



## Abschlussbericht zum Verbundprojekt

### Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozeßsicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung

Förderkennzeichen: 22004007 Johannes Gutenberg- Universität Mainz  
22003008 Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V.

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2008 – 31.03.2011

Berichtsverfasser: Prof. Dr. Helmut König  
Dipl. Biol. Kerstin Seyfarth  
Dr. Stefan Dröge

Im Auftrag der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Ziele</b>	<b>8</b>
I.1	Aufgabenstellung	8
I.2	Planung und Ablauf des Vorhabens	8
I.3	Stand der Wissenschaft und Technik	9
I.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
I.5	Zusammenfassung	10
<b>II</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>12</b>
II.1	Isolierung und Charakterisierung Propionsäure-abbauender Bakterien	12
II.1.1	Untersuchte Praxisbiogasanlagen	12
II.1.2	Medien und Wachstumssubstrate Propionsäure-abbauender Bakterien	12
II.1.3	Zellzahlen kultivierbarer Propionsäure-abbauender Bakterien	15
II.1.4	Gewinnung stabiler Mischkulturen und physiologische Charakterisierung der syntrophen Konsortien	16
II.1.5	Stammidentifizierung der syntrophen Konsortien	19
II.2	Isolierung und Charakterisierung von Wasserstoff-verwertenden Prokaryoten	21
II.2.1	Medien und Wachstumssubstrate methanogener Archaea	21
II.2.2	Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung methanogener Archaea	23
II.2.3	Anreicherung und Isolierung Wasserstoff-verwertender Sulfatreduzierer	28
II.3	Isolierung und Charakterisierung Propionsäure-bildender Bakterien	28
II.3.1	Untersuchte Praxisbiogasanlagen	28
II.3.2	Medien und Wachstumssubstrate hydrolytischer Organismen	29
II.3.3	Zellzahlen kultivierbarer hydrolytischer säurebildender Bakterien	32
II.3.4	Isolierung und Charakterisierung hydrolytischer säurebildender Bakterien	36
II.4	Testen von Starterkulturen im Labormaßstab	38
II.4.1	Medien zur Ermittlung des mikrobiellen Abbaus von Propionsäure	40

II.4.2	Messung des Abbaus von Propionsäure durch Mikroorganismen	40
II.5	Testen von Starterkulturen in Versuchsfermentern	45
II.5.1	Versuchsreihe 1 – Zugabe nach erfolgter Säurebildung	45
II.5.2	Versuchsreihe 2 – Zugabe vor Säurebildung	50
II.6	Entwicklung von Sondenkits und PCR-Methoden	52
II.6.1	Charakterisierung des Substratverhaltens Propionsäure-abbauender Starterkulturen aus Biogasanlagen mit Fumarat	53
II.6.2	Stammidentifizierung Propionsäure-abbauender Bakterien	64
II.6.3	Substratverhalten einiger Typstämme aus den Propionsäure-abbauenden Kulturen	70
II.7	Verwertung der Ergebnisse	73
II.8	Erkenntnisse von Dritten	74
II.9	Veröffentlichungen	75
<b>III</b>	<b>Literatur</b>	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MPN-Zahlen Propionsäure-abbauender Bakterien in 4 verschiedenen Biogasanlagen. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Wagner; BGA 4 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1). .....	16
Abbildung 2: Entwicklung der Propionsäure- und Essigsäurekonzentration im Verlauf der Inkubation der syntrophen Mischkulturen Wp1 und Gp1. ....	17
Abbildung 3: Chromatogramm der Gasphase der Kultur Ap1 nach 21 d Inkubation (GC-TCD). Kohlendioxid ~14 % (v/v), Stickstoff ~55 % (v/v), Methan ~30 % (v/v), Wasserstoff ~100 ppm. ....	18
Abbildung 4: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Reaktorfiltrats (RF) auf den Abbau von Propionsäure bei Kultur Ap1. ....	19
Abbildung 5: MPN-Zahlen säurebildender Bakterien in 3 verschiedenen Biogasanlagen mit verschiedenen C-Quellen. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1). ....	33
Abbildung 6: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Stärke als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1). ....	34
Abbildung 7: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Xylan als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1). ....	35
Abbildung 8: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Lactat als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1). ....	36
Abbildung 10: Abbau von Propionsäure [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] durch Mischkulturen Gp1 ( $\diamond$ ), Gp1+ <i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1 (TAF1; $\square$ ), Gp1+TAF1W2 (W2 entspricht Zugabe von <i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1 nach zwei Wochen Inkubation; $\Delta$ ) und TAF1 in PI-Medium als Negativkontrolle; x. ....	43
Abbildung 11: Wöchentlicher Propionsäureabbau in $\Delta \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ der Kultur Gp1 (schwarz), Gp1 + TAF1 (hellgrau), Gp1 + TAF1W2 (dunkelgrau) und TAF1 als Negativkontrolle (weiß) .....	44
Abbildung 12: Durchfluss-Biogasfermenter im 100 l Maßstab. ....	46
Abbildung 13: Gasproduktion der Reaktoren FA und FB während der Anfahr- und Stabilisierungsphase (Versuchsansatz 1). ....	48

Abbildung 14: Entwicklung der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen der Reaktoren FA und FB während der Belastungsphase (Versuchsansatz 1). Pfeile markieren die Zugabe von jeweils 10 ml der Kultur AP1 zu Reaktor FB. ....	49
Abbildung 15: Gasproduktion der Reaktoren FA und FB während der Anfahr- und Stabilisierungsphase (Versuchsansatz 2).....	51
Abbildung 16: Entwicklung der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen der Reaktoren FA und FB während der Belastungsphase (Versuchsansatz 2). Pfeile markieren die Zugabe von jeweils 10 mL der Kultur AP1 zu Reaktor FB. ....	52
Abbildung 17: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gegen die Zeit [7d] der Kultur Fp1a, mit Zusatz von $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Fumarat im Medium; Zeichen: Gehalt von $\square$ = Acetat, $\diamond$ = Succinat, $\Delta$ = Fumarat, $\circ$ = Propionat im zellfreien Kulturmedium.....	56
Abbildung 18: Zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Fp1a gegen die Zeit [7d]; grau = Acetatumsatz, weiß = Succinatumsatz, hellgrau = Fumarat-umsatz, schwarz = Propionsäureumsatz .....	57
Abbildung 19: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gegen die Zeit [7d] der Kultur Gp1a, mit Zusatz von $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Fumarat im Medium; Zeichen: Gehalt von $\square$ = Acetat, $\diamond$ = Succinat, $\Delta$ = Fumarat, $\circ$ = Propionat im zellfreien Kulturmedium.....	59
Abbildung 20: Zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Gp1b gegen die Zeit [7d]; grau = Acetatumsatz, weiß = Succinatumsatz, hellgrau = Fumarat-umsatz, schwarz = Propionsäureumsatz .....	60
Abbildung 21: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] gegen die Zeit in Wochen [7d] der Kultur Ap1a mit Zusatz von $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Fumarat, und $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BrES; Zeichen: Gehalt von $\square$ = Acetat, $\diamond$ = Succinat, $\Delta$ = Fumarat, $\circ$ = Propionat im zellfreien Kulturmedium .....	62
Abbildung 22: Zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Ap1a gegen die Zeit [7d]; grau = Acetatumsatz, weiß = Succinatumsatz, hellgrau = Fumarat-umsatz, schwarz = Propionsäureumsatz .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anlagenparameter der untersuchten Biogasanlagen.....	12
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Medien PI. ....	13
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Spurenelementlösung. ....	14
Tabelle 4:	Zusammensetzung der Vitaminlösung. ....	14
Tabelle 5:	Verwendete synthetische Oligonukleotide.....	19
Tabelle 6:	Identifizierte Mikroorganismen in den syntrophen Konsortien auf Basis der 16S rDNA. ....	20
Tabelle 7:	Modifiziertes DSMZ-Medium 287 für Wasserstoff verwertende methanogene Archaea: .....	22
Tabelle 8:	Modifiziertes DSMZ-Medium 318 für Methanol verwertende methanogene Archaea: .....	23
Tabelle 9:	Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung der 16S rDNA methanogener Archaea .....	24
Tabelle 10:	Reaktionsbedingungen einer PCR mit archaealer 16S-rDNA.....	24
Tabelle 11:	Charakteristische Eigenschaften von Kulturen methanogener Archaea aus Biogasanlagen und Laborfermentern .....	26
Tabelle 12:	Anlagenparameter der untersuchten Biogasanlagen.....	29
Tabelle 13:	Zusammensetzung des Mediums PB_I.....	30
Tabelle 14:	Energie- und Kohlenstoffquellen für die MPN-Serien. ....	30
Tabelle 15:	Zusammensetzung der Spurenelementlösung. ....	31
Tabelle 16:	Zusammensetzung der Vitaminlösung. ....	32
Tabelle 17:	Nächste verwandte Spezies von Kultur S-F8A auf Basis der 16S rDNA. ....	38
Tabelle 18:	GC-Bestandteile für die Messung des Methangehalts in der Gasphase über methanogenen Kulturen.....	39
Tabelle 19:	Methanproduktionsraten und Methananreicherungsmaxima mit Zeitpunkten hydrogenotropher methanogener Kulturen.....	39
Tabelle 20:	HPLC-Bestandteile zur Messung des Propionsäureabbaus durch Mikroorganismen.....	40
Tabelle 21:	Programmablauf zur Messung des Propionsäuregehalts im Medium PI.....	41
Tabelle 22:	Verlauf des Propionsäuregehalts [mmol · L <sup>-1</sup> ] in PI-Medium beim pft mit der syntrophen Mischkultur Gp1 ohne, beziehungsweise mit <i>Methanobacterium formicum</i> Stamm TAF1 (kurz: TAF1) und TAF1 als Negativkontrolle.....	42
Tabelle 23:	Chemische Charakterisierung der Einsatzstoffe (Versuchsansatz 1). ....	46
Tabelle 24:	Parameter zur Überprüfung der Prozessstabilität.....	47

