entwicklung eines Nachweisverfahrens zur Untersuchung von Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa* Duch.) auf (latentem) Befall mit *Xanthomonas fragariae* (Kennedy & King), dem Erreger der eckigen Blattfleckenkrankheit an Erdbeeren, auf Basis der PCR [Bericht]. - Göttingen. - S. 80-89.

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht über die Standard-Redoxpotentiale einiger biologisch relevanter Systeme (Cord-Ruwisch, 1988).	8
Tabelle 2.1:	Übersicht über die verwendeten allgemeinen Primer zur Vervielfältigung der bakteriellen und Archaeen-DNA.	19
Tabelle 2.2:	Ansatzprotokoll für einen Verdau von PCR-Produkten.	23
Tabelle 2.3:	Verwendete, in der Literatur beschriebene Oligonucleotidsonden mit Zielorganismus, Label und Sequenz.	23
Tabelle 2.4:	Zusammensetzung der Ansätze für <i>real time</i> PCR.	24
Tabelle 2.5:	Protokoll der <i>real time</i> PCR mit spezifischen Primern.	25
Tabelle 2.6:	Medienzusammensetzung für Acetatmedium zur Kultivierung von <i>M. concilii</i>	32
Tabelle 2.7:	Zusammensetzung eines Polyacrylamidgeles zur Immobilisierung von Mikroorganismen.	34
Tabelle 2.8:	Zusammensetzung des isotonischen Phosphatpuffers.	35
Tabelle 3.1:	Übersicht über die OTU in der Domäne <i>Bacteria</i>	38
Tabelle 3.2:	Übersicht über die OTU in der Domäne <i>Archaea</i>	38
Tabelle 3.3:	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer für den spezifischen Nachweis der Zielorganismen in PCRs.	39
Tabelle 3.4:	Übersicht über spezifische FISH-Sonden.	41
Tabelle 3.5:	Übersicht über die Standardgeraden, die Korrelationskoeffizienten und die PCR-Effizienzen, erzeugt durch spezifische Primer und bekannte Konzentrationen der Plasmide.	47
Tabelle 4.1:	Übersicht der theoretisch berechneten Gasausbeute und Methankonzentration bezogen auf einen Fermenter und 24 h.	90
Tabelle 7.1:	PCR-Protokoll für allgemeine Bakterien-PCR.	XVII
Tabelle 7.2:	Programm der allgemeinen Bakterien-PCR.	XVII
Tabelle 7.3:	PCR-Protokoll für allgemeine Archaeen-PCR.	XVII
Tabelle 7.4:	Programm der allgemeine Archaeen-PCR.	XVII
Tabelle 7.5:	PCR-Protokoll für Kolonie-PCR.	XVIII
Tabelle 7.6:	Programm der Kolonie-PCR.	XVIII
Tabelle 7.7:	Medienzusammensetzung von LB-Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	XVIII
Tabelle 7.8:	Zusammensetzung der Trace element solution für <i>M. concilii</i>	XVIII
Tabelle 7.9:	Zusammensetzung der Vitamin solution für <i>M. concilii</i>	XIX
Tabelle 7.10:	Theoretische Gasausbeuten nach Baserga (1998).	XXXIXII

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Entwicklung der Anzahl und der installierten elektrischen Leistung von Biogasanlagen in Deutschland inklusive der Novellierungsdaten des EEG (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 2011).....	2
Abbildung 1.2:	Übersicht des Abbaus von organischer Biomasse zu Methan und Kohlenstoffdioxid durch Mikroorganismen im Biogasfermenter.	4
Abbildung 1.3:	Fettsäureabbau durch β -Oxidation, modifiziert nach Spies (1986).	5
Abbildung 1.4:	Schematische Übersicht der drei methanogenen Stoffwechselwege mit beteiligten Enzymen und Energieausbeuten, modifiziert nach Lui & Whiteman (2008).....	7
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung des lichtadressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS) auf Feldeffektbasis nach Werner et al. (2011). Über einen Bakterienrasen lässt sich die Ansäuerung unter dem Bakterienrasen unter Umgehung der puffernden Bestandteile aus der Fermentationsbrühe messen.....	13
Abbildung 1.6:	Schematische Darstellung einer Zelle, die den Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität und Messsignal zeigt (Owicki & Parce, 1992).	13
Abbildung 1.7:	Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Immobilisierung; links: Immobilisierung durch Kopplung, meist chemisch; rechts: Immobilisierung durch Einschluss mittels physikalischer Methoden.	14
Abbildung 1.8:	Strukturplan des Projektes „Bio-LAPS“, dessen Idee die Entwicklung eines Sensors zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen für den Biogasbildungsprozess ist.	14
Abbildung 2.1:	Ablaufschema der Arbeitsschritte zur Erstellung einer 16S rDNA Datenbank mit anschließendem Nachweis der Organismen anhand von FISH und <i>rt</i> PCR.....	18
Abbildung 2.2:	oben: pJET1.2/blunt Vektorkarte; unten: DNA-Sequenz der multiple cloning site (MSC)-Region (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011).....	20
Abbildung 2.3:	Biogas-Laborfermenter (1) und Nachgärer (2), temperiert über ein Wasserbad (3) und von unten gerührt (4). Die Fütterung erfolgt mittels Schlauchpumpe (5), die Gaserfassung über einen Trommelgaszähler (6). Das entstehende Gas wird in einem Gassack (7) gesammelt.	26
Abbildung 2.4:	links: Modularer Aufbau einer Chiphalterung. Unter die Basis (c) wird, abgedichtet durch eine Dichtung (d), der Chip (e) gelegt und mit dem Unterteil (f) verschraubt. Auf den Chip wird eine Membran (b) gelegt, die über einen Metallrahmen (a) fixiert wird; rechts: Foto eines eingebauten Chips in der Halterung (Schumacher, 2009).....	30
Abbildung 2.5:	Chemischer Aufbau eines Acylamid/Bisacryamidgels mit immobilisierten Organismen.	33
Abbildung 3.1:	links: Verdauemuster von Euryarchaota (AJA 12)-PCR-Produkten mit <i>Hpa</i> II ermittelt mit MultiNA; rechts: das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	40
Abbildung 3.2:	Mikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe (1:4 verdünnt); 1: lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme; 2: mit allgemeiner Archaeensonde Rhodamin green (grün) markiert; 3: mit spezifischer <i>Mollicutes</i> -Sonde (AJB 101) - Cy 3 (rot) markiert; 4: Überlagerung der Aufnahmen 2 und 3.	42
Abbildung 3.3:	Mikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe (1:4 verdünnt); 1: lichtmikroskopische Aufnahme; 2: mit allgemeiner Bakteriensonde Rhodamin green (grün) markiert; 3: mit spezifischer Euryarchaeota-Sonde (AJA 12) - Cy 3 (rot) markiert; 4: Überlagerung der Aufnahmen 2 und 3.....	43

Abbildung 3.4: Abgeschätzte Häufigkeiten der dominanten Organismen in zu verschiedenen Zeitpunkten genommenen Proben des Laborfermenter, wobei selten 0 - 2, mäßig 3 - 6 und häufig mehr als sechs Organismen pro Bildausschnitt entspricht.	44
Abbildung 3.5: Amplifikationen von fünf Standardkonzentrationen in Dreifachbestimmung von Methanomicrobiales (AJA 1) sowie einer Negativkontrolle (gelb) mit dem automatisch kalkulierten Treshold (orange).	45
Abbildung 3.6: Darstellung der C_t -Werte der Standardkonzentrationen gegen die logarithmische Anzahl der Kopienzahl am Beispiel von Methanomicrobiales (AJA 1).	46
Abbildung 3.7: Bestimmung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte durch das Auftragen der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur.	46
Abbildung 3.8: Vergleich der Methoden Gendatenbank und <i>rt</i> PCR bezüglich der prozentualen Häufigkeit der identifizierten Klone (■ Bakterienklone, ■ Archaeenklone) bzw. der Kopienanzahlen (■), ergänzt mit dem Vergleich der Verhältnisse Kopien zu Klone zueinander (◆).	48
Abbildung 3.9: Graphische Darstellung des pH-Wertes (◆) und der Redoxpotentiale (■) des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.....	49
Abbildung 3.10: Graphische Darstellung der Parameter Pufferkapazität (■) und FOS/TAC (◆) des Laborfermenters aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.....	50
Abbildung 3.11: Graphische Darstellung der Gasbildungsrate der gesamten Anlage (▲), des Fermenters (◆) und des Nachgärers (■) aufgetragen gegen den Untersuchungszeitraum. Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.....	50
Abbildung 3.12: Kopienanzahl dominanter Bakterien (---*--- Bacteroidetes, ---▲--- <i>Bacteroides</i> , ---●--- <i>Firmicutes sp.</i> , ---◆--- <i>Mollicutes</i> und ---■--- „ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> “) pro ng DNA-Isolat des Laborfermenters aufgetragen gegen die Zeit den Untersuchungszeitraum (Sommer 2009 bis Sommer 2011). Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (--) zeigt den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.....	51
Abbildung 3.13: Kopienanzahl dominanter Archaeen (---■--- <i>Crenarchaeota</i> , ---▲--- Euryarchaeota, ---◆--- Methanomicrobiales und ---*--- <i>M. concilii</i>) pro ng DNA-Isolat des Laborfermenters aufgetragen gegen die Untersuchungszeitraum (Sommer 2009 bis Sommer 2011). Die gepunkteten Linien (.....) zeigen Chargenwechsel der verwendeten Gülle, die gestrichelte Linie (--) den Zeitpunkt eines Lieferantenwechsels für die Gülle an.	52
Abbildung 3.14: Kopienanzahl dominanter Organismen pro ng DNA-Isolat aus Proben verschiedener Großanlagen, die mit unterschiedlichem Substrat betrieben wurden (■ 1/3 Rindergülle und 2/3 Maissilage; ■ 100 % Maissilage; ■ 100 % Zuckerrübensilage).	53
Abbildung 3.15: links: Aufbau eines einzelnen Fermenters; rechts: Aufbau der sechsfach Parallelanlage; A: Rührwelle; B: Gaskühler; C: Sauerstoffelektrode; D: Temperatursensor; E: Redoxelektrode; F: pH-Elektrode; G: Heizmatte, H: Überlauf; I: Gasanalytik; J: Fermenter, K: Panel-PC, L: Schaltkasten.	54

Abbildung 3.16: Entwicklung der Gasbildungsraten (—●—) und Gasqualitäten (Methan —■— und CO ₂ —▲—) während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	56
Abbildung 3.17: Gemessene Konzentrationen der flüchtigen organischen Fettsäuren (—◆— Acetat, —■— Propionat, —●— Butyrat, —▲— Isobutyrat) während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	57
Abbildung 3.18: Entwicklung der Häufigkeiten der dominanten Prozessorganismen (—★— Bacteroidetes, —▲— <i>Bacteroides</i> , —●— <i>Firmicutes sp.</i> , —◆— <i>Mollicutes</i> , —■— „ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> “, —▲— Crenarchaeota, —◆— Methanomicrobiales und —●— <i>M. concilii</i>) pro ng DNA-Isolat während der Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	58
Abbildung 3.19: Entwicklung der Gasbildungsraten (—●—) und Gasqualitäten (—■— Methan und —▲— CO ₂) während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	59
Abbildung 3.20: Gemessene Konzentrationen der flüchtigen organischen Fettsäuren (—◆— Acetat, —■— Propionat, —●— Butyrat, —▲— Isobutyrat) während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	60
Abbildung 3.21: Entwicklung der Häufigkeiten der dominanten Prozessorganismen (—★— Bacteroidetes, —▲— <i>Bacteroides</i> , —●— <i>Firmicutes sp.</i> , —◆— <i>Mollicutes</i> , —■— „ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> “, —▲— Crenarchaeota, —◆— Methanomicrobiales und —●— <i>M. concilii</i>) pro ng DNA-Isolat während der semikontinuierlichen Zugaben von Acetat bzw. Butyrat. Die Pfeile zeigen die Zugabezeitpunkte (→) an.....	61
Abbildung 3.22: links: Chipaufbau mit Differenzanordnung mit Längenangaben, wobei der Messbereich schwarz dargestellt ist; rechts: Foto eines Chips, der in der linken Kammer ein Acrylamidgel mit immobilisierten <i>E. coli</i> und in der rechten Kammer ein Kontrollgel beinhaltet (Quelle: AG Schöning).....	62
Abbildung 3.23: links: Schematische Darstellung der entwickelten Anaerob-Messzelle mit den Möglichkeiten der Temperierung, der Durchflussmessung, der Temperaturerfassung und einer Messstelle für die Referenzelektrode, rechts: Foto der Messkammer mit Referenzelektrode ohne Becken zur Temperierung (Quelle: AG Schöning).....	63
Abbildung 3.24: Lichtmikroskopische Aufnahme von in einem Acrylamidgel immobilisierten <i>E. coli</i> ; links: <i>E. coli</i> im Gel direkt nach Immobilisierung; rechts: <i>E. coli</i> im Gel nach Abspülen mit Wasser.....	63
Abbildung 3.25: Entwicklung des detektierten Potentials eines LAPS, auf dem <i>E. coli</i> – Suspensionen mit verschiedenen Konzentrationen (—■— $6,0 \cdot 10^9$, —■— $1,2 \cdot 10^{10}$, —▲— $2,4 \cdot 10^{10}$) <i>E. coli</i> pro mL in LB-Medium aufgegeben waren, dargestellt über die Zeit inklusive der durchschnittlichen Potentialänderungsraten.....	64
Abbildung 3.26: Darstellung der Potentialverläufe über die Zeit mit häufigem Wechsel des überschichteten Mediums; —▲—: Verlauf des Kontrollgels ohne <i>E. coli</i> ; —◆—: Verlauf des mit <i>E. coli</i> immobilisierten Gels; —▲—: Potentialdifferenz der Gele; unten: Werte der Ansäuerungsraten.....	65
Abbildung 3.27: Aufgezeigt sind die Potentialverläufe gegen die Zeit bei einer Differenzanordnung, die zusätzlich mit einer Celluloseacetatmembran überspannt ist und regelmäßigem Wechsel des überschichteten Mediums unterliegt; —▲—: Verlauf der Kontrolle mit einem Leergel ohne <i>E. coli</i> ; —◆—: Verlauf der mit <i>E. coli</i> beschichteten Chiphälfte; —▲—: Potentialdifferenz der zwei Chiphälften; unten: Werte der Ansäuerungsraten.....	65
Abbildung 3.28: Aufzeichnung der Potentialentwicklung des Kontrollgels ohne <i>E. coli</i> (—▲—), des Gels mit immobilisierten <i>E. coli</i> (—◆—) und das Differenzsignal (—▲—) über die Zeit in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen im überstehenden Medium; unten: durchschnittliche Potentialänderungsraten pro Zeit im linearen Bereich unmittelbar nach Glukosezugabe.....	67