Tabelle 25:	Chemische Charakterisierung der Einsatzstoffe (Versuchsansatz 2). ....	50
Tabelle 26:	Anlagen-Komponenten des HPLC-Systems (Shimadzu, Japan):.....	53
Tabelle 27:	Programmablauf zur RI Messung des Propionsäuregehalts im Medium PI..	54
Tabelle 28:	Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Fp1a in [mmol · L <sup>-1</sup> ] .....	55
Tabelle 29:	Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Gp1a in [mmol·L <sup>-1</sup> ]......	58
Tabelle 30:	Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Ap1a in [mmol·L <sup>-1</sup> ].....	61
Tabelle 31:	Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung bakterieller 16S-rDNA .....	64
Tabelle 32:	Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA.....	65
Tabelle 33:	Ergebnisse der 16-rDNA-Analyse der effektivsten Propionsäure-abbauenden Kulturen in PI-Medium .....	66
Tabelle 34:	Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Fp1a in DSMZ-Medium 1264, DSMZ- Medium 520 und DSMZ-Medium 63 ohne Laktat .....	67
Tabelle 35:	Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Wp2a in DSMZ-Medium 1264 und DSMZ- Medium 63 ohne Laktat .....	68
Tabelle 36:	Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Gp1b in DSMZ-Medium 1264 und DSMZ- Medium 63 ohne Laktat .....	69
Tabelle 38:	Kombinationstests von bakteriellen Typstämmen und methanogenen Eigenisolaten in PI-Medium .....	72

# I Ziele

## I.1 Aufgabenstellung

Während der anaeroben Fermentation von Biomasse in Biogasanlagen entstehen als zentrale Zwischenprodukte verschiedene kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Essigsäure und Propionsäure. Die gebildete Essigsäure dient den methanogenen Bakterien als Substrat und kann direkt zu Methan und Kohlendioxid abgebaut werden. Dagegen ist der anaerobe Abbau von Propionsäure komplex und endergon. Der Abbau kann nur unter Energiegewinnung ablaufen, wenn der Partialdruck des gebildeten Wasserstoffs durch z. B. methanogene Bakterien (*Archaea*) niedrig (ca.  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  atm) gehalten wird. Deshalb ist für den anaeroben Abbau von Propionsäure eine gekoppelte, syntrophe Reaktion, an der Propionsäure-abbauende und methanogene Bakterien beteiligt sind, notwendig. Wegen der pH-Absenkung infolge von übermäßiger Säureakkumulation werden die Methanbakterien und damit die Methanogenese unter einem pH-Wert von 6,5 gehemmt. Dementsprechend führen erhöhte Konzentrationen von Propionsäure zu einer signifikanten Reduktion der Gasausbeute. Es ist bekannt, daß ein Überangebot an leicht vergärbaren Substraten zu einer Säureakkumulation führt. Welche Faktoren die Fermentation in Richtung einer verstärkten Propionsäurebildung treiben, ist allerdings bislang weitgehend ungeklärt. Ebenso wenig ist bei Biogasanlagen bekannt, welche speziellen Bakterienarten hier dafür verantwortlich sind.

Deshalb war eine Früherkennung und Vermeidung bzw. Verminderung einer Fehlgärung und damit eines wirtschaftlichen Schadens das zentrale Ziel des geplanten Projektes. Hierzu sollten wir die verfahrenstechnischen und mikrobiellen Ursachen für diese Fehlgärungen analysiert und spezifische Sonden zur Identifizierung und Quantifizierung von Propionsäure-bildenden und -abbauenden Bakterien zur Früherkennung von Fehlgärungen entwickelt werden. Ein weiteres zentrales Ziel des Vorhabens war die Entwicklung von Starterkulturen, um gezielt die überschüssige Propionsäure abzubauen. Damit könnten gestörte Anlagen nach kurzer Zeit wieder in Betrieb gehen können und die Verluste für die Betreiber minimiert werden.

## I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Ablauf des Vorhabens orientierte sich an der Arbeitsplanung des Projektantrages. In diesem Rahmen waren 7 verschiedene Arbeitspakete definiert, die im Verlauf des Vorhabens intensiv bearbeitet wurden. In der ersten Phase des Projektes stand hierbei die Isolierung und Charakterisierung verschiedener mikrobieller Gruppen im Vordergrund. Diese



Arbeitspakete umfassten Propionsäure-abbauende Bakterien, Wasserstoff-verwertende Prokaryonten und Propionsäure-bildende Bakterien.

In der zweiten Phase erfolgte Untersuchungen zum Einsatz der gewonnenen Kulturen als Starterkulturen im Labor- und Technikumsmaßstab. Parallel hierzu erfolgten Arbeiten zur Entwicklung von Sondenkits und PCR-Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Mikroorganismen. In der letzten Phase des Projektes war ein Einsatz der gewonnenen Kulturen im Praxismaßstab vorgesehen.

Im Rahmen der Projektlaufzeit konnten einzelne Arbeiten nicht im vollen Umfang abgeschlossen werden. So konnten aufgrund von Schwierigkeiten bei der Kultivierung und einer komplexen Begleitflora keine Reinkulturen der Milchsäure-abbauenden Bakterien gewonnen werden. Weiterhin konnten die Arbeiten zur Entwicklung von Sondenkits noch nicht vollständig abgeschlossen werden. Aufgrund von verfahrenstechnischen Problemen waren Tests der gewonnenen Kulturen in Praxisanlagen nicht durchführbar.

### **I.3 Stand der Wissenschaft und Technik**

Eine Vielzahl von Bakterien bildet Propionsäure als Haupt- oder Nebenprodukt bei verschiedenen Fermentationen. Es handelt sich hierbei überwiegend um strikt anaerobe bzw. fakultativ anaerobe grampositive Bakterien. Ein typischer Lebensraum dieser Organismen ist der Pansen von Wiederkäuern, wo sie an der Bildung von flüchtigen Fettsäuren, insbesondere Buttersäure, Propionsäure und Essigsäure beteiligt sind. Die meisten charakterisierten Arten Propionsäure-bildender Bakterien lassen sich der Gattung *Propionibacterium* zuordnen. Vertreter dieser Gattung können eine Reihe unterschiedlicher Substrate, darunter Glucose, Saccharose und Pentosen sowie Lactat, Malat, und Glycerin unter Bildung von Propionat vergären. Als Nebenprodukte dieser auch als Propionsäuregärung bezeichneten Fermentationen entstehen typischerweise Acetat und CO<sub>2</sub>. Neben den Propionibakterien sind es vor allen Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Selenomonas*, die Propionsäure ausscheiden.

Der Abbau von Propionsäure unter anaeroben Bedingungen ist aufgrund der Energetik der Propionsäureoxidation nur durch syntrophe Mischkulturen möglich, da die möglichen mikrobiellen anaeroben Abbauege unter Standardbedingungen endergon sind. Daher benötigt der Propionsäuregärer einen Partner, der den anfallenden Wasserstoff aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt und so den Wasserstoffpartialdruck senkt. Die gekoppelte syntrophe Reaktion unter Beteiligung von wasserstoffverbrauchenden methanogenen Bakterien wird so in der Summe exergon. Dementsprechend sind syntrophe Bakterien z. B. der Gattungen *Syntrophomonas* und *Syntrophobacter* auf Substraten wie Buttersäure oder Propionsäure nicht in Reinkultur zu halten, sondern nur in Mischkulturen mit methanogenen oder sulfat-reduzierenden Bakterien.

Während der mikrobiellen Fermentation der organischen Substrate in Biogasanlagen treten als Zwischenprodukte verschiedene Fettsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen auf. Mengenmäßig vorherrschend sind hierbei die Essigsäure und die Propionsäure, während Buttersäure und Valeriansäure typischerweise in vergleichsweise geringen Konzentrationen vorliegen. Im Hinblick auf eine stabile und störungsfreie Gasproduktion sollte das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure möglichst  $\geq 2$  sein. Ein Problem, das bei Biogasanlagen immer wieder vorkommt, ist eine plötzlich auftretende Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten der Propionsäure, wobei die eigentlichen Ursachen hierfür ungeklärt sind. Nachfolgend beobachtet man häufig, dass die Propionsäure nur noch im geringen Maße oder auch gar nicht mehr abgebaut wird und dementsprechend stark akkumuliert. Hierbei werden oft Konzentrationen von mehr als 5 g/l erreicht werden.

#### **I.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Im Verlauf des Projektes bestand eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe M. Klocke des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Abteilung Bioverfahrenstechnik, Potsdam-Bornim (ATB). Diese Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Identifizierung von Mikroorganismen in Biogasanlagen und Laborfermentern auf molekularbiologischem Weg (Klocke *et al.*, 2007, 2009, Nettmann *et al.* 2010). Im Rahmen des Projektes wurden Proben aus vier Laborfermentern der Arbeitsgruppe Klocke untersucht, um methanogene Archaea zu kultivieren. Als Ergebnis der Kooperation ist eine gemeinsame Veröffentlichung in einem Fachjournal mit dem Titel „*Culturable methanogenic microbiota from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants and lab-scale biogas fermenters*“ in Arbeit (vergl. Anlage).

#### **I.5 Zusammenfassung**

Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse erbrachten wesentliche neue Erkenntnisse über die mikrobiellen Interaktionen und Organismen, welche an der Bildung und dem Abbau von organischen Säuren im Biogasprozess beteiligt sind. Im Rahmen von umfangreichen Anreicherungs- und Kultivierungsansätzen konnten stabile syntrophe Mischkulturen aus Praxisanlagen gewonnen werden. Mittels spezieller Wachstumsmedien ließen sich die Kulturen stabilisieren und dauerhaft kultivieren. Im Rahmen verschiedener Experimente im Labormaßstab konnte ein effektiver Propionsäureabbau durch die gewonnenen Konsortien nachgewiesen werden. Parallel hierzu erfolgte die Isolierung und Charakterisierung verschiedener hydrogenotropher Methanbakterien deren Aktivität für den syntrophen Propionsäureabbau von entscheidender Bedeutung ist. Hierbei konnten Reinkulturen der methanogenen Gattungen *Methanosarcina*, *Methanomethylovorans* und *Methanbacterium* gewonnen wer-

den. Daneben konnten Methanbakterien der Gattungen *Methanoculleus* und *Methanosaeta* in stabilen Anreicherungskulturen identifiziert werden.

Ein weiteres zentrales Ziel des Forschungsvorhabens war es, Erkenntnisse zu gewinnen, welche Faktoren zu einer verstärkten Propionsäurebildung in Biogasanlagen führen. Die im Rahmen der Untersuchungen durchgeführten Wachstums- und Anreicherungsexperimente deuten darauf hin, dass eine verstärkte Propionsäurebildung insbesondere auf den Einsatz stärkereicher Substrate zurückzuführen ist. Interessanterweise handelt es sich hierbei vermutlich um einen indirekten Effekt bei dem zunächst Milchsäure als ein wichtiges Zwischenprodukt gebildet wird. Anschließend erfolgt ein Abbau der Milchsäure in Richtung Essigsäure, insbesondere aber zu Propionsäure.

In der folgenden Phase des Vorhabens stand die nähere Charakterisierung der gewonnenen syntrophen Kulturen im Vordergrund. Mittels molekularbiologischer Methoden konnte die Zusammensetzung der syntrophen Kulturen aufgeklärt werden. Hierbei wurden sowohl verschiedene wasserstoffverwertende Mikroorganismen identifiziert werden als auch potentielle syntrophe propionsäureabbauende Bakterien. Es konnte allerdings noch nicht abschließend geklärt, werden welche Spezies in den gewonnenen Konsortien hauptsächlich für den Propionsäureabbau verantwortlich sind. Auf Basis der umfangreichen Sequenzanalysen konnte jedoch die Grundlage für eine DNA-Sondenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung der Organismen in Praxisanlagen gelegt werden.

Parallel hierzu wurden Untersuchungen zu einem möglichen Einsatz der syntrophen Konsortien als Starterkulturen zum Propionsäureabbau durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten unter praxisnahen Bedingungen in Pilot-Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab. Im Rahmen von Belastungstests, bei denen durch eine schnelle Anhebung der Raumbelastung eine Säureakkumulation induziert wurde, konnte ein verbesserter Abbau von Essigsäure und Propionsäure demonstriert werden. Weiterhin konnten signifikante Effekte einer vorbeugenden Zugabe der Kulturen im Vorfeld einer Erhöhung der Fütterungsmenge gezeigt werden. Ursprünglich vorgesehene Experimente zur Zugabe der Kulturen zu Praxisanlagen, konnten im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr umgesetzt werden. Im Falle einer verstärkten Säurebildung in Praxisanlagen ist es notwendig, zeitnah einzugreifen, um Ausfallzeiten zu vermeiden. Hierbei erwies es sich als wesentliches Problem, ausreichend große Mengen der Mikroorganismen kurzfristig bereitzustellen. Dieses Problem ließe sich durch eine Konservierung der Kulturen nach erfolgter Anzucht lösen. Entsprechende Experimente zur Konservierung und anschließenden Aktivierung sind Gegenstand noch laufender Untersuchungen.

## II Ergebnisse

### II.1 Isolierung und Charakterisierung Propionsäure-abbauender Bakterien

#### II.1.1 Untersuchte Praxisbiogasanlagen

Für die Untersuchungen der ersten Projektphase wurden zunächst 4 Biogasanlagen aus Rheinland-Pfalz einbezogen. Die jeweilige Anlagenspezifikation sowie die Betriebsparameter sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Anlagenparameter der untersuchten Biogasanlagen.

	BGA Arenrath	BGA Glahn	BGA Friedrich	BGA Wagner
Fermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	LARW/TMRW <sup>1)</sup>	LARW/TMRW <sup>1)</sup>	Zentralrührwerk	LARW/TMRW <sup>1)</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 1260	2 x 1.000	2 x 1260
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	TMRW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>	LARW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 1260	1.000	1 x 1260
Leistung	345 P <sub>el</sub> [kW]	370 P <sub>el</sub> [kW]	380 P <sub>el</sub> [kW]	550 P <sub>el</sub> [kW]
Inputstoffe				
Fest [t/d]	MS <sup>2)</sup> /GS <sup>2)</sup> [12/8]	MS [18]	MS/GPS <sup>2)</sup> [20/2]	MS [33]
Flüssig [m <sup>3</sup> /d]	RG <sup>2)</sup> [10]	SG <sup>2)</sup> [5]	SG [5]	SG [6]
pH-Wert <sup>3)</sup>	7,3 – 7,5	7,5 – 7,7	7,2 – 7,6	7,2 – 7,5
Temperatur	40 °C	41 °C	39 °C	40 °C
NH <sub>4</sub> -N <sup>3)</sup> [mg/kg]	1500 – 1700	1800 – 2000	2000 – 2500	1400 – 1500
Gesamtsäure [mg/kg]	< 250	500 – 2000	1000 – 4500	1000 – 2500

LARW = Langachsührwerk; TMRW = Tauchmotorrührwerk

MS = Maissilage; GS = Grassilage; RG = Rindergülle; SG = Schweinegülle; GPS = Ganzpflanzensilage-Spektrum im Betrachtungszeitraum.

Die Fermenterproben für die Anreicherung und Kultivierung von syntrophen Propionsäure-abbauenden Kulturen wurden vor Ort in gasdichte sterile Gefäße überführt und für die weitere Bearbeitung direkt ins Labor verbracht. Hier wurden die Proben unmittelbar aufgearbeitet und geeignete Wachstumsmedien (Tabelle 2) mit dem Material angeimpft.

#### II.1.2 Medien und Wachstumssubstrate Propionsäure-abbauender Bakterien

Für die Anreicherung von propionsäureabbauenden syntrophen Kulturen aus Praxis-Biogasanlagen wurden verschiedene Wachstumsmedien getestet, denen Propionsäure als C-Quelle zugesetzt wurde. Hierbei zeigte sich, dass in rein synthetischen Medien nur ein

sehr eingeschränkter Propionsäureabbau vorlag. Die Medien PI und PIII (Tabelle 2), welche zusätzlich mit Filtraten aus Praxisbiogasfermentern supplementiert wurden, erwiesen sich dagegen als geeignete Anreicherungs- und Kulturmedien.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Medien PI.

Vor dem Autoklavieren	
Destilliertes Wasser	900 mL
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,50 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,40 g
NaCl	0,40 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,30 g
$\text{NaHCO}_3$	4 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,002 g
Propionsäure	1,5 g
Reaktorfiltrat <sup>1)</sup>	100 mL
Resazurin	0,001 g
Cystein	0,5 g
Nach dem Autoklavieren	
	Je 5 mL Medium
Spurenelementlösung (Tab. 3)	0,025 mL
Vitaminlösung (Tab. 4)	0,025 mL
Dithiothreitol (DTT; 0,5 M)	0,05 mL

<sup>1)</sup> Gewonnen durch Filtration (0,2  $\mu$ ) von Fermenterflüssigkeiten aus Praxisbiogasanlagen.

Dem Medium PIII wurde zusätzlich Hefeextrakt (0,5 g/L) und Formiat (1 g/L) zugegeben. Die eingewogenen Medienbestandteile wurden unter Rühren zugegeben und gelöst. Anschließend wurde das Medium in einem Anaerobenzelt in Reagenzröhrchen überführt (jeweils 5 mL) welche mit Butylstopfen gasdicht verschlossen wurden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

HCl (25 %; 7,7 M)	10 mL
FeCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	1,5 g
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	190 mg
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	100 mg
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	120 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	36 mg
NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	5 mg
Destilliertes Wasser	990 mL

1) Vor dem Zusetzen der anderen Bestandteile wurde das Eisenchlorid vollständig in der Salzsäure gelöst.

Die Gasphase (ca.  $\frac{3}{4}$  des Kulturröhrchens) wurde mit einem Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid (80 / 20) ausgetauscht und die Röhrchen anschließend autoklaviert. Die Zugabe von Supplementlösungen erfolgte nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen. Der pH-Wert des fertigen Mediums lag zwischen 7,4 und 7,5.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Vitaminlösung.

p-Aminobenzoessäure	5 mg
D (+)-Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Liponsäure	5 mg
Nikotinsäure	5 mg
Riboflavin	5 mg
Ca-D (+)-Pantothenat	5 mg
Pyridoxinhydrochlorid	10 mg
Thiamin-HCl × 2H <sub>2</sub> O	5 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	1 mg
Destilliertes Wasser	1000 mL

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### II.1.3 Zellzahlen kultivierbarer Propionsäure-abbauender Bakterien

Die Zellzahlen der kultivierbaren syntrophen Bakterien in den untersuchten Anlagen wurde mit Hilfe des MPN-Verfahrens (Breitig & v.Tümping 1982) mit dem Medium PI bestimmt. Ziel war es hierbei, die häufigsten kultivierbaren Propionsäureabbauer aus den jeweiligen Praxisanlagen zu gewinnen. Zur Durchführung der MPN-Versuche wurde aus den Fermenterproben der untersuchten Anlagen jeweils 1 cm<sup>3</sup> Fermentersubstrat steril entnommen und in Serumflaschen mit 9 mL des Mediums PI verdünnt. Hiervon ausgehend erfolgte eine serielle Verdünnung in Zehnerschritten im dreifachen Parallelansatz. Sämtliche Proben wurden bei 40 °C für 6 Wochen im Dunkeln inkubiert. Bei der Auswertung galten diejenigen Kulturröhrchen als bewachsen, bei denen infolge von Bakterienwachstum ein Niederschlag sichtbar sowie ein Abbau von Propionsäure mittels HPLC-Analyse nachweisbar war. Für die Ermittlung der MPN-Zahl wurden die bewachsenen Röhrchen der drei höchsten Verdünnungsstufen gezählt. Hieraus ergab sich eine dreistellige Zahl, deren erste Ziffer die Anzahl bewachsener Röhrchen der dritthöchsten positiven Verdünnungsstufe wiedergibt, die zweite diejenige der zweithöchsten und die dritte die der höchsten positiven Verdünnungsstufe. Aus einer MPN-Tabelle wurde die zugehörige MPN-Zahl abgelesen und mit dem Reziprokwert der mittleren der drei herangezogenen Verdünnungsstufen multipliziert (nach Sass 1997).

Die MPN-Zahlen der Propionsäureabbauer bei den 4 in die Untersuchung einbezogenen Biogasanlagen bewegten sich in einer Größenordnung von  $3 \times 10^6$  –  $1,5 \times 10^7$ . Auf der Grundlage typischer Gesamtzellzahlen in Biogasreaktoren ( $\sim 5 \times 10^9$  Zellen/cm<sup>3</sup>) lag die Kultivierbarkeit der syntrophen Propionsäure-abbauenden Bakterien generell < 1 %. Diese relativ niedrige Kultivierbarkeit bezogen auf die Gesamtpopulation ist allerdings für komplexe anaerobe Ökosysteme durchaus typisch (u.a. Amann *et al.* 1995). Insbesondere trifft dies auf die Zielorganismen, zu da syntrophe Gemeinschaften bei geringen Zelldichten in der Regel schlecht anwachsen (Schink 1991, Schink 1997). Beim Vergleich der untersuchten Anlagen zeigte die Anlage 1 (BGA Arenrath) signifikant höhere Zellzahlen als die Vergleichsanlagen (Abbildung 1). Gleichzeitig konnte bei dieser Anlage im Beobachtungszeitraum eine sehr hohe Prozessstabilität beobachtet werden (Gesamtsäure generell < 250 mg/kg), bei den anderen Anlagen 2 bis 4 zeigten sich dagegen während des Prozesses immer wieder erhöhte Fettsäurekonzentrationen. Ein Kennzeichen der Anlage 1 ist zum einen der Einsatz von Rindergülle als Cosubstrat (übrige Anlagen setzten Schweinegülle ein; Tabelle 1) sowie zum anderen der regelmäßige Einsatz einer Nährstoffmischung zur Stabilisierung der Fermenterbiologie.