Abbildung 3.29: Darstellung des Potentialverlaufes über die Zeit von <i>M. concilii</i> im anaeroben Milieu mit überschichtetem Acetatmedium (■), der aufgezeichneten Umgebungstemperatur (■) und der Potentialänderungsraten in den linearen Bereichen.....	68
Abbildung 7.1: Verdau von Bacteroidetes (AJB 110)-PCR-Produkten mit <i>Nla III</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XX
Abbildung 7.2: Verdau von <i>Bacteroides</i> (AJB 109)-PCR-Produkten mit <i>Hpa II</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XX
Abbildung 7.3: Verdau von <i>Firmicutes sp.</i> (AJB 114)-PCR-Produkten mit <i>Hae III</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XX
Abbildung 7.4: Verdau von <i>Mollicutes</i> (AJB 101)-PCR-Produkten mit <i>Nla III</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXI
Abbildung 7.5: Verdau von „Candidatus <i>Cloacamonas sp.</i> “ (AJB 104)-PCR-Produkten mit <i>Hpa II</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXI
Abbildung 7.6: Verdau von Methanomicrobiales (AJA 1)-PCR-Produkten mit <i>Hha I</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXI
Abbildung 7.7: Zweiter Verdau von Methanomicrobiales (AJA 1)-PCR-Produkten mit <i>Hinf I</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXII
Abbildung 7.8: Verdau von Crenarchaeota (AJA 8-11)-PCR-Produkten mit <i>Hae III (BsuR 1)</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXII
Abbildung 7.9: Verdau von Euryarchaeota (AJA 12)-PCR-Produkten mit <i>Hpa II</i> sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.	XXII
Abbildung 7.10: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von <i>Methanosaeta concilii</i>	XXIII
Abbildung 7.11: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von <i>Mollicutes</i> (AJB 101). ...	XXIV
Abbildung 7.12: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von „Candidatus <i>Cloacamonas sp.</i> “ (AJB 104).	XXV
Abbildung 7.13: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von <i>Bacteroides</i> (AJB 109).	XXVI
Abbildung 7.14: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Bacteroidetes (AJB 110).	XXVII
Abbildung 7.15: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von <i>Firmicutes sp.</i> (AJB 114).	XXVIII
Abbildung 7.16: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Methanomicrobiales (AJA 1).	XXIX
Abbildung 7.17: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Crenarchaeota (AJA 8-11).	XXX
Abbildung 7.18: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Euryarchaeota (AJA 12).	XXXI
Abbildung 7.19: Phylogenetischer Stammbaum des Phylum Firmicutes, erstellt mit der neighbor-joining Methode und <i>E. coli</i> als outgroup.....	XXXIV
Abbildung 7.20: Vergleich bezüglich der Gaszusammensetzung (■ Methan, ■ CO ₂) und Gasmengen (■) der sechs identisch betriebenen Fermenter des Parallelfermentersystems	XXXVII
Abbildung 7.21: Darstellung der Gasmenge, Methan- und Kohlenstoffdioxidwerte (oben), der FS (mitte) und der Organismenentwicklung (unten) über den ersten Versuchszeitraum.	XXXIV
Abbildung 7.22: Darstellung der Gasmenge, Methan- und Kohlenstoffdioxidwerte (oben), der FS (mitte) und der Organismenentwicklung (unten) über den zweiten Versuchszeitraum.	XXXV

6.5 Formelverzeichnis

Formel 2.1:	Formel zur Berechnung der Pufferkapazität (Aurich & Rinze, 1993)	26
Formel 2.2:	Formel zur Berechnung des FOS-Wertes (Rieger & Weiland, 2006).....	27
Formel 2.3:	Formel zur Berechnung des TAC-Wertes (Rieger & Weiland, 2006).....	27
Formel 2.4:	Formel zur Berechnung der Potentialänderungsrate (Owicki et al., 1994).....	31
Formel 3.1:	Formel zur Berechnung der Molmassen der spezifischen DNA-Fragmente.....	45
Formel 3.2:	Formel zur Berechnung der Stoffmenge.....	45
Formel 3.3:	Formel zur Berechnung der Fragmentanzahl.....	45
Formel 3.4:	Formel zur Berechnung der PCR-Effizienz (Larionov et al., 2005).....	46
Formel 4.1:	Stöchiometrische Gleichung zur Berechnung der Gasausbeute von Buswell & Müller (1952), modifiziert durch Boyle (1977).....	90

7 Anhang

Tabelle 7.1: PCR-Protokoll für allgemeine Bakterien-PCR.

Komponente	Konzentration
MgCl ₂	3,25 mmol/L
PCR-Puffer	1-fach
dNTP's	0,2 mmol/L je dNTP
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,025 U/μL
GM3F	1 μmol/L
GM4R	1 μmol/L
DMSO	5 %
Template	12 μg/mL

Tabelle 7.2: Programm der allgemeinen Bakterien-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Erste Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	60	30
Annealing	52	45	
Elongation	72	120	
Finale Extension	72	300	1
Kühlung / Lagerung	4	∞	1

Tabelle 7.3: PCR-Protokoll für allgemeine Archaeen-PCR.

Komponente	Finale Konzentration
MgCl ₂	2 mmol/L
PCR-Puffer	1-fach
dNTP's	0,2 mmol/L je dNTP
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,025 U/μL
PA3F	1 μmol/L
PA3R	1 μmol/L
Template	3 μg/mL

Tabelle 7.4: Programm der allgemeine Archaeen-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Erste Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	60	30
Annealing	51	30	
Elongation	72	90	
Finale Extension	72	600	1
Kühlung / Lagerung	4	∞	1

Tabelle 7.5: PCR-Protokoll für Kolonie-PCR.

Komponente	Konzentration (100µl-Ansatz)
MgCl ₂	6 mmol/L
PCR-Puffer	1-fach
dNTP's	0,2 mmol/L je dNTP
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,025 U/µL
pJET1.2 forward sequencing primer	1 µmol/L
pJET1.2 reverse sequencing primer	1 µmol/L
Kolonie-Suspension	5 µL

Tabelle 7.6: Programm der Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec) Bakterien	Dauer (sec) Archaeen	Zyklen
Erste Denaturierung	95	180	180	1
Denaturierung	94	30	30	25
Annealing	60	30	30	
Elongation	72	120	60	
Finale Extension	72	60	60	1
Kühlung / Lagerung	4	∞	∞	1

Tabelle 7.7: Medienzusammensetzung von LB-Medium zur Kultivierung von *E. coli*.

Chemikalien	Menge [% w/v]	Hersteller
NaCl	1	AppliChem GmbH
Hefeextrakt	0,5	Carl Roth
Trypton/Pepton	1	Carl Roth

Tabelle 7.8: Zusammensetzung der Trace element solution für *M. concilii*.

Chemikalien	Menge [% w/v]	Hersteller
Nitritotriessigsäure	1,28	Sigma-Aldrich
FeCl ₃	0,073	VWR
MnCl ₂	0,0062	Merck
CoCl ₂	0,0013	Fluka
CaCl ₂	0,075	VWR
ZnCl ₂	0,01	VWR
CuCl ₂	0,002	VWR
H ₃ Bo ₃	0,001	Merck
Na ₂ MoO ₄	0,002	Merck
NaCl	0,1	AppliChem GmbH
NiCl ₂	0,0065	Merck
Na ₂ SeO ₃	0,0017	Fluka

Tabelle 7.9: Zusammensetzung der Vitamin solution für *M. concilii*.

Chemikalien	Menge [g/L]	Hersteller
Biotin	2,0	Fluka
Folic acid	2,0	AppliChem GmbH
Pyridoxine-HCl	10,0	Sigma-Aldrich
Thiamine-HCl x 2 H ₂ O	5,0	Fluka
Riboflavin	5,0	Alfa Aesar
Nicotinic acid	5,0	Merck
D-Ca-pantothenate	5,0	AppliChem GmbH
Vitamin B12	0,1	AppliChem GmbH
p-Aminobenzoic acid	5,0	Sigma-Aldrich
Lipic acid	5,0	AppliChem GmbH

Vergleich der theoretischen und realen Verdauemuster von PCR-Produkten aus Biogasfermenterisolaten zum Beweis der Monoklonalität.

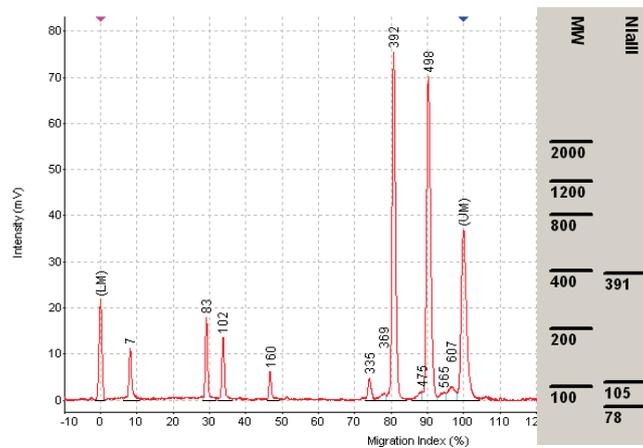


Abbildung 7.1: Verdau von *Bacteroidetes* (AJB 110)-PCR-Produkten mit *Nla III* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

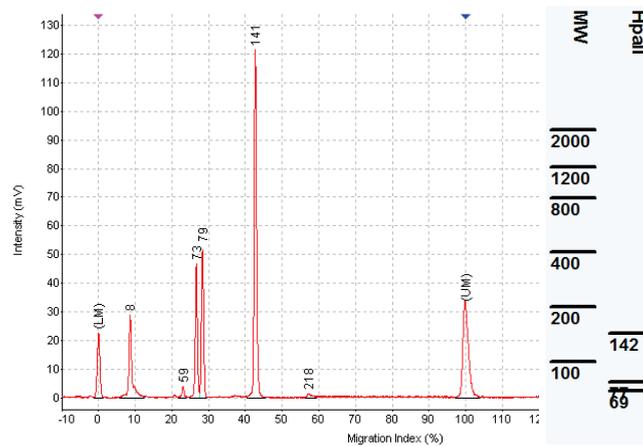


Abbildung 7.2: Verdau von *Bacteroides* (AJB 109)-PCR-Produkten mit *Hpa II* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

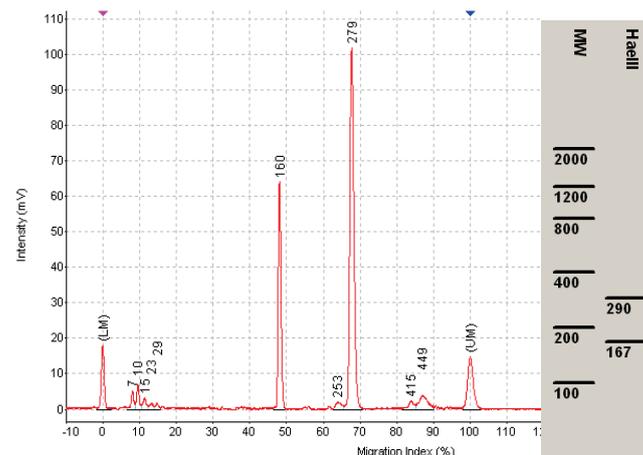


Abbildung 7.3: Verdau von *Firmicutes* sp. (AJB 114)-PCR-Produkten mit *Hae III* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