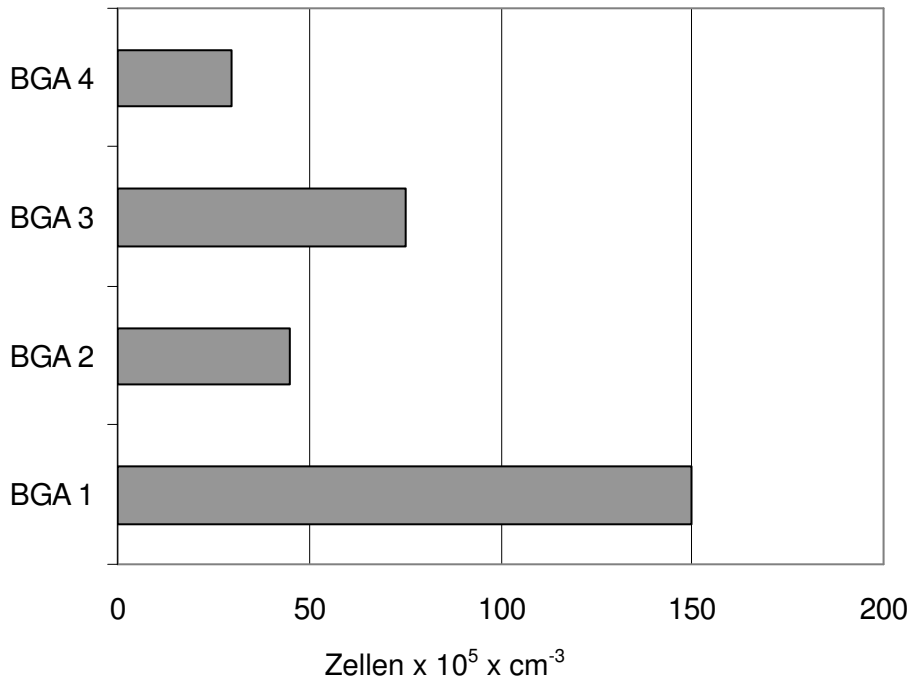


Abbildung 1: MPN-Zahlen Propionsäure-abbauender Bakterien in 4 verschiedenen Biogasanlagen. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Wagner; BGA 4 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1).

#### II.1.4 Gewinnung stabiler Mischkulturen und physiologische Charakterisierung der syntrophen Konsortien

Die Gewinnung syntropher Mischkulturen aus den untersuchten Anlagen erfolgte aus den höchsten bewachsenden Verdünnungsstufen der MPN-Serien, in denen Propionsäureabbau nachweisbar war. Insgesamt wurden aus den vier untersuchten Anlagen zehn stabile Kulturen gewonnen, welche auch nach wiederholtem Überimpfen in frisches Medium die gleiche Charakteristik des Propionsäureabbaus zeigten. Generell war hierbei zu beobachten, dass die Kulturen nach dem Überimpfen eine ausgeprägte lag-Phase von 8 – 12 Tagen aufwiesen, in der nur ein sehr geringer Propionsäureabbau zu beobachten war (siehe auch Abbildung 2). Relativ lange lag-Phasen und ein langsames Wachstum sind ein typisches Kennzeichen von syntrophen Labor-Batchkulturen, da sich die mikrobielle Gemeinschaft aus den propionsäureabbauenden Bakterien und den wasserstoffverbrauchenden Partnerorganismen nach dem Überimpfen neu etablieren muss und zudem die Energieerträge der jeweiligen Stoffwechselwege gering sind. Nach Abschluss der lag-Phase lag die Abbaurate bei den verschiedenen Kulturen zwischen 75 – 150 mg · L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> Propionsäure. Bezüglich der Charakteristik des Propionsäureabbaus sowie gebildeter



Stoffwechselprodukte zeigten sich bei den untersuchten Kulturen zwei Grundtypen, die anhand der Kulturen Wp1 und Gp1 in Abbildung 2 exemplarisch dargestellt sind. Bei der Kultur Wp1 konnte parallel zum Abbau der Propionsäure ein Anstieg der Essigsäurekonzentration beobachtet werden. Da die Essigsäure keinem weiteren Abbau unterworfen war, ist hier davon auszugehen, dass syntrophe Acetatabbauer bzw. acetoklastische Methanbakterien in der Kultur nicht vorhanden waren. Im Gegensatz dazu war bei der Kultur Gp1, ebenso wie bei der überwiegenden Zahl der weiteren Kulturen, nur eine sehr geringe Essigsäurebildung festzustellen. Neben der Essigsäure konnten keine weiteren flüssigen Stoffwechselprodukte des Propionsäureabbaus festgestellt werden. Die Untersuchungen auf gasförmige Produkte des Propionsäureabbaus, insbesondere Methan und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S), erfolgte mittels gaschromatographischer Analyse. Als wasserstoffverbrauchende Partnerorganismen in syntrophen fettsäureabbauenden Mischkulturen kommen typischerweise zwei physiologische Gruppen in Frage. Zum einen sind dies hydrogenotrophe methanogene Bakterien verschiedener Gattungen sowie zum anderen sulfatreduzierende Bakterien aus der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien (hier insbesondere Vertreter der Gattung *Desulfovibrio*). Bei allen untersuchten Kulturen konnte im Verlauf des Propionsäureabbaus eine signifikante Methanbildung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3). Schwefelwasserstoff als Stoffwechselprodukt der sulfatreduzierenden Bakterien konnte hingegen nicht oder nur in Spuren detektiert werden.

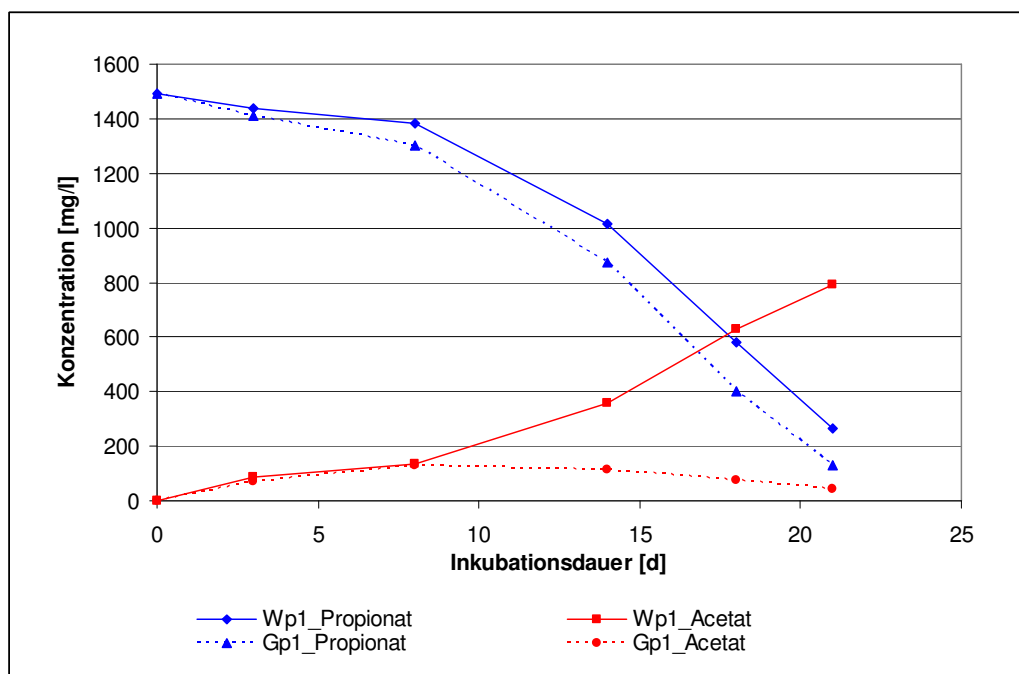


Abbildung 2: Entwicklung der Propionsäure- und Essigsäurekonzentration im Verlauf der Inkubation der syntrophen Mischkulturen Wp1 und Gp1.

Die Voruntersuchungen hatten bereits gezeigt, dass die Anreicherungskulturen in rein synthetischen Medien nur ein eingeschränktes Wachstum zeigten. Für die Anreicherung und Kultivierung war den Wachstumsmedien daher 10 % eines Filtrates aus Praxisbiogasanlagen zugesetzt worden.

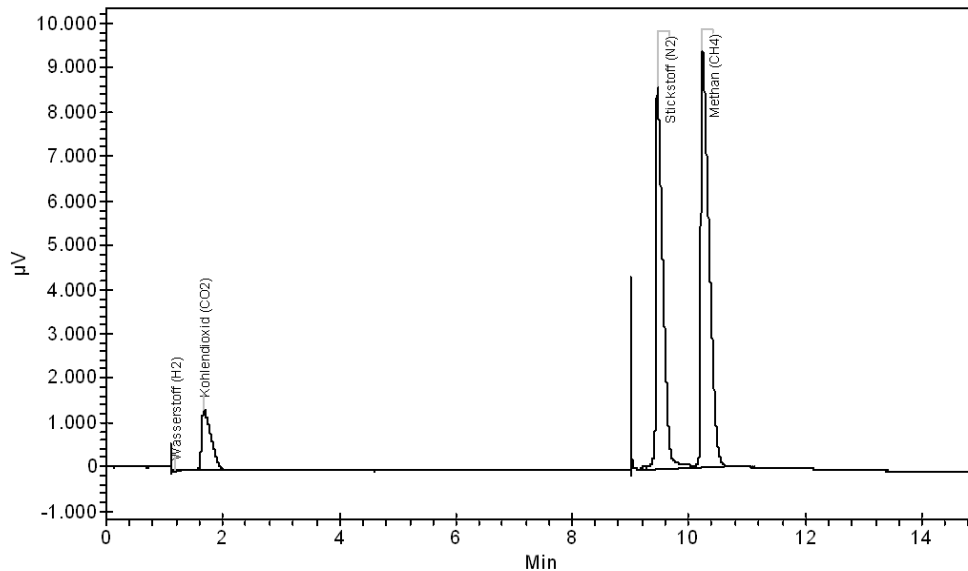


Abbildung 3: Chromatogramm der Gasphase der Kultur Ap1 nach 21 d Inkubation (GC-TCD). Kohlendioxid ~14 % (v/v), Stickstoff ~55 % (v/v), Methan ~30 % (v/v), Wasserstoff ~100 ppm.

Welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen des Reaktorfiltrates auf Abbaugrad und Abbaugeschwindigkeit haben, wurde in einem Wachstumsexperiment ermittelt. Hierbei wurden die syntrophen Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Filtrates parallel inkubiert und der Abbau der Propionsäure mittels HPLC fortlaufend überprüft. Hierbei zeigte sich, dass eine Zugabe in der Größenordnung von 10 – 15 % (v/v) einen deutlich positiven Effekt auf das Wachstum der Kulturen und den Abbaugrad der Propionsäure hatte (siehe Abbildung 4). Bei einer Zugabe von 5 % war der wachstumsfördernde Effekt deutlich geringer ausgeprägt, während bei einer Zugabe von 20 % offenbar erste hemmende Effekte auftraten. Der in Abbildung 4 dargestellte Einfluss des Reaktorfiltrates bei der Kultur Ap1 war in unterschiedlich starker Ausprägung bei allen untersuchten Kulturen feststellbar.

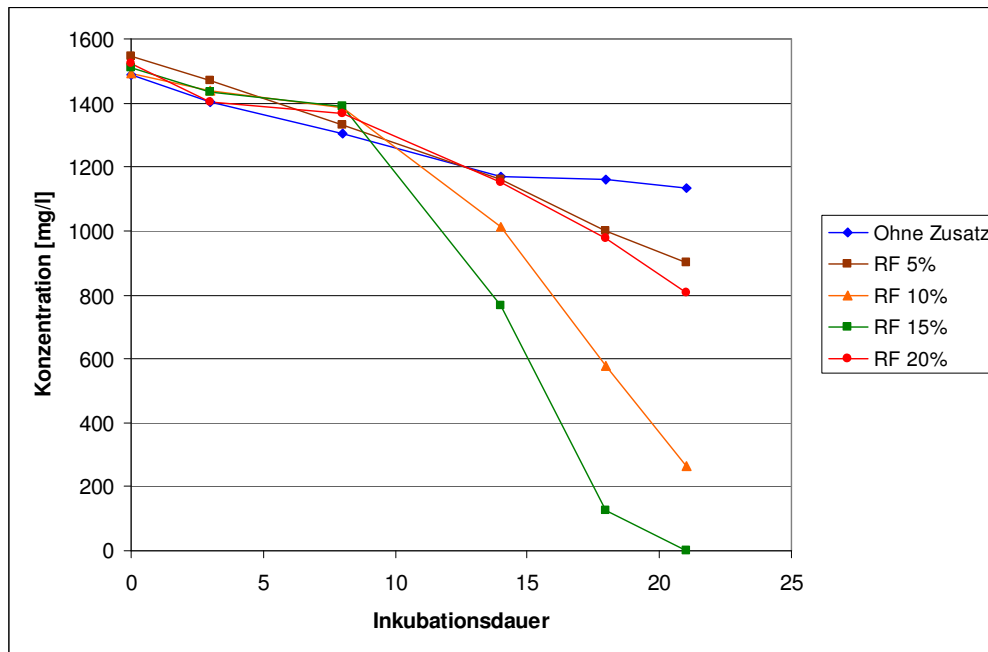


Abbildung 4: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Reaktorfiltrats (RF) auf den Abbau von Propionsäure bei Kultur Ap1.

## II.1.5 Stammidentifizierung der syntrophen Konsortien

Die phylogenetische Einordnung der einzelnen in den syntrophen Konsortien vorkommenden Mikroorganismen erfolgte über die Sequenzierung eines Teils der 16S rDNA nach Klonierung des Zielgens. Hierzu wurde die genomische DNA der jeweiligen Mischkultur extrahiert und anschließend eine Partialsequenz der 16S rDNA mit universellen Eubakterienoligonukleotiden sowie Archaea-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete synthetische Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Spezifität
Eub338f	5'- ACT-CCT-ACG-GGA-GGC-AG - 3'	16S rDNA Eubakteria
Eub1392r	5'- CCA-CGG-GCG-GTG-TGT-AC - 3'	16S rDNA Eubakteria
Met86f	5'- GCT-CAG-TAA-CAC-GTG-G - 3'	16S rDNA Methanogene
Ar1399r	5'- GTG-TGT-GCA-AGG-AGC-AG - 3'	16S rDNA Archaeobakterien

Die Ligation und Transformation der gereinigten Amplifikate wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit durchgeführt. Das Kit beinhaltet den linearisierten Plasmidvektor pCR 2.1-TOPO mit kovalent gebundener Topoisomerase I. Nach Selektion der positiven Klone und Extraktion der Plasmide erfolgte die Sequenzierung der 16S rDNA Partialsequenzen (700 bp; Fa. Gen-terprise, Mainz).

Tabelle 6: Identifizierte Mikroorganismen in den syntrophen Konsortien auf Basis der 16S rDNA.

Syntrophe Kultur	Eubakterien	Übereinstimmung [%], 700 bp	Archaeobakterien	Übereinstimmung [%], 700 bp
Wp1	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM 12261	99	<i>Methanoculleus</i> sp. Stamm dm2	98
	Klon ATB-KM1227	94		
Fp1	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032	94	<i>Methanoculleus bourgensis</i> sp. Stamm dm2	98
Gp1	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM 12261	99	<i>Methanoculleus bourgensis</i> sp. Stamm dm2	98
	<i>Clostridium</i> Klon 16SX-2	99	<i>Methanosaeta</i> sp. Klon I1	94
Ap1	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM 12261	99	<i>Methanoculleus</i> sp. Klon ZC-2	98
	<i>Clostridium</i> Klon 16SX-2	99	Unkult. <i>Methanosarcinales</i> Klon E19	94
Ap3	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM 12261	99	<i>Methanoculleus</i> sp. Klon ZC-2	98
	<i>Clostridium</i> Klon 16Sx-2	99	<i>Methanosaeta</i> sp. Klon A12	94

Auffällig war, dass in allen untersuchten Kulturen *Aminobacterium colombiense* DSM 12261 nachgewiesen werden konnte. Die Spezies wurde 1998 erstmals beschrieben (Baena *et al.* 1998) und ist charakterisiert als syntropher Organismus, der in Partnerschaft mit hydrogenotrophen Methanbakterien verschiedene Aminosäuren abbaut. Ein syntropher Abbau von Propionsäure wurde bei diesem Organismus allerdings bislang noch nicht beschrieben. Ob dieser Organismus für den Propionsäureabbau in den Mischkulturen verantwortlich ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (siehe auch II.6.2). Daneben konnte in Kultur Wp1 ein Bakterium nachgewiesen werden, das aufgrund der Sequenz vermutlich der 2002 neu beschriebenen Gattung *Pelotomaculum* (Imachi *et al.* 2002) zuzuordnen ist. Verschiedene Vertreter dieser Gattung sind als syntrophe Propionsäureabbauer beschrieben. Der phylogenetische Abstand zu charakterisierten Vertretern ist allerdings relativ groß, so dass man zumindest von einer neuen Art der Gattung ausgehen kann. Weiterhin konnte in Kultur Fp1, ein Organismus identifiziert werden, dessen nächster charakterisierter Verwandter ein Propionsäure-abbauendes sulfatreduzierendes Bakterium der Gattung *Desulfobulbus* ist. Auch hier deutet der phylogentische Abstand (> 5 %) darauf hin, dass es sich um eine neue Art handelt.

Bezüglich der identifizierten methanogenen Bakterien war in allen untersuchten Kulturen ein Vertreter der Gattung *Methanoculleus* nachweisbar. Hierbei handelt es sich um hydrogenotrophe Methanbakterien, die bislang vorwiegend in Faultürmen von Kläranlagen gefunden wurden. Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass diese Organismen auch

in landwirtschaftlichen Biogasanlagen eine wichtige Rolle spielen (Klocke *et al.* 2008). Daneben konnten in drei der fünf untersuchten Kulturen (Gp1, Ap1 und Ap3) auch acetoklastische Methanogene nachgewiesen werden, hiervon lassen sich mindestens zwei Organismen der obligat acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* zuzuordnen. Eine weitergehende phylogentische Charakterisierung der Konsortien erfolgte im Rahmen des Arbeitspaketes 6 (siehe II.6).

## **II.2 Isolierung und Charakterisierung von Wasserstoff-verwertenden Prokaryoten**

Im Verlauf des ersten Projektjahres konzentrierte sich die Arbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) im Wesentlichen auf die Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung methanogener Archaea aus Fermentern und Nachgärern dreier verschiedener Anlagen. Methanogene Archaea sind für Propionsäure-abbauende Mikroorganismen notwendig, um den Wasserstoffpartialgehalt gering zu halten, welcher bei anaerobem Abbau von Propionsäure entsteht. Die Probennahmen erfolgen aus den Biogasanlagen Theo & Alexander Friedrich GbR (Hochdorf-Assenheim), Hubert Wagner und Sohn GbR (Steinweiler) und BioEnergie Glahn (Zweibrücken) (Tabelle 1). Das IMW hat außerdem Proben aus vier Laborfermentern (Klocke *et al.* 2007) der Arbeitsgruppe M. Klocke des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Abteilung Bioverfahrenstechnik, Potsdam-Bornim erhalten, um methanogene Archaea zu kultivieren.