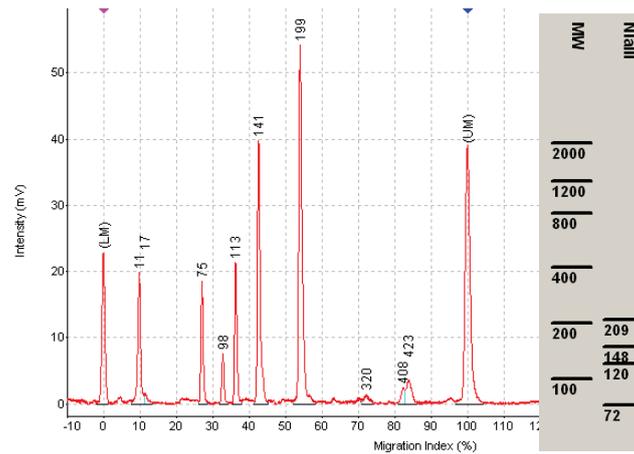


Abbildung 7.4: Verdau von *Mollicutes* (AJB 101)-PCR-Produkten mit *Nla III* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

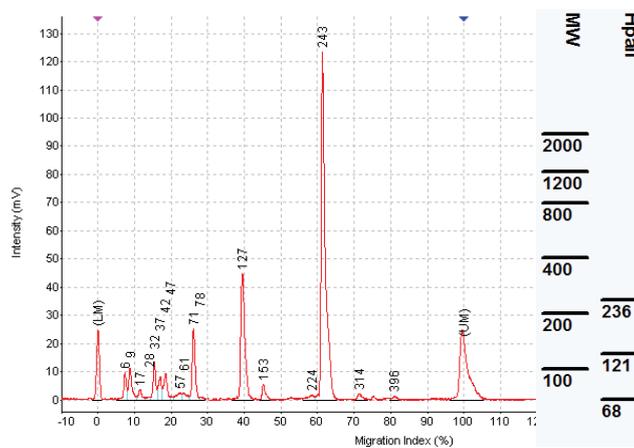


Abbildung 7.5: Verdau von „*Candidatus Cloacamonas sp.*“ (AJB 104)-PCR-Produkten mit *Hpa II* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

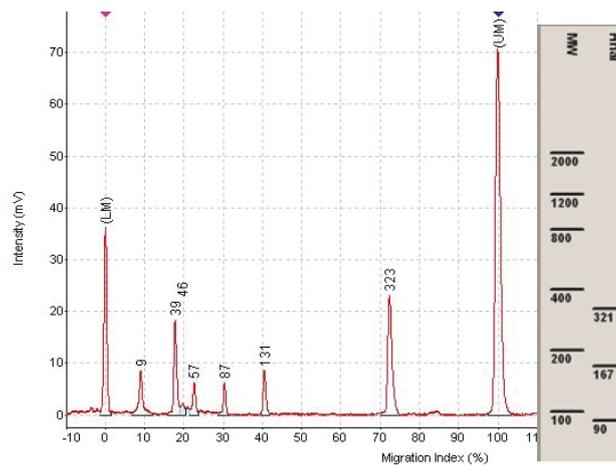


Abbildung 7.6: Verdau von Methanomicrobiales (AJA 1)-PCR-Produkten mit *Hha I* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

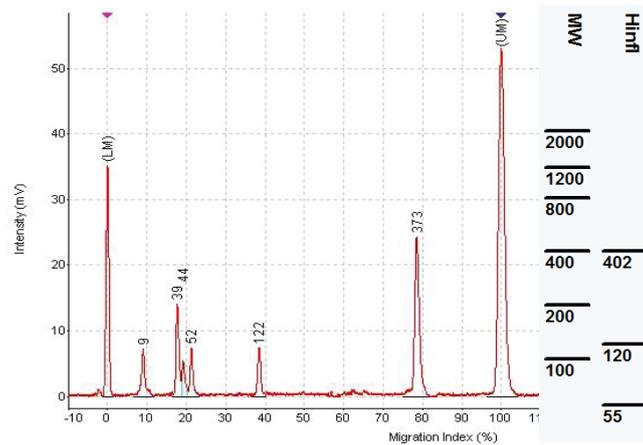


Abbildung 7.7: Zweiter Verdau von Methanomicrobiales (AJA 1)-PCR-Produkten mit *Hinf I* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

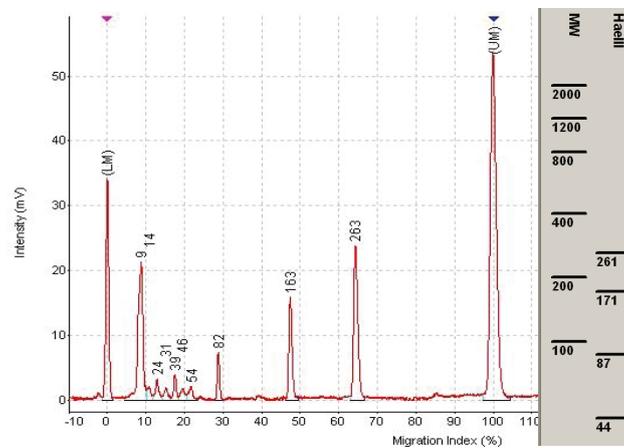


Abbildung 7.8: Verdau von Crenarchaeota (AJA 8-11)-PCR-Produkten mit *Hae III* (*BsuR 1*) sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

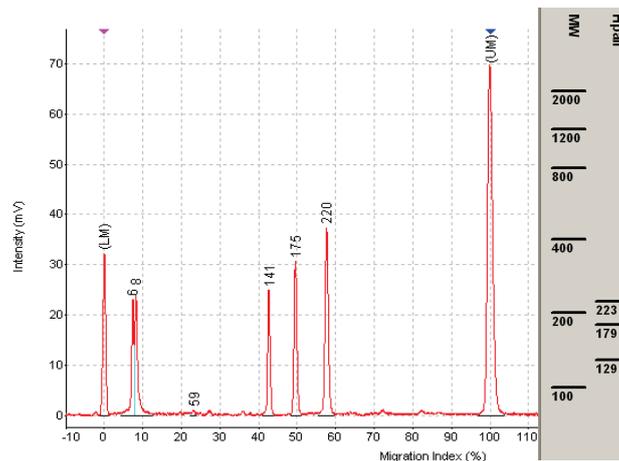


Abbildung 7.9: Verdau von Euryarchaeota (AJA 12)-PCR-Produkten mit *Hpa II* sowie das theoretische Schnittmuster ermittelt durch pDRAW32.

Real time PCR der Standards inklusive der Standardkurven und Standardgeraden

Methanosaeta concilii

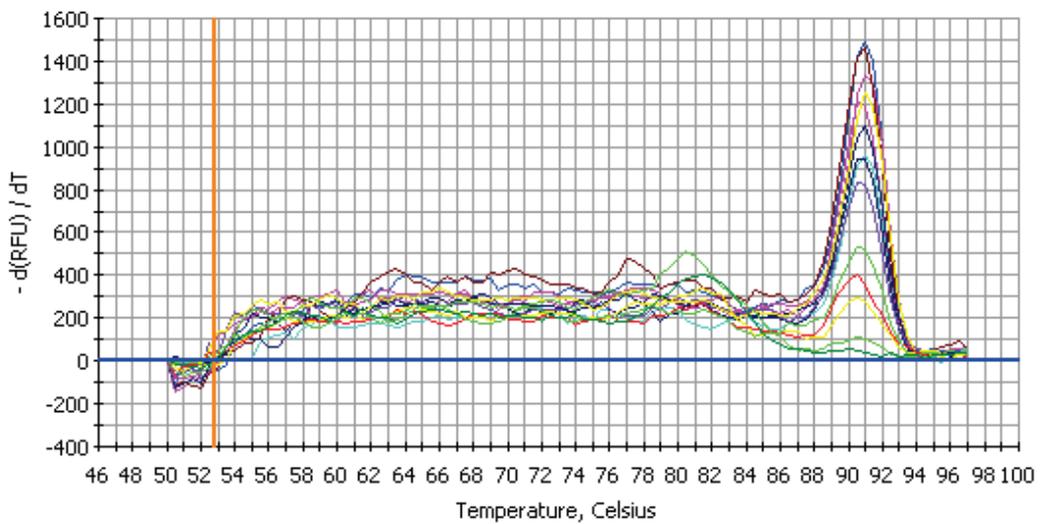
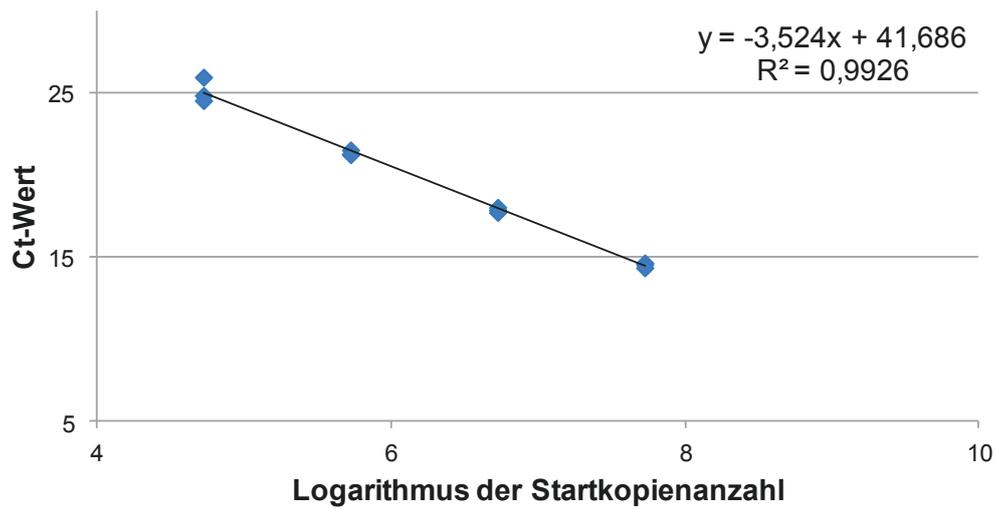
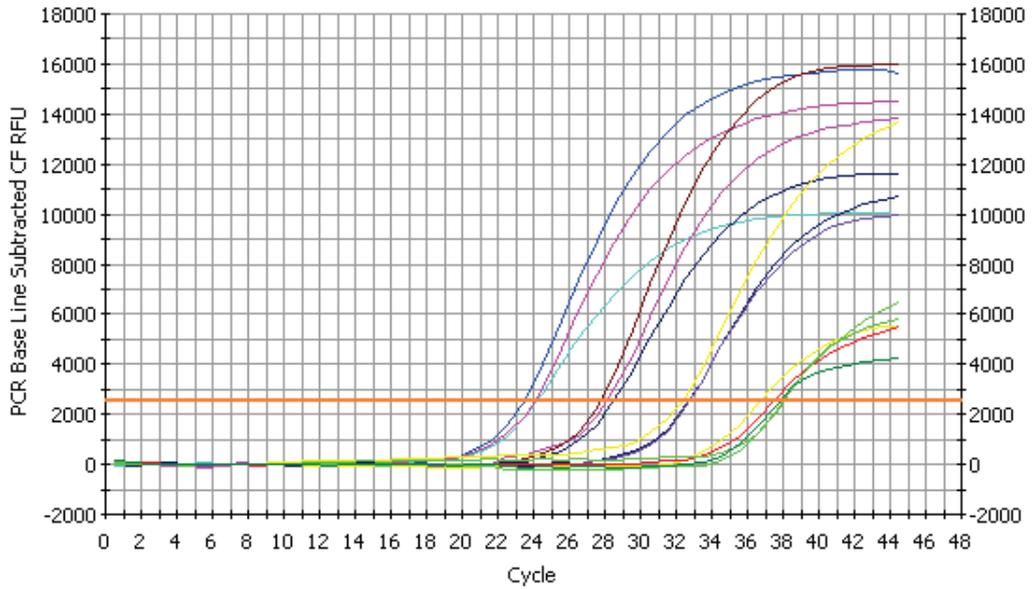


Abbildung 7.10: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von *Methanosaeta concilii*.