### **II.2.1 Medien und Wachstumssubstrate methanogener Archaea**

Durch Modifikation verschiedener Kulturmedien, Zugabe von Antibiotika gegen bakterielle Begleitflora (z.B.: 100 µg/mL Ampicillin, Canamycin oder Rifampicin) und vielfachen Verdünnungsreihen (1:10) war es möglich, Reinkulturen methanogener Archaea aus Fermentern der Biogasanlagen und aus Laborfermentern der AG Klocke zu erhalten (Stantscheff *et al.*, in Vorbereitung; vergl. Anlage). Dabei musste darauf geachtet werden, dass der pH-Wert des Mediums im neutralen Bereich um 7,0 lag und das Medium strikt anaerob war, damit das Wachstum von methanogenen *Archaea* gewährleistet war. Um Abwesenheit von Sauerstoff im Medium zu erreichen, wurde gegebenenfalls Natrium-Dithionit zugegeben, um die Wirkung von reduzierenden Agenzien zu verstärken. Natrium-Dithionit ist ein starkes Reduktionsmittel und reagiert mit Sauerstoff, so dass Sauerstoff strikt anaeroben Mikroorganismen nicht schaden kann.

Im Folgenden (Tabelle 7 und Tabelle 8) sind die verwendeten Medien zur Anreicherung, Isolierung und mikrobiologischen Charakterisierung von methanogenen Archaea und Wasserstoff verwertenden Sulfatreduzierern aufgeführt und erläutert.

Tabelle 7: Modifiziertes DSMZ-Medium 287 für Wasserstoff verwertende methanogene Archaea.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Reaktorfiltrat	50,0 mL
Vitaminlösung (DSMZ-Medium 141)	10,0 mL
Spurenelementelösung (DSMZ-Medium 141)	10,0 mL
NH <sub>4</sub> Cl	2,0 g
Natriumacetat	2,0 g
Resazurin	1,0 mg
NaHCO <sub>3</sub>	4,0 g
Cysteine-HCl x H <sub>2</sub> O	0,5 g
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,5 g
entionisiertes Wasser	930,0 mL

Die Gasatmosphäre wurde mit 80% H<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> (1,0 bar Überdruck) begast. Die Zugabe von 5 % Reaktorfiltrat bewirkt besseres Wachstum der methanogenen Archaea in Kultur. Für die Herstellung des Reaktorfiltrats wurde Fermenterinhalt zunächst von groben Stücken wie zum Beispiel Maissilage durch niedertourige Zentrifugation befreit. Darauf wurde der dickflüssige Überstand mit Hilfe einer Vakuumpumpe filtriert. Das Resultat war flüssiges Reaktorfiltrat, welches dem Medium zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte in einem auf 39 °C temperierten Schüttler.

Für zweiwertige Alkohole verwertende methanogene *Archaea* der Gattung *Methanoculleus sp.* wurde dem modifizierten DSMZ-Medium 287 50 mL 2-Propanol als Substrat und kein Natriumacetat zugegeben. Die Gasatmosphäre wird mit CO<sub>2</sub> (0,6 bar Überdruck) begast. Das Wachstum von *Methanobacterium sp.* wurde gegebenenfalls zusätzlich durch ein Antibiotikum (100 µg/mL Gentamycin) gehemmt.

Für Substrattests wurden dem oben beschriebenen DSMZ-Medium 287 statt des Reaktorfiltrats und Acetat verschiedene Substrate zugesetzt. Auf einen Liter Medium wurden alternativ 2,5 g Acetat, 2,5 g Formiat, 50 mL 2-Propanol, 50 mL Ethanol, 40 mL Essigsäure einzeln zugegeben. Die Atmosphäre wurde mit Stickstoff (0,5 bar Überdruck) begast. Das Wachstum wurde durch visuelle Betrachtung der Trübung des Mediums und durch Mikroskopie verfolgt.

Tabelle 8: Modifiziertes DSMZ-Medium 318 für Methanol verwertende methanogene *Archaea*.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,30 g
NaCl	0,60 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,10 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,08 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g
Reaktorfiltrat	50,00 mL
Spurenelementelösung (DSMZ-Medium 141)	10,00 mL
Vitaminlösung (DSMZ-Medium 141)	10,00 mL
Methanol	5,00 mL
KHCO <sub>3</sub>	2,00 g
Cysteine-HCl x H <sub>2</sub> O	0,30 g
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,30 g
Resazurin	1,00 g
entionisiertes Wasser	980,00 mL

Die Gasatmosphäre wurde mit N<sub>2</sub> (0,5 bar Überdruck) begast. Die Inkubation erfolgte bei 39 °C im Brutschrank. Für die Anreicherung Wasserstoff-verwertender Sulfatreduzierer wurde das DSMZ-Medium 63 verwendet, wobei kein Laktat zugegeben wurde und die Atmosphäre aus 80 % H<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> bestand. *Lysogeny-Broth* (LB)-Agarplatten mit Ampicillin und X-Gal wurde für Klone mit archaealer 16S rRNA in *Escherichia coli* verwendet.

## II.2.2 Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung methanogener Archaea

Die physiologische Charakterisierung der Reinkulturen wurde mikroskopisch anhand methanogener Archaea vorgenommen, die den grün fluoreszierenden Cofaktor F<sub>420</sub> besitzen. F<sub>420</sub> ist ein essentieller Cofaktor bei der Methanogenese ausgehend von Kohlendioxid. Er überträgt ausschließlich ein Hydridion bei einigen Schritten während der Methanogenese. Auf eine Anreicherung und Isolierung methanogener Archaea aus Termitendärmen wurde aufgrund der ausreichenden Anzahl an Kulturen methanogener Archaea aus Biogasanlagen verzichtet.

Die molekularbiologische Analyse von Mikroorganismen in den Fermentern, sowie in Kulturen, wurde mittels Sequenzierung der der 16S rDNA durchgeführt. Dazu wurde als ersten Schritt chromosomale DNA aus Fermenterinhalt sowie aus Kulturen isoliert. Dies wurde zum einen auf klassischem Weg mit der Phenol/Chloroform-Fällung beziehungsweise mit DNA-Isolierungskits (Qiagen, Hilden; Roboklon, Berlin) durchgeführt.

Im zweiten Schritt wurde isolierte chromosomale DNA mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Spezifische synthetische Oligonukleotide (Tabelle 9) wurden verwendet, um die DNA der gewünschten Mikroorganismengruppe zu vervielfältigen.

Tabelle 9: Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung der 16S rDNA methanogener Archaea.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C] <sup>a</sup>
Ar1000f <sup>1</sup> (forward)	AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	19	57,9	62,32
GCAr1000f (forward)	[CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CC] AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	57	40,4	91,37
Ar1500r <sup>1</sup> (reverse)	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	19	42,1	55,85
Met86f <sup>2</sup> (forward)	GCT CAG TAA CAC GTG G	16	56,25	56,71
Met1340r <sup>2</sup> (reverse)	CGG TGT GTG CAA GGA G	16	62,5	59,28

<sup>a</sup>: Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers, <sup>1</sup> Yanagita *et al.* 2000, Tatsuoka, *et al.* 2007, <sup>2</sup> Wright *et al.* 2003

Die mittlere Schmelztemperatur T<sub>m</sub> ergibt sich aus der Länge des synthetischen Oligonukleotids und des GC-Gehalts der Oligonukleotide. Der T<sub>m</sub> brachte eine Anlagerungstemperatur für alle in Tabelle 9 aufgelisteten Oligonukleotide hervor (Tabelle 10).

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen einer PCR mit archaealer 16S-rDNA.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94	1	35
Anlagerung 1	57-53	1	15
Anlagerung 2	57	1	20
Elongation	72	1,5	35
Abschließende Extension	72	10	1
Gesamt-Zyklen			35

Bei der Analyse von archaealer DNA wurde ein PCR-Programm gewählt, das beim Anlagerungsschritt zunächst einige Zyklen einer Temperaturverminderung vollzieht, um eine sicherere Amplifizierung zu erreichen (Tabelle 10).

Eine Amplifizierung liefert unter Umständen DNA-Fragmente von unterschiedlichen Arten. Sequenzierungen der 16S-rDNA führen zu zuverlässigen Ergebnissen, wenn die zu sequenzierende DNA zu einem Mikroorganismus gehört. Daher wurde ein Zwischenschritt durchgeführt, bei dem die amplifizierte DNA getrennt wurde, welche von mehreren Arten stammen konnte. Hierzu wurden drei Methoden verwendet. Die Methode der Denaturie-



renden-Gradienten-Gel-Elektrophorese, der Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese und der Klonierung. Bei den ersten beiden Methoden wurden 500 bp große 16S rDNA-Fragmente nach ihrer Kodierung elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert. Eine weitere Methode zur Auftrennung von DNA verschiedener Mikroorganismen war das Klonieren. Hier wurde mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers gearbeitet. Mit dieser Methode wurden längere 16S rDNA-Fragmente als mit den vorher beschriebenen Methoden getrennt. Prinzipiell wird bei der Klonierungsmethode immer ein Fragment in *Escherichia coli* kloniert, was gewährleistet, dass jede Zelle nur ein Fragment einer Art aufnimmt. Mit den Klonen wurde eine Kolonie-PCR vorgenommen, bei der ein Abstrich aus jeweils einer Klon-Kolonie als DNA-Vorlage fungierte. Um die Zellen aufzubrechen und die darin enthaltene DNA freizusetzen, wurde der initiale denaturierende Schritt zeitlich verlängert. Die Klone wurden mit dem Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) vorsortiert. Die Amplifikate der Kolonie-PCR wurden mit DNA-schnidenden Enzymen fragmentiert und die verschiedenen Schnittmuster nach einer Gelelektrophorese miteinander verglichen. Jeweils ein Fragment jedes Musters wurde daraufhin reamplifiziert.

Die erhaltenen Reamplifikate wurden mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) in doppelt deionisiertem und sterilfiltriertem Wasser aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde von den Firmen LGC Genomics (Berlin) und Eurofins mwg Operon (Ebersberg) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels einer Internetdatenbank (NCBI nuklear BLAST) mit dort eingetragenen Sequenzen verglichen, um die Art zu ermitteln. Da diese Datenbank eine freie Datenbank ist und darin fehlerhafte Sequenzen enthalten sein können, wurden die erhaltenen Sequenzen zusätzlich mit Sequenzen von Typstämmen der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) verglichen.

Im Folgenden ist Tabelle 11 gezeigt, welche mikrobiologische und molekularbiologische Ergebnisse der Charakterisierung von Rein- und Anreicherungskulturen methanogener Archaea aus Biogasanlagen zusammenfasst.

Tabelle 11: Charakteristische Eigenschaften von Kulturen methanogener Archaea aus Biogasanlagen und Laborfermentern.