Mollicutes (AJB 101)

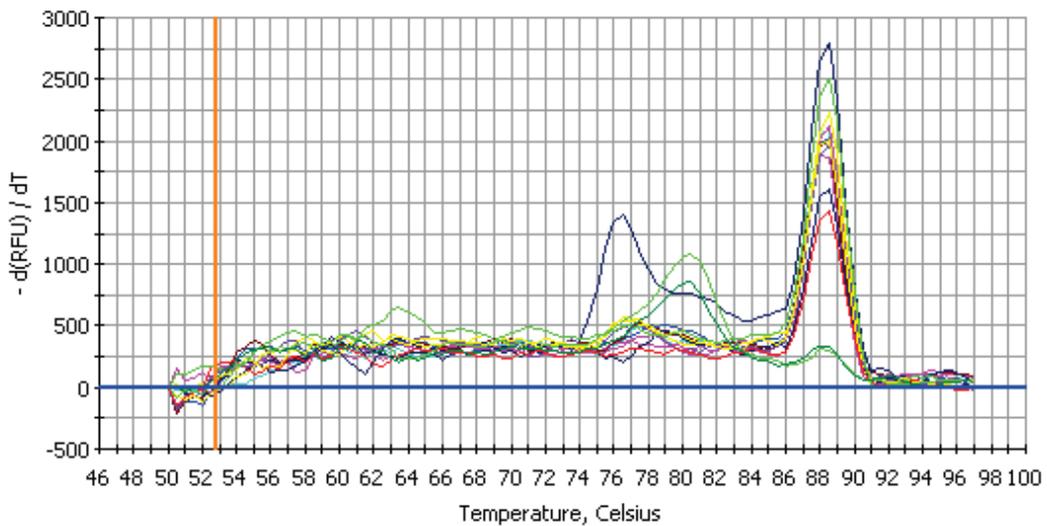
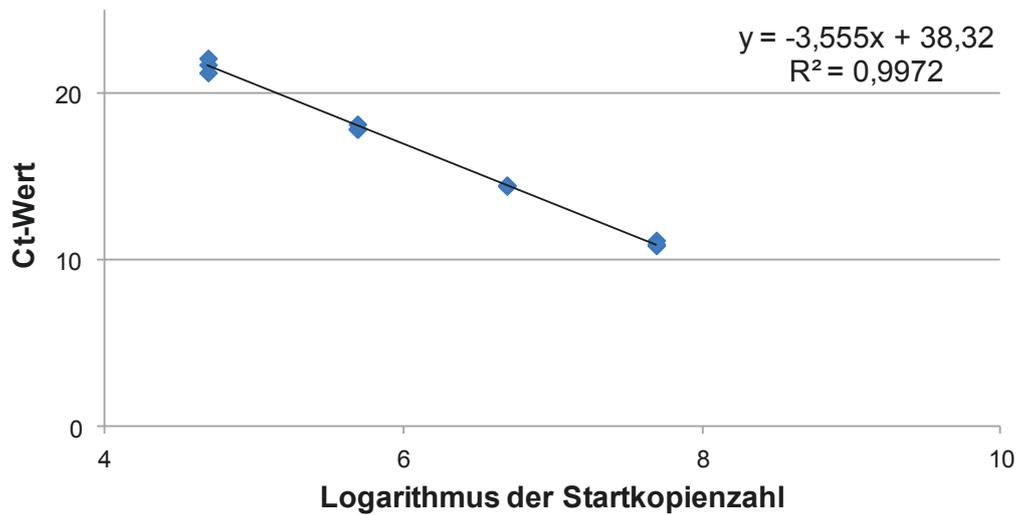
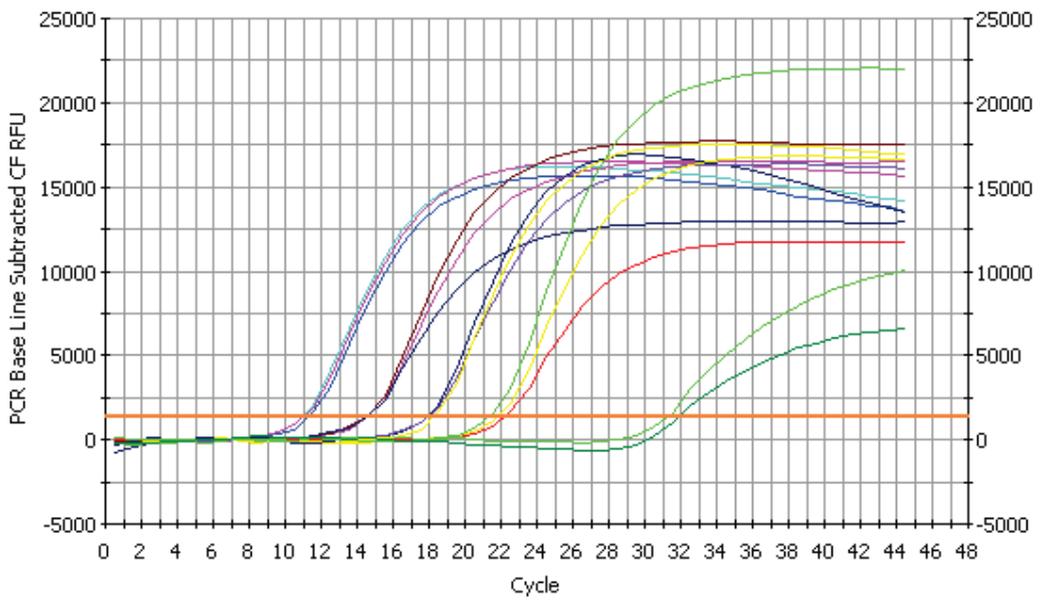


Abbildung 7.11: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von *Mollicutes* (AJB 101).

„Candidatus Cloacamonas sp.“ (AJB 104)

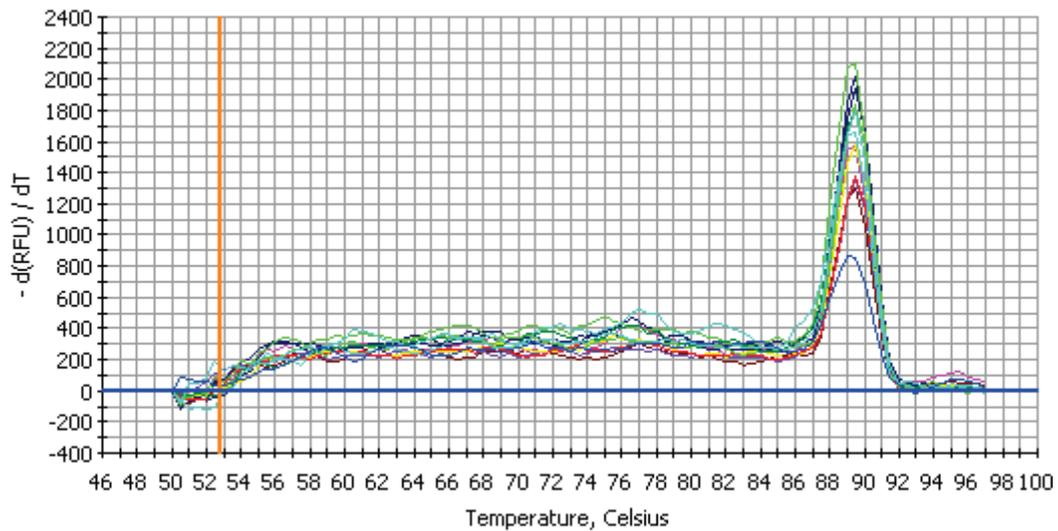
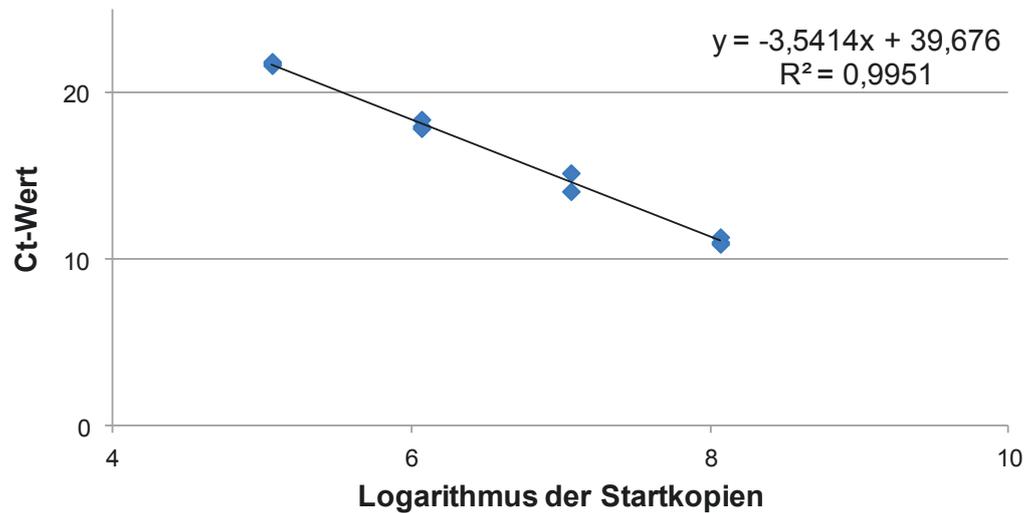
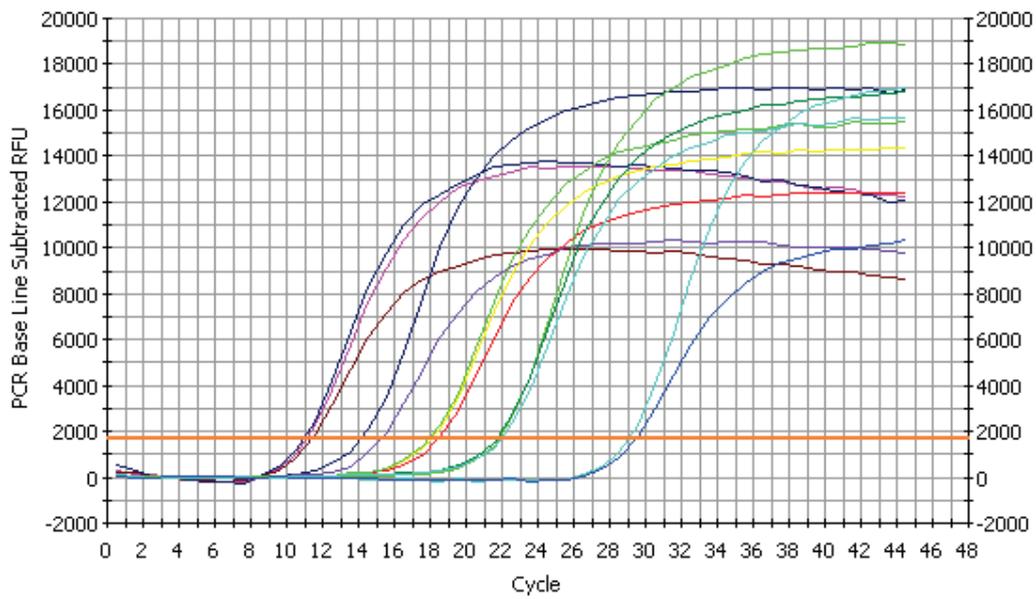


Abbildung 7.12: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von „Candidatus Cloacamonas sp.“ (AJB 104).

Bacteriodes (AJB 109)

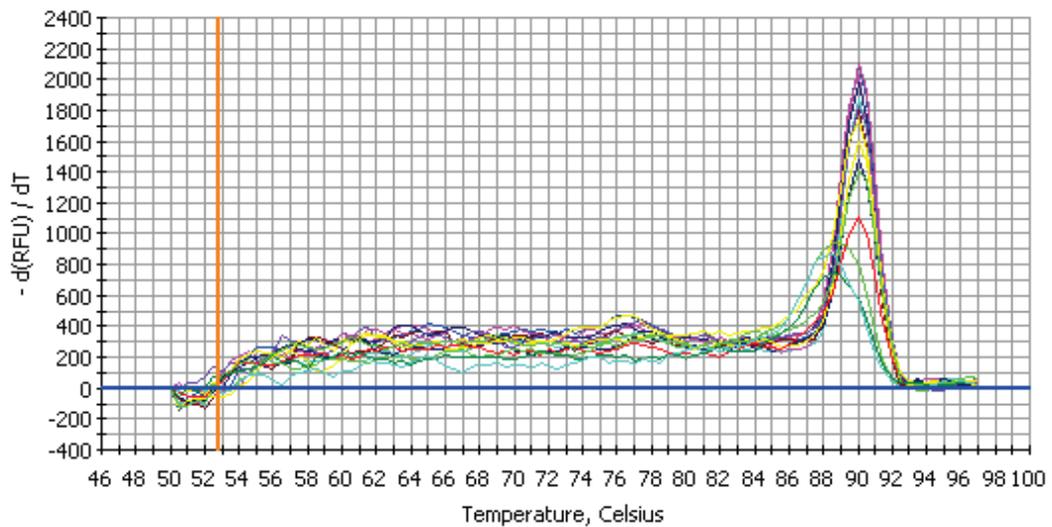
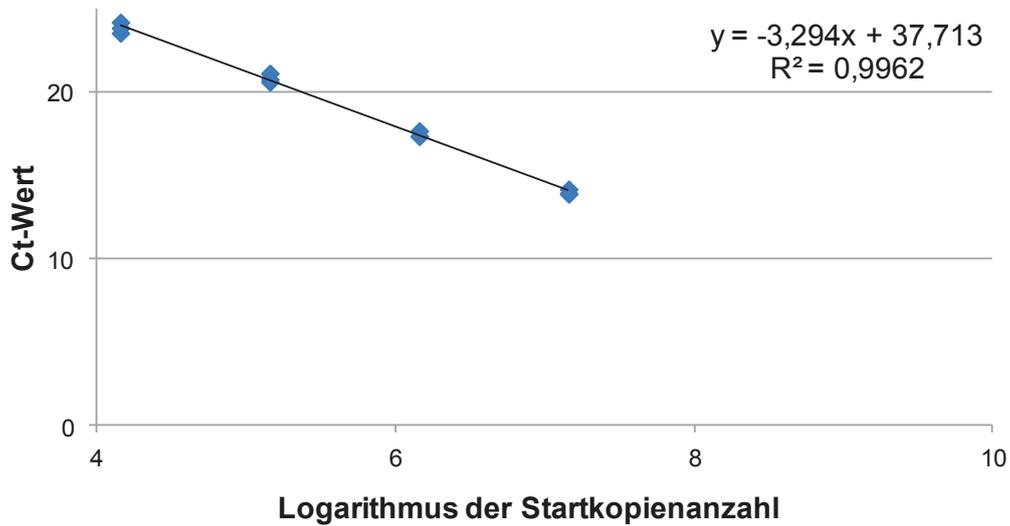
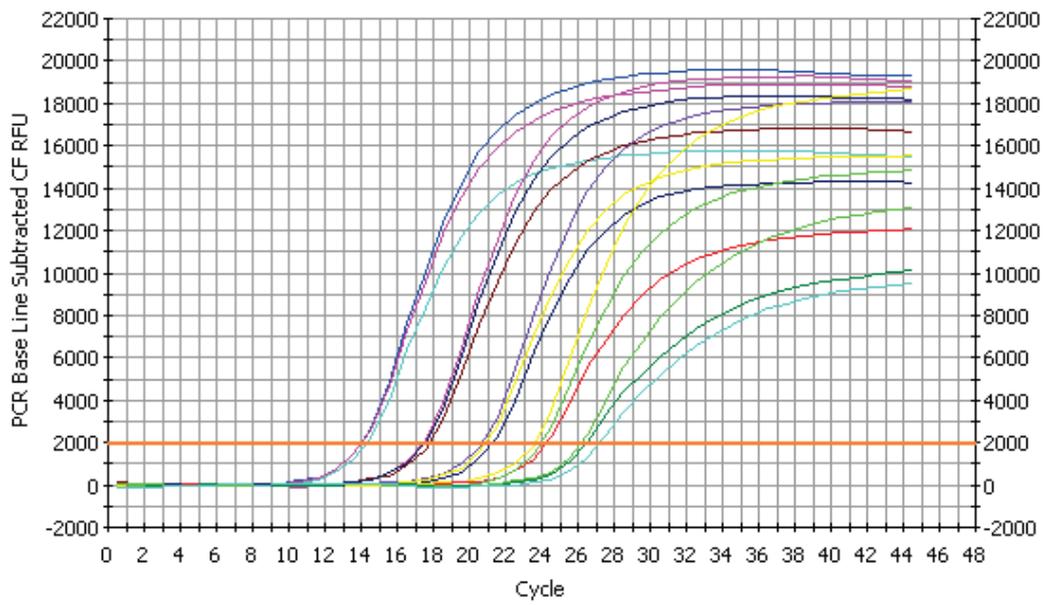


Abbildung 7.13: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Bacteriodes (AJB 109).

Bacterioidetes (AJB 110)

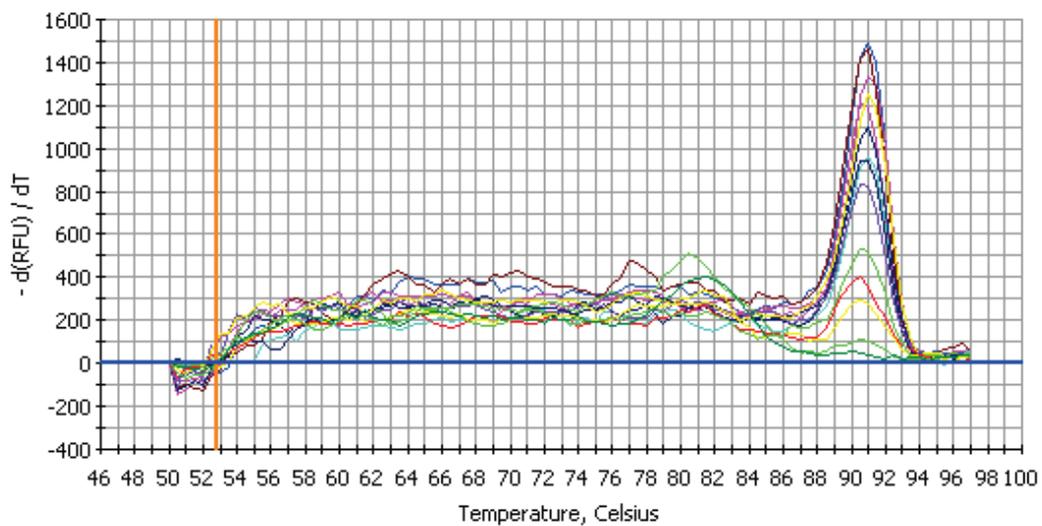
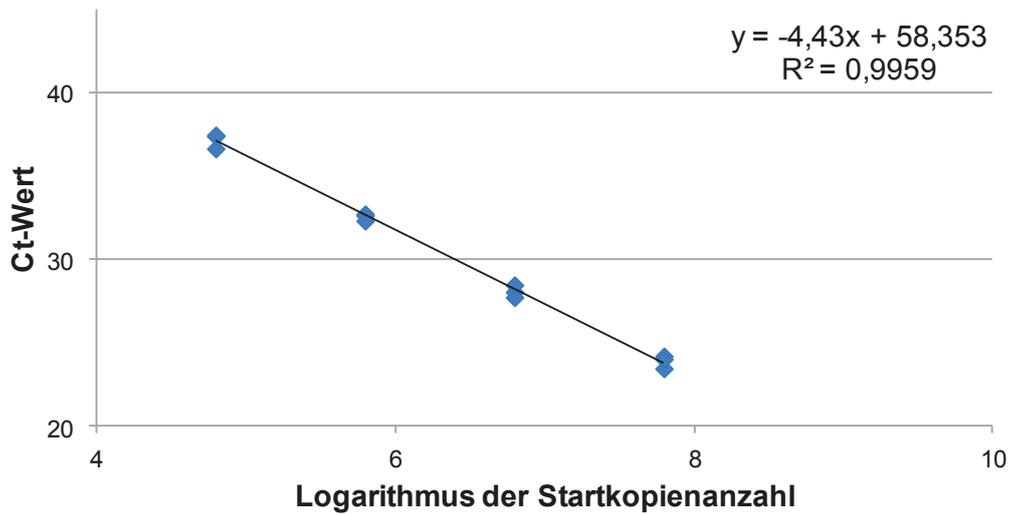
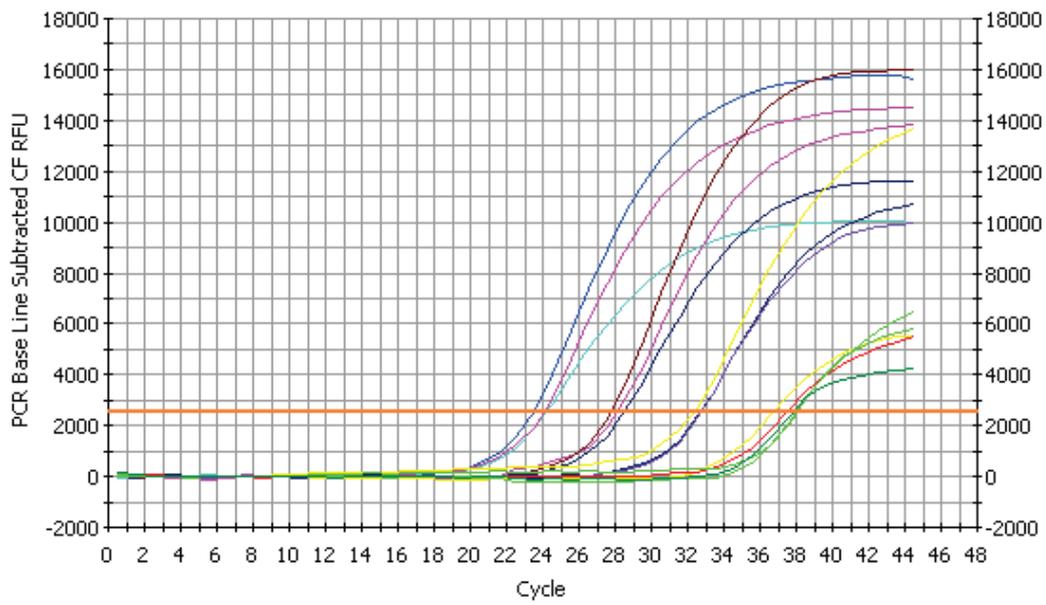


Abbildung 7.14: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Bacterioidetes (AJB 110).

Firmicutes sp. (AJB 114)

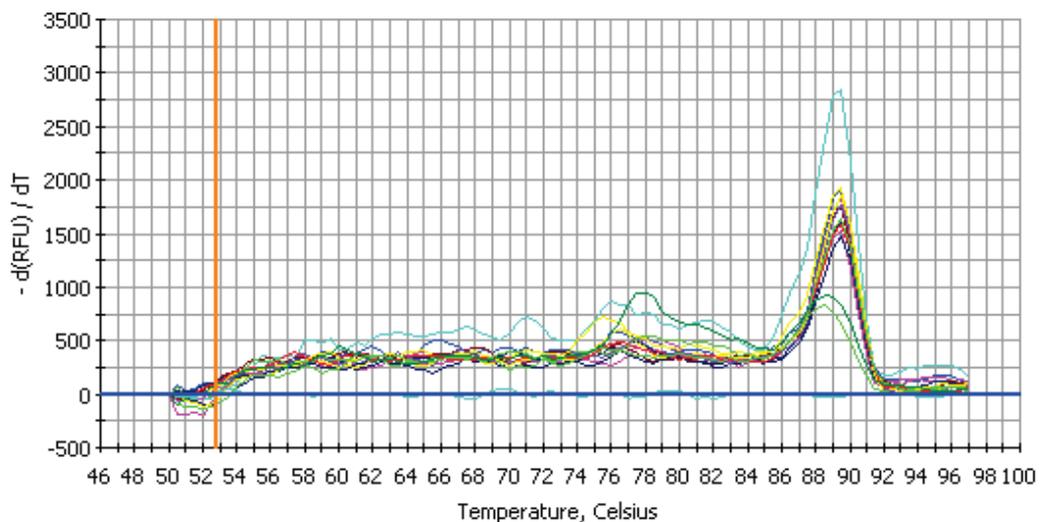
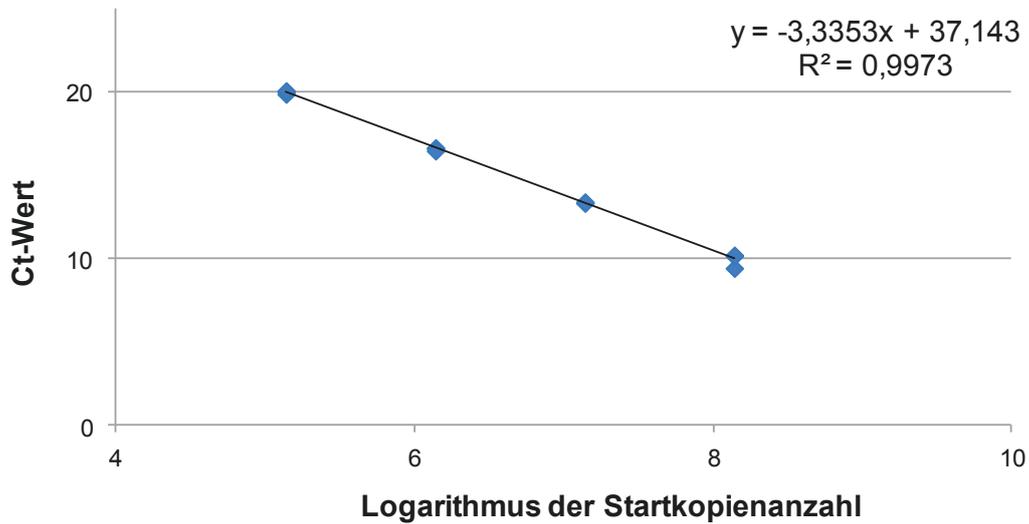
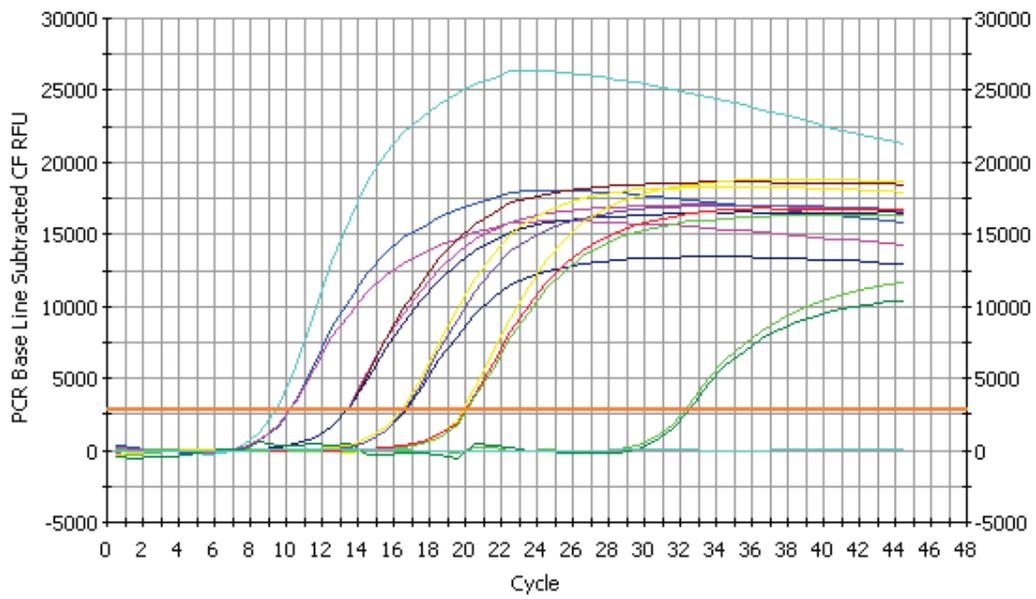


Abbildung 7.15: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von *Firmicutes* sp. (AJB 114).