Reinkulturen methanogener Archaea								
DGGE-Bande(n) einer Kultur	Morphologie	Substrat	Nächster verwandter Mikroorganismus [16S rDNA]	Übereinstimmung [%] (bp <sub>pos</sub> /bp <sub>Seq</sub> ) <sup>a</sup>	Sequenzlänge nach DGGE [bp <sub>Ges</sub> ] <sup>b</sup>	Übereinstimmung [%] (bp <sub>pos</sub> /bp <sub>Seq</sub> ) <sup>a</sup>	Sequenzlänge nach Klonierung [pb <sub>Ges</sub> ] <sup>b</sup>	
BGA Friedrich								
TAF1a	Gerade, fluoreszierende Stäbchen	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	99 (317/318)	318	99 (973/976)	976	
TAF1b			<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	100 (315/315)	318			
TAF1c			<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	99 (334/335)	358			
TAF1.1	Unregelmäßige, fluoreszierende Kokken	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	<i>Methanoculleus bourgensis</i> <sup>T</sup> DSM3045	99 (350/351)	369	99 (478/484)	491	
TAF1.2a	Fluoreszierende Kokken in Clustern, teilweise mit dem Auge sichtbar	Methanol, Acetat, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>l</sup> DSM2053	99 (323/324)	363	99 (867/868)	871	
TAF1.2b			<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>T</sup> DSM2053	100 (327/327)	365			
BGA Wagner								
HWS2.1	Fluoreszierende Kokken in Clustern, teilweise mit dem Auge sichtbar	Methanol, Acetat, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<i>Methanosarcina barkeri</i> <sup>T</sup> DSM800	98 (346/352)	355	98 (824/838)	838	
BGA Glahn								
BEG1a	Gerade, fluoreszierende Stäbchen	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	99 (318/321)	328	99 (863/867)	869	
BEG1b			<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	99 (105/108)	355			
BEG1c			<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>l</sup> DSM1535	99 (333/334)	354			
BEG4a	Diffus fluoreszierende fädige Stäbchen	Acetat	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	98 (342/348)	355	98 (398/408)	407	
BEG4b			<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	99 (347/351)	357			
BEG4c			<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	98 (342/350)	354			

<sup>a</sup> Mit der Referenzsequenz identische 16S-rDNA-Sequenz in Basenpaaren (bp) in Bezug auf die Deckungsgleichheit der 16S-rDNA-Sequenz mit der Referenzsequenz in Basenpaaren (bp); <sup>b</sup> gesamte nach Sequenzierung erhaltene Sequenzlänge

Fortsetzung Tabelle 11: Charakteristische Eigenschaften von Kulturen methanogener Archaea aus Biogasanlagen und Laborfermentern.

Reinkulturen methanogener Archaea								
DGGE-Bande	Morphologie	Substrat	Nächster verwandter Mikroorganismus [16S rDNA]	Übereinstimmung [%] (bp <sub>pos</sub> /bp <sub>Seq</sub> )	Sequenzlänge nach DGGE [bp <sub>Ges</sub> ]	Übereinstimmung [%] (bp <sub>pos</sub> /bp <sub>Seq</sub> )	Sequenzlänge nach Klonierung [pb <sub>Ges</sub> ]	
Laborfermenter								
LFP2.1a	Fluoreszierende Kokken in	Methanol, Acetat, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	
LFP2.1b	Clustern, teilweise mit dem		<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>f</sup> DSM2053	99 (313/315)	359	98 (312/317)	317	
LFP2.1c	Auge sichtbar		<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>f</sup> DSM2053	99 (314/315)	359			
LFP3.1	Fluoreszierende Kokken in Tetraden	Methanol	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> <sup>T</sup> DSM15978	98 (347/354)	358	98 (974/995)	995	
LFP4.1	Gerade, fluoreszierende Stäbchen	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>T</sup> DSM1535	100 (330/330)	366	99 (963/966)	966	
Anreicherungskulturen methanogener Archaea								
BGA Wagner								
HWS1a	Gerade, fluoreszierende Stäbchen	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	<i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>f</sup> DSM1535	99 (348/349)	369	99 (966/969)	969	
HWS1b (schwach)			<i>Methanoculleus bourgensis</i> <sup>T</sup> DSM6216	99 (356/359)	358	-	-	
BGA Glahn								
BEG3a (schwach)	Fluoreszierende Kokken in Clustern, teilweise mit dem	Methanol, Acetat, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM2139	99 (343/348)	354	-	-	
BEG3b	Auge sichtbar		<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>f</sup> DSM2053	99 (313/316)	355	100 (862/862)	863	
BEG3c			<i>Methanosarcina mazei</i> <sup>f</sup> DSM2053	99 (314/316)	356			

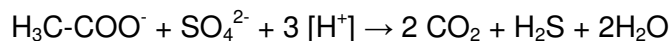
<sup>a</sup> Mit der Referenzsequenz identische 16S-rDNA-Sequenz in Basenpaaren (bp) in Bezug auf die Deckungsgleichheit der 16S-rDNA-Sequenz mit der Referenzsequenz in Basenpaaren (bp); <sup>b</sup> gesamte nach Sequenzierung erhaltene Sequenzlänge

Im darauffolgenden zweiten Jahr wurden verschiedene Reinkulturen hinsichtlich der Effizienz der Methanbildung aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> untersucht (siehe Arbeitsschritt 4, II.4, Tabelle 19). Das effizienteste methanogene Isolat wurde in Propionsäure-abbauenden Mischkulturen als Kokultur verwendet, um den beim anaeroben Abbau von Propionsäure zu Acetat anfallenden Wasserstoffpartialdruck gering zu halten.

### II.2.3 Anreicherung und Isolierung Wasserstoff-verwertender Sulfatreduzierer

Der Prozess der Anreicherung und Isolierung von Wasserstoff-verwertenden Sulfatreduzierern aus den Biogasanlagen wurde durch die Begleitflora erheblich erschwert, da nur durch Verdünnungsreihen und mit speziellen Medien eine Aufreinigung Wasserstoff-verwertenden Mikroorganismen bewerkstelligt werden konnte. Innerhalb der Projektlaufzeit war es möglich, Anreicherungskulturen von *Geovibrio thiophilus* Stamm AAFu3 DSM 11263 zu erhalten. Dieser Mikroorganismus ist ein Sulfatreduzierer, der befähigt ist, Sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) mit Acetat (H<sub>3</sub>C-COO<sup>-</sup>) als Elektronendonator und Wasserstoff ([H<sup>+</sup>]) zu Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) und Wasser (H<sub>2</sub>O) umzusetzen.

Die Reaktionsgleichung mit der Energetik ( $\Delta G^{0'}$ ) wurde wie folgt beschrieben (M. T. Madigen *et al.* 2000):



$$\Delta G^{0'} = -57,5 \text{ kJ/Reaktion.}$$

Der Typstamm *Geovibrio thiophilus* Stamm AAFu3 DSM 11263 (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig)) wurde in Testreihen verwendet, um zu ermitteln, ob dieses Bakterium ein Alternativorganismus in Kokultur mit Propionsäure-abbauenden Bakterien zu hydrogenotrophen methanogenen Archaea darstellt.

## II.3 Isolierung und Charakterisierung Propionsäure-bildender Bakterien

### II.3.1 Untersuchte Praxisbiogasanlagen

Für die Untersuchungen des Arbeitspaketes wurden 3 Praxis-Biogasanlagen aus Rheinland-Pfalz einbezogen. Die Anlagen waren bereits im Rahmen der Arbeitspakete 1 und 2 Gegenstand der Untersuchungen und die jeweiligen Anlagenparameter wurden bereits dargestellt (vgl. Tabelle 1). Im Verlauf des Projektes hatten sich allerdings sowohl vom Substrateinsatz als von der

Anlagenkonfiguration zum Teil Änderungen ergeben. Die zum Untersuchungszeitpunkt aktuelle Anlagenspezifikation sowie die zentralen Betriebsparameter sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Anlagenparameter der untersuchten Biogasanlagen.

	BGA Arenrath	BGA Glahn	BGA Friedrich
Fermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	LARW/TMRW <sup>1)</sup>	LARW/TMRW <sup>1)</sup>	Zentralrührwerk
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 1260	2 x 1.000
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	TMRW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>	LARW <sup>1)</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 1260	1 x 1.000
Leistung	535 P <sub>el</sub> [kW]	370 P <sub>el</sub> [kW]	570 P <sub>el</sub> [kW]
Inputstoffe			
Fest [t/d]	MS <sup>2)</sup> /GS <sup>2)</sup> /SBS <sup>2)</sup> )/HM <sup>2)</sup> [15/8/2/3]	MS [18] SG <sup>2)</sup> [5]	MS/GPS <sup>2)</sup> [25/5] SG [8]
Flüssig [m <sup>3</sup> /d]	RG <sup>2)</sup> [14]		
pH-Wert <sup>3)</sup>	7,2 – 7,7	7,5 – 7,7	7,2 – 7,6
Temperatur	40 °C	41 °C	42 °C
NH <sub>4</sub> -N <sup>3)</sup> [mg/kg]	1800 – 3400	1800 – 2000	1800 – 2200
Gesamtsäure [mg/kg]	250 – 13000	500 – 2000	500 – 2500

1) LARW = Langachsührwerk; TMRW = Tauchmotorrührwerk

MS = Maissilage; GS = Grassilage; RG = Rindergülle; SG = Schweinegülle; GPS = Ganzpflanzensilage; SBS = Sonnenblumensilage; HM = Hähnchenmist

Spektrum im Betrachtungszeitraum

Die Fermenterproben für die Anreicherung und Kultivierung von hydrolytischen säurebildenden Kulturen wurden vor Ort in gasdichte sterile Gefäße überführt und für die weitere Bearbeitung direkt ins Labor verbracht. Hier wurden die Proben unmittelbar aufgearbeitet und geeignete Wachstumsmedien mit dem Material angeimpft (siehe II.3.2)

### II.3.2 Medien und Wachstumssubstrate hydrolytischer Organismen

Für die Anreicherung von hydrolytischen Organismen aus Praxis-Biogasanlagen wurden verschiedene Wachstumsmedien getestet, denen differierende Substrate als C-Quelle zugesetzt wurde (siehe Tabelle 14). Auf dieser Basis wurde das Medium PB\_I als Grundmedium für die Bestimmung von Zellzahlen kultivierbarer hydrolytischer Bakterien sowie für die Anreicherung

und Isolierung entwickelt (siehe Tabelle 13). Als Energie- und Kohlenstoffquelle wurden Cellulose, Xylan Stärke oder Milchsäure eingesetzt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mediums PB\_I.