Methanomicrobiales (AJA 1)

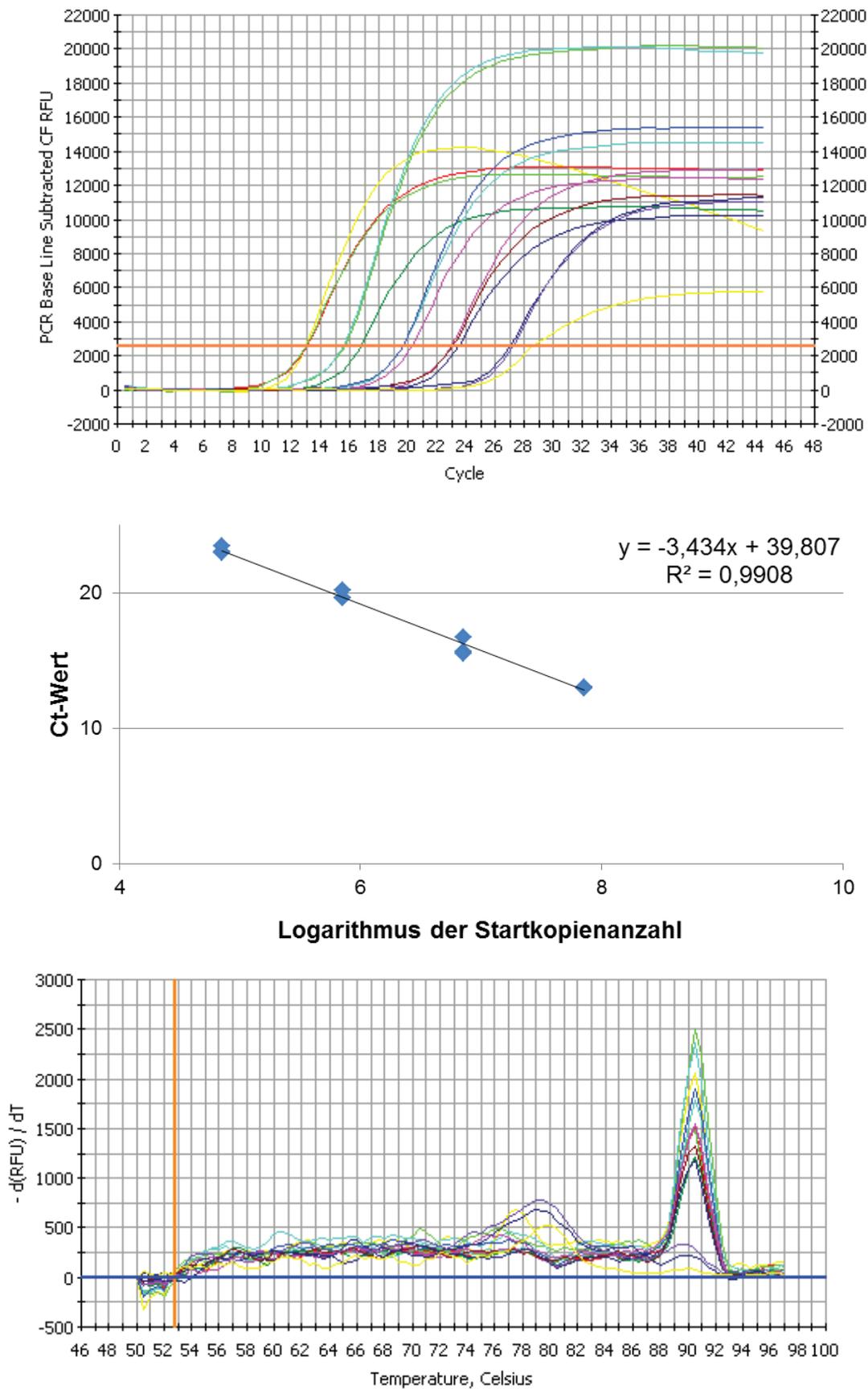


Abbildung 7.16: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Methanomicrobiales (AJA 1).

Crenarcheota (AJA 8-11)

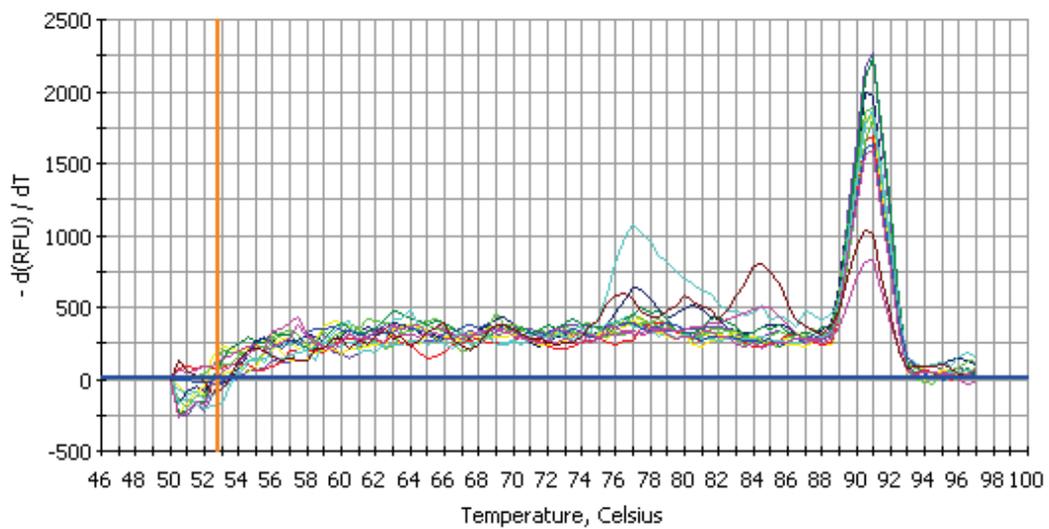
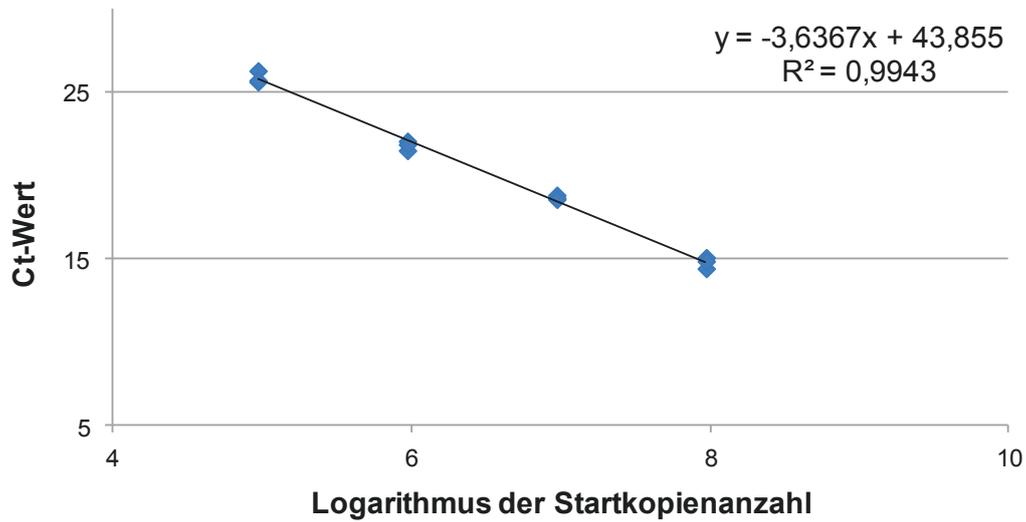
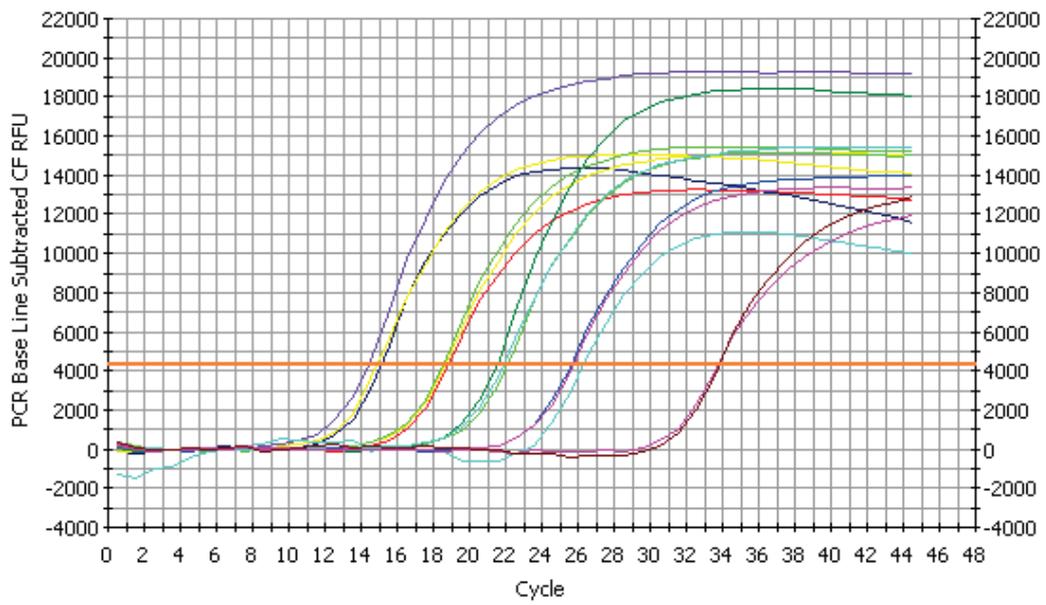


Abbildung 7.17: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Crenarchaeota (AJA 8-11).

Euryarcheota (AJA 12)

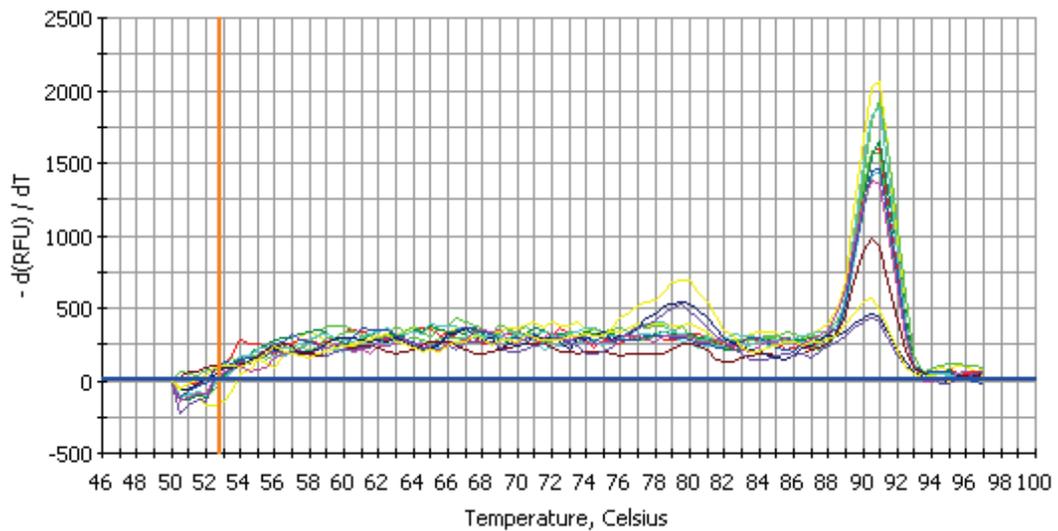
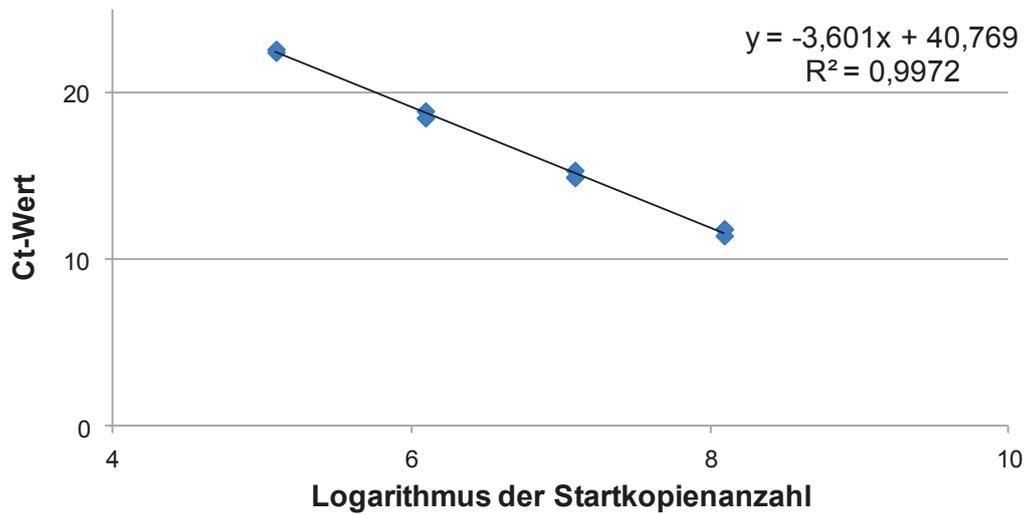
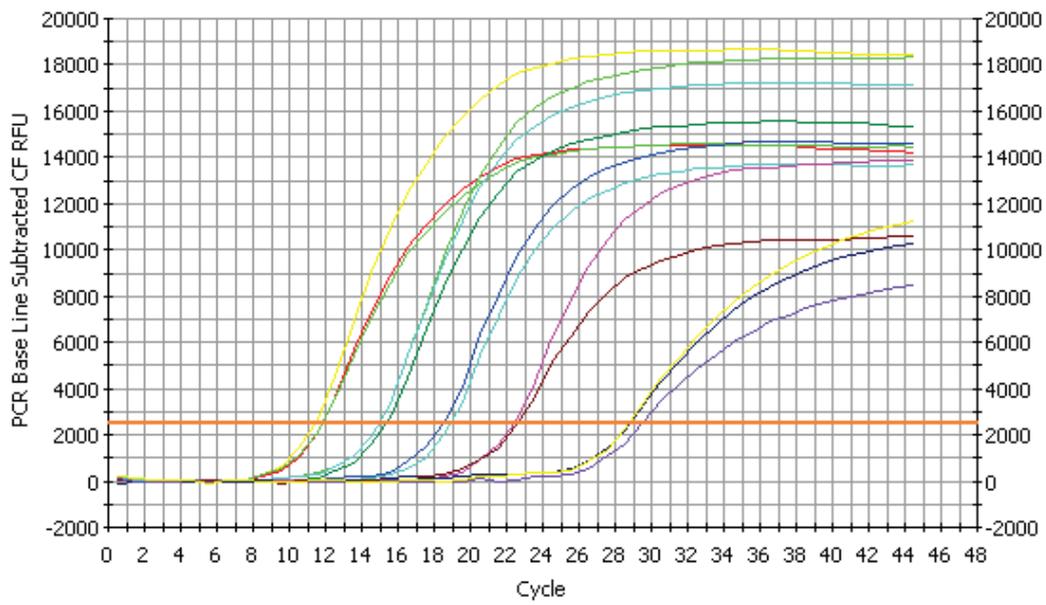


Abbildung 7.18: Standards, Standardgerade sowie die Schmelzkurve von Euryarcheota (AJA 12).

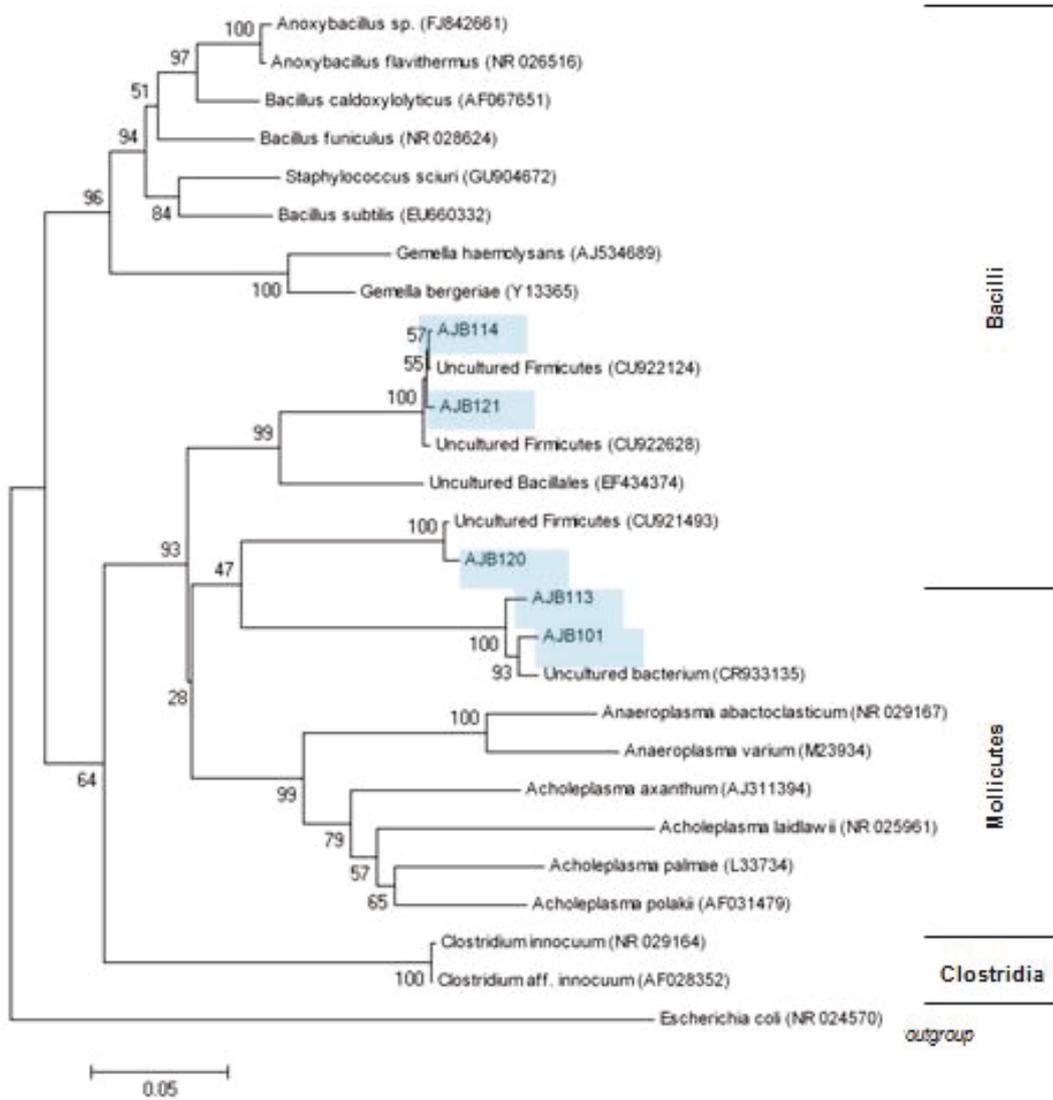


Abbildung 7.19: Phylogenetischer Stammbaums der Phylum Firmicutes, erstellt mit der neighbor-joining Methode und *E. coli* als outgroup.

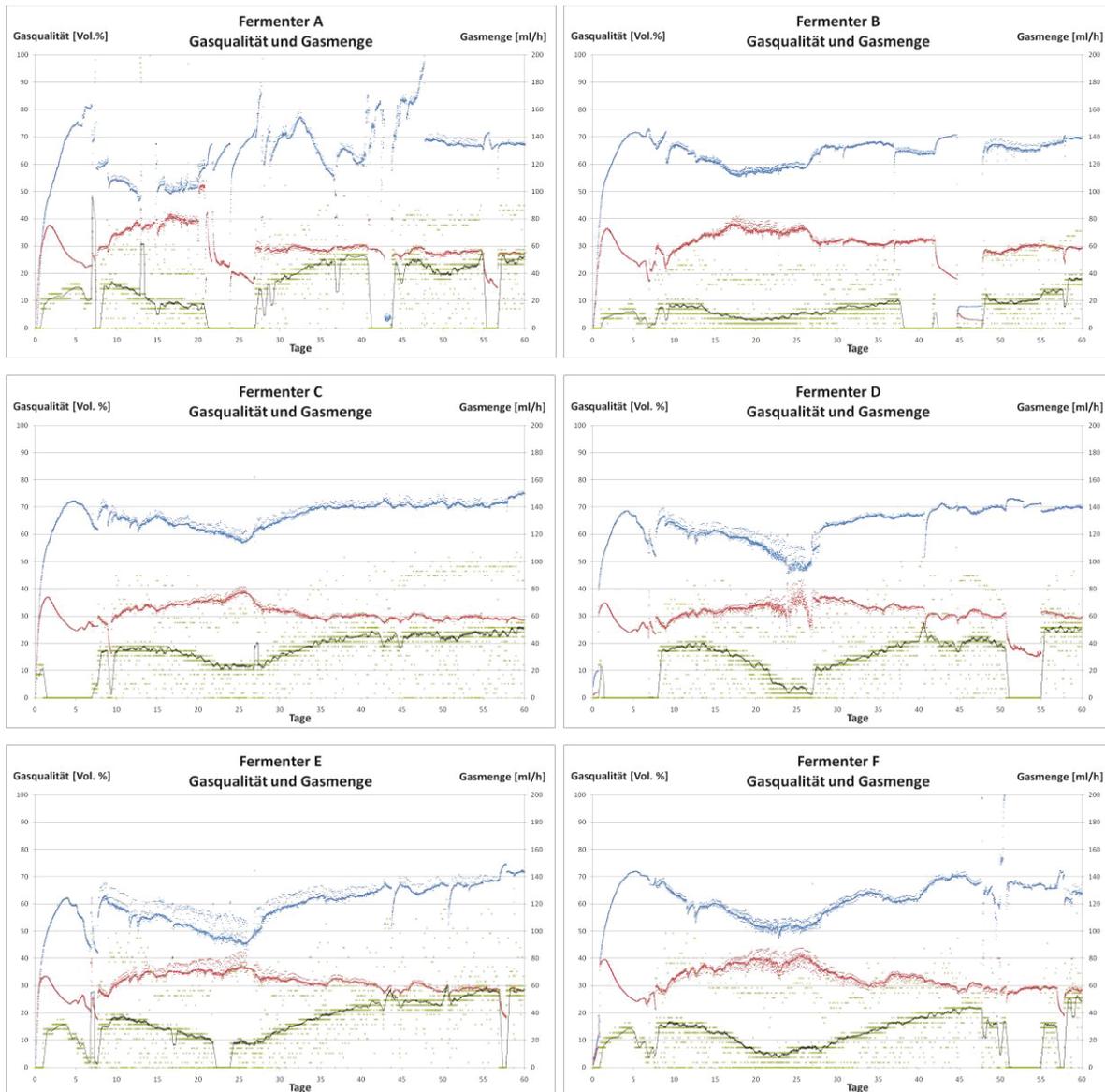


Abbildung 7.20: Vergleich bezüglich der Gaszusammensetzung (■ Methan, ■ CO₂) und der Gasmengen (■) der sechs identisch betriebenen Fermenter des Parallelfermentersystems.

Tabelle 7.10: Theoretische Gasausbeuten nach Baserga (1998).

Stoffklasse	Gasausbeute (L/kg oTS)	Methankonzentration (%)
Kohlenhydrate	790	50
Fette	1250	68
Proteine	700	71

Parameter Gasproduktion, Gasqualität, FS und Mikroorganismen des Kontrollfermenter über den Versuchszeitraum der punktuellen Zugaben.

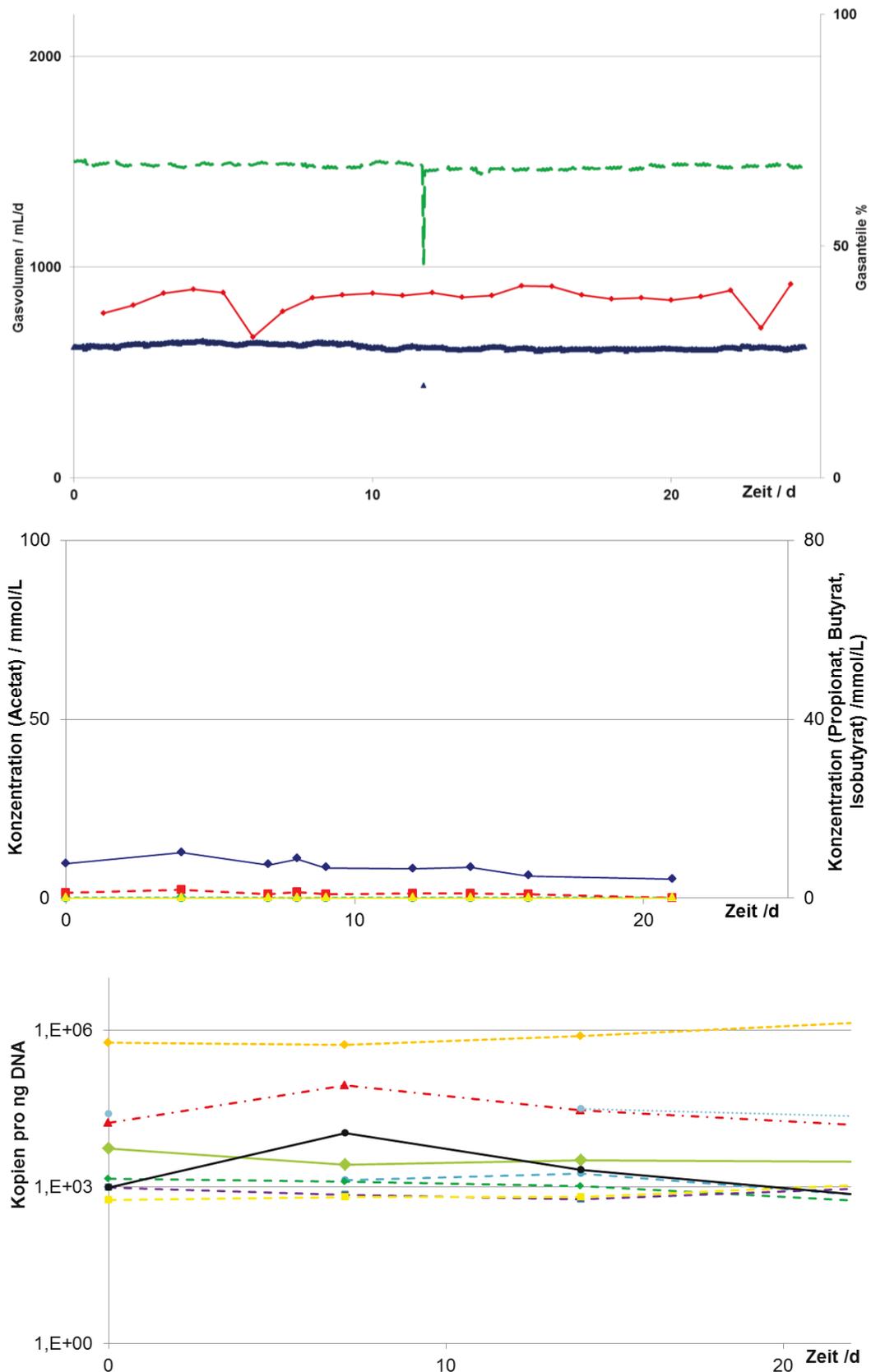


Abbildung 7.21: Darstellung der Gasmenge, Methan- und Kohlenstoffdioxidwerte (oben), der FS (mitte) und der Organismenentwicklung (unten) über den ersten Versuchszeitraum.