Vor dem Autoklavieren	
Destilliertes Wasser	960 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 g
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g
NaCl	0,50 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,00 g
Hefeextrakt	0,20 g
C-Quelle (Tabelle 14)	variabel
Reaktorfiltrat <sup>1)</sup>	30 mL
Resazurin	0,001 g
Cystein	0,50 g
Na <sub>2</sub> Sx9H <sub>2</sub> O	0,10 g
Nach dem Autoklavieren	
Spurenelementlösung (Tabelle 15)	0,025 mL
Vitaminlösung (Tabelle 16)	0,025 mL
Dithiothreitol (DTT; 0,5 M)	0,05 mL

<sup>1)</sup> Gewonnen durch Filtration (0,2 µm) von Fermenterflüssigkeiten aus Praxisbiogasanlagen.

Die eingewogenen Medienbestandteile wurden unter Rühren zugegeben und gelöst. Anschließend wurde das Medium in einem Anaerobenzelt in Reagenzröhrchen überführt (jeweils 5 mL), welche mit Butylstopfen gasdicht verschlossen wurden.

Tabelle 14: Energie- und Kohlenstoffquellen für die MPN-Serien.

Substrat	Einsatzmenge [g/L Medium]	Spezifikation
Stärke	2	Lösliche Stärke; Merck
Cellulose	2	Pulver, mittlere Partikelgröße; Sigma-Aldrich
Xylan	2	aus Haferspelzen <sup>1)</sup> ; Sigma-Aldrich
Lactat	2	Natrium-DL-Lactat; Fluka

<sup>1)</sup> Xyloseanteil ~ 70 %; Arabinoseanteil ~15 %; Glucoseanteil ~ 10 %.

Die Gasphase (ca.  $\frac{3}{4}$  des Kulturröhrchens) wurde durch ein Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid (80 / 20) ausgetauscht und die Röhrchen anschließend autoklaviert. Die Zugabe von Supplementlösungen erfolgte nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen. Der pH-Wert des fertigen Mediums lag bei 7,2.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

HCl (25 %; 7,7 M)	10 mL
FeCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	1,5 g
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	190 mg
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	100 mg
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	120 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	36 mg
NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	5 mg
Destilliertes Wasser	990 mL

<sup>1)</sup> Vor dem Zusetzen der anderen Bestandteile wurde das Eisenchlorid vollständig in der Salzsäure gelöst.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Vitaminlösung.

---

p-Aminobenzoensäure	5 mg
D (+)-Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Liponsäure	5 mg
Nikotinsäure	5 mg
Riboflavin	5 mg
Ca-D (+)-Pantothenat	5 mg
Pyridoxinhydrochlorid	10 mg
Thiamin-HCl × 2H <sub>2</sub> O	5 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	1 mg
Destilliertes Wasser	1000 ml

---

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### II.3.3 Zellzahlen kultivierbarer hydrolytischer säurebildender Bakterien

Die Zellzahlen der kultivierbaren säurebildenden Bakterien in den untersuchten Anlagen wurde mit Hilfe des MPN-Verfahrens mit dem Medium PB\_I bestimmt. Ziel war es hierbei, zu untersuchen, auf Basis welcher C-Quelle Propionsäure als Stoffwechselprodukt entsteht. Die Durchführung und Auswertung der MPN-Versuche erfolgte in gleicher Weise unter Punkt II.1 beschrieben.

Die MPN-Zahlen der untersuchten Anlagen mit Cellulose, Milchsäure, Stärke und Xylan als Wachstumssubstrate sind in Abbildung 5 dargestellt. Die höchsten Zahlen kultivierbarer Bakterien wurden bei allen drei Anlagen mit Stärke als Substrat ermittelt, die Zahlen bewegten in einer Größenordnung zwischen  $1 \cdot 10^9$  –  $2,5 \cdot 10^9$  Zellen/g. Neben den Vergleichsweise hohen Zellzahlen war zudem ein schnelles Wachstum feststellbar. So waren auch die höchsten positiven Verdünnungsstufen bereits nach 3 – 5 Tagen stark bewachsen.



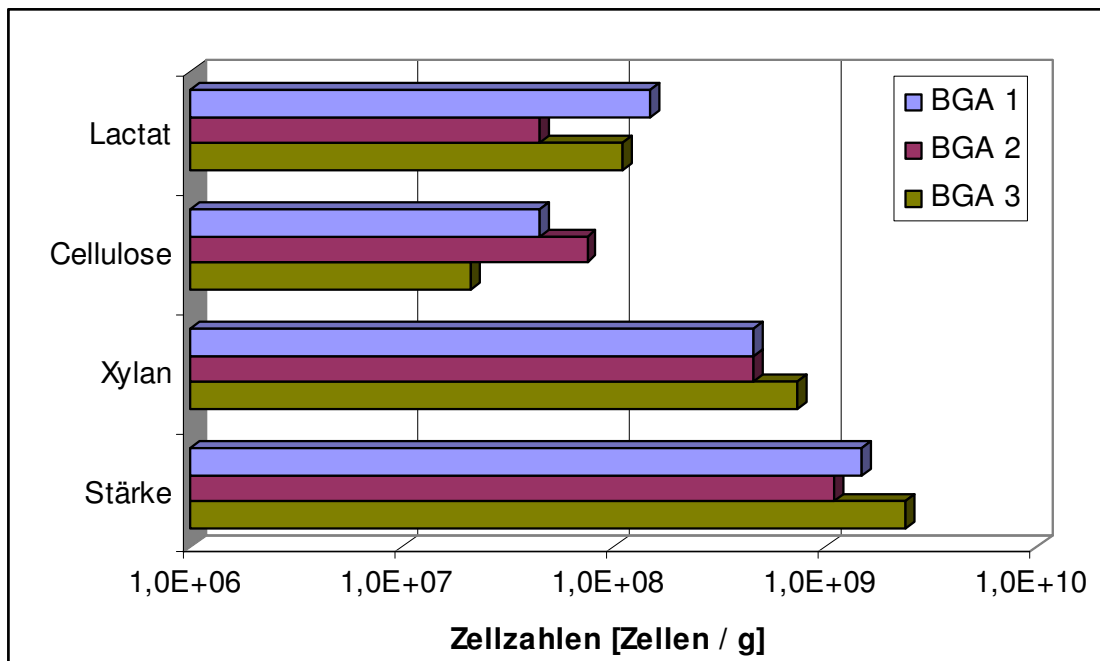


Abbildung 5: MPN-Zahlen säurebildender Bakterien in 3 verschiedenen Biogasanlagen mit verschiedenen C-Quellen. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1).

Untersuchungen des Versäuerungsspektrums der höchsten positiven Verdünnungsstufen mittels HPLC ergaben bei allen drei Anlagen Milchsäure als Hauptstoffwechselprodukt des Stärkeabbaus (siehe Abbildung 6). In deutlich geringeren Konzentrationen war daneben Essigsäure, Ethanol und Formiat nachweisbar, weitere organische Säuren kamen nur in Spuren vor oder waren nicht detektierbar.

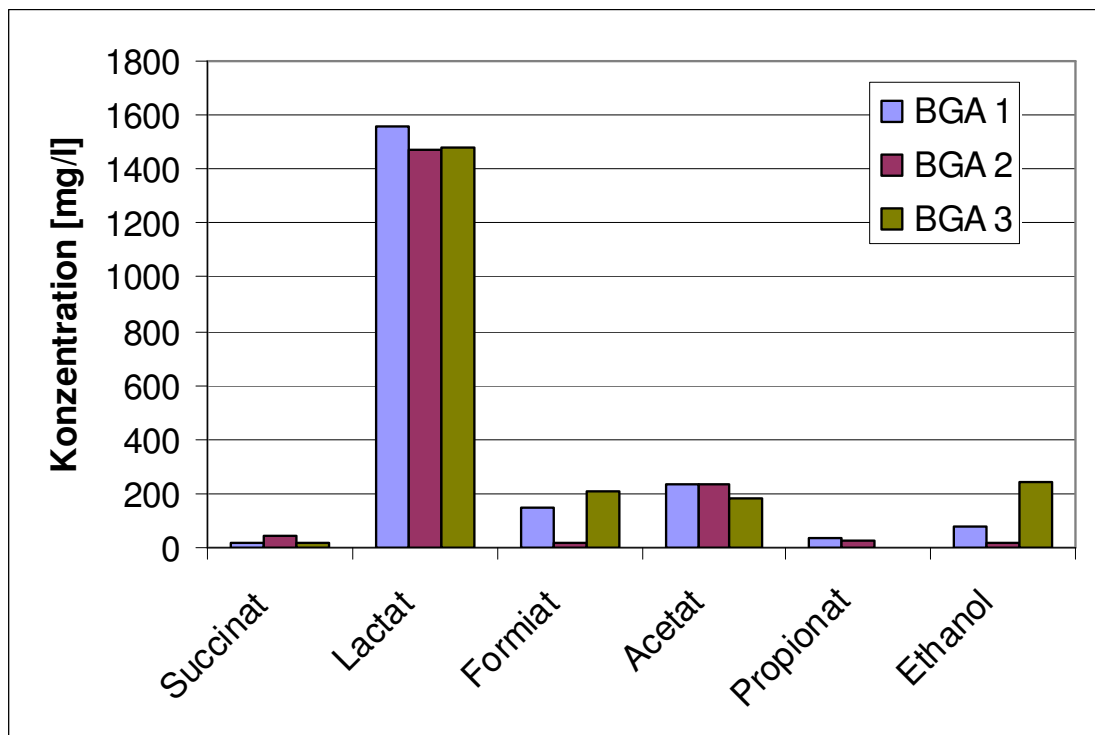


Abbildung 6: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Stärke als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1).

Die ermittelten Zellzahlen mit Xylan als Wachstumssubstrat lagen zwischen  $4,6 \cdot 10^8$  –  $7,5 \cdot 10^8$  Zellen/g und damit etwas unter dem Niveau der Stärkeansätze. Im Vergleich zu den Stärkeansätzen war auch eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit feststellbar, so waren die höchsten positiven Verdünnungsstufen erst nach ca. 12 - 15 Tagen bewachsen. Die Säurespektren der Xylanansätze differierten deutlich von denen mit Stärke, so war ein wesentlich breiteres Spektrum verschiedener organischer Säuren als Stoffwechselprodukte nachweisbar (siehe Abbildung 7).

Als Hauptprodukte waren bei allen drei Anlagen