Parameter Gasproduktion, Gasqualität, FS und Mikroorganismen des Kontrollfermenter über den Versuchszeitraum der semikontinuierlichen Zugaben.

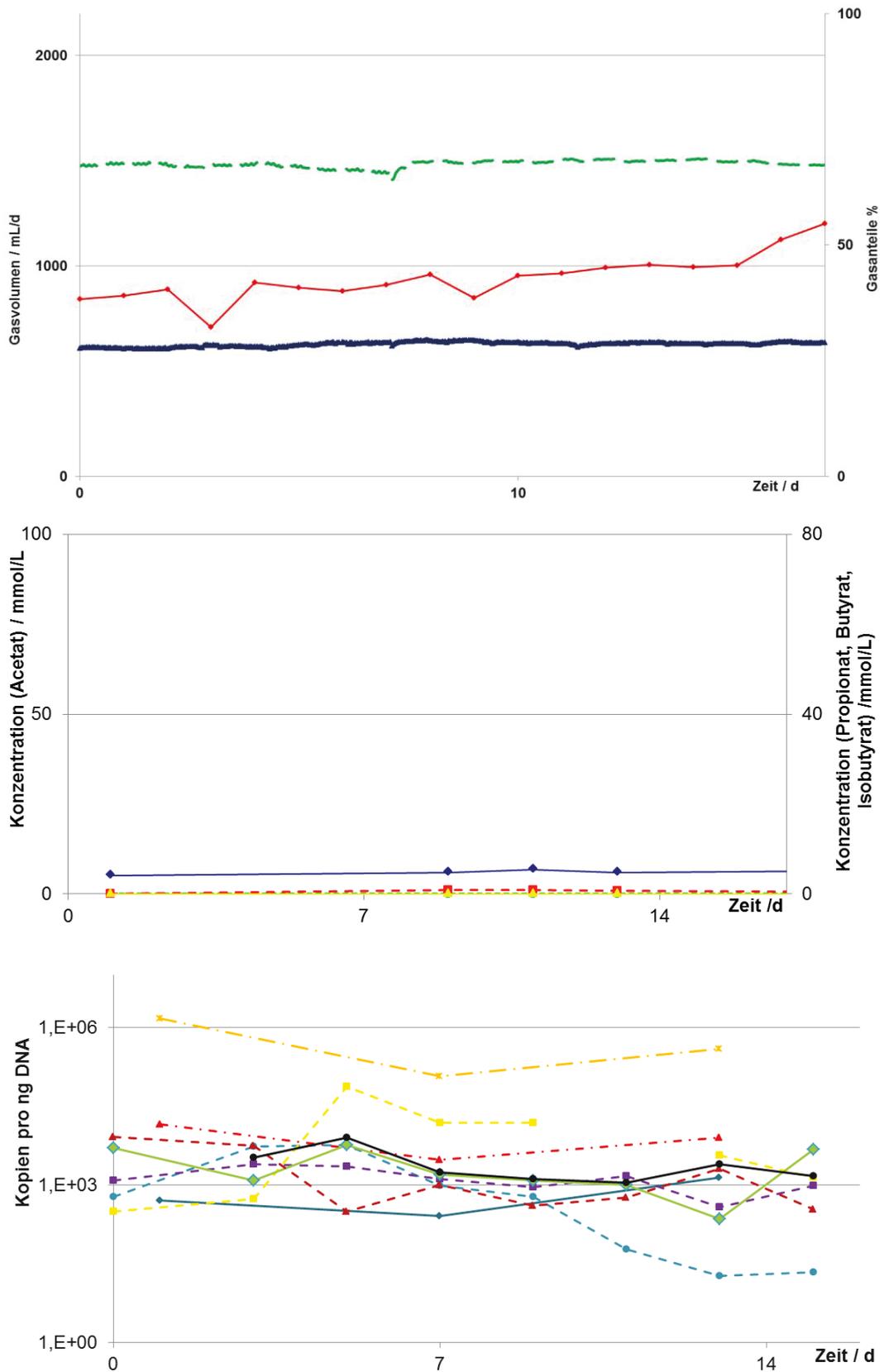


Abbildung 7.22: Darstellung der Gasmenge, Methan- und Kohlenstoffdioxidwerte (oben), der FS (mitte) und der Organismenentwicklung (unten) über den zweiten Versuchszeitraum.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet, und die den benutzen Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 22.08.2012

(Simone Groebel)

Publikationen

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Krumbel, C., Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Baumann, M.E.M., Keusgen, M., Schöning, M.J., (2012) Nutrient concentration-sensitive microorganism-based biosensor [Artikel] // *Physica Status Solidi A* 209 (5). - S. 1-5.

Groebel, S., Werner, C.F., Reimann, M., Jörres, N., Jansen, F., Schiffels, J., Sprenger, B., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., Selmer, T., (2011) Entwicklung einer Sensor-Überwachung für Biogasanlagen auf Basis von Prozessdaten einer Parallelanlage [Artikel] // 10. Dresdner Sensor-Symposium. - S. 81-84.

Werner, C.F., Krumbel, C., Schumacher, K., **Groebel, S.**, Spelthahn, H., Stellberg, M., Wagner, T., Yoshinobu, T., Selmer, T., Keusgen, M., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2011) Determination of the extracellular acidification of *Escherichia coli* by a light-addressable potentiometric sensor [Artikel] // *Physica Status Solidi A* 208 (6). - S. 1340–1344.

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Wagner, T., Yoshinobu, T., Selmer, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2011) Überwachung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen zur Kontrolle des biologischen Prozesses im Biogasfermenter [Artikel], 6. Fachtagung Biogas. – S. 285-286.

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Schumacher, K., Spelthahn, H., Wagner, Selmer, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2009) Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen während des Biogasbildungsprozesses [Artikel] // 9. Dresdner Sensor-Symposium. - S. 201-205.

Tagungsbeiträge

Groebel, S., Werner, C.F., Reimann, M., Jörres, N., Jansen, F., Schiffels, J., Sprenger, B., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., Selmer, T., (2011) Entwicklung einer Sensor-Überwachung für Biogasanlagen auf Basis von Prozessdaten einer Parallelanlage [Vortrag] // 10. Dresdner Sensor-Symposium. – Dresden.

Groebel, S., Werner, C.F., Schöning, M.J., Selmer, T., Baumann, M.E.M., (2011) Quantification of the dominance of microorganisms in the biogas process [Vortrag] // 4. Graduiertentagung der FH Aachen. – Aachen.

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Baumann, M.E.M., Keusgen, M., Schöning, M.J., (2011) Determination of Glukose concentration by means of a microorganism-based biosensor [Poster] // 4. Graduiertentagung der FH Aachen. – Aachen.

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Baumann, M.E.M., Keusgen, M., Schöning, M., (2011) Determination of nutrient concentration by means of a microorganism-based biosensor [Poster] // Engineering of Functional Interfaces. – Linz.

Groebel, S., Werner, C.F., Reimann, M., Jörres, N., Kasper, K., Sprenger, B., Schöning, M.J., Baumann, M.E.M., Selmer, T., (2011) Construction of a strictly controlled six parallel reactor device for analytical applications in biogas processes [Poster] // Engineering of Functional Interfaces. – Linz.

Werner, C.F., **Groebel, S.**, Wagner, T., Yoshinobu, T., Selmer, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2011) Überwachung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen zur Kontrolle des biologischen Prozesses im Biogasfermenter [Poster] // 6. Fachtagung Biogas. – Braunschweig.

Werner, C.F., Schusser, S., **Groebel, S.**, Spelthahn, H., Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Schöning, M.J., (2011) Ortsaufgelöste Bestimmung der Ansäuerung von Mikroorganismen mit geregelter Spot-/Pixelkorrektur [Poster] // 7. Deutsches BioSensor Symposium. - Heiligbad Heiligenstadt.

Groebel, S., Werner, C.F., Jülicher, A., Spelthahn, H., Sprenger, B., Schöning, M.J., Baumann, M.E.M., Selmer, T., (2011) Entwicklung einer Kontrollmethode für Biogasfermenter [Poster] // 20. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas e.V.. – Nürnberg.

Werner, C.F., Krumbel, C., **Groebel, S.**, Spelthahn, H., Wagner, T., Yoshinobu, T., Selmer, T., Keusgen, M., Schöning, M.J., (2010) On-line determination of the condition of microorganisms by a light-addressable potentiometric sensor [Poster] // 3. Graduiertentagung der FH Aachen. – Aachen.

Groebel, S., Werner, C.F., Spelthahn, H., Wagner, T., Sprenger, B., Schöning, M.J., Selmer, T., Baumann, M.E.M., (2010) Optimization of a biogas fermenter by detecting the metabolism of immobilized anaerobic microorganisms based on a LAPS [Poster] // 3. Graduiertentagung der FH Aachen. – Aachen.

Groebel, S., Werner, C.F., Jülicher, A., Spelthahn, H., Sprenger, B., Schöning, M.J., Baumann, M.E.M., Selmer, T., (2010) Entwicklung einer Kontrollmethode für Biogasfermenter [Poster] // 4. Rostocker Bioenergieforum. – Rostock.

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Spelthahn, H., Krumbel, C., Wagner, T., Yoshinabu, T., Selmer, T., Keusgen, M., Schöning, M.J., Schusser, S., (2010) Array-based light-addressable potentiometric sensor with integrated imaging correction mode [Poster] // International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies (EMNT) 2010.- Mandelieu la Napoule (Frankreich).

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Spelthahn, H., Wagner, T., Yoshinabu, T., Selmer, T., Keusgen, M., Schöning, M.J., (2010) On-line determination of the condition of microorganisms by a light-addressable potentiometric sensor [Poster] // Engineering of Functional Interfaces. – Rauschholzhausen.

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Schumacher, K., Spelthahn, H., Wagner, T., Selmer, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2009) Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen während des Biogasbildungsprozesses [Poster] // 9. Dresdner Sensor-Symposium. – Dresden.

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Spelthahn, H., Wagner, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2009) Bio-LAPS - Optimizing of the operation of a biogas fermenter by means of a field-effect biosensor based on a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) [Poster] // 2. Graduiertentagung der FH Aachen. – Jülich.

Groebel, S., Werner, C.F., Spelthahn, H., Wagner, T., Schöning, M.J., Selmer, T., Baumann, M.E.M., (2009) Bio-LAPS - Optimizing of the operation of a biogas fermenter by means of a field-effect biosensor based on a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) [Poster] // 2. Graduiertentagung der FH Aachen. – Jülich.

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Schumacher, K., Wagner, T., Stellberg, M., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2009) Biosensor to investigate the metabolic activity of acetogen bacteria [Poster] // Engineering of Functional Interfaces. - Hasselt (Belgien).

Groebel, S., Werner, C.F., Küppers, C., Mäder, N., Reimann, M., Thönnessen, V., Schumacher, K., Spelthahn, H., Wagner, T., Schöning, M.J., Baumann, M.E.M., (2009) Entwicklung eines LAP-Sensors für Biogasfermenter [Poster] // 5. VDI Fachtagung Biogas. – Stuttgart.

Werner, C.F., **Groebel, S.,** Spelthahn, H., Wagner, T., Baumann, M.E.M., Schöning, M.J., (2009) Lichtadressierbarer potentiometrischer Sensor zur Überwachung von Biogasanlagen [Poster] // 6. Deutsches BioSensor Symposium. – Freiburg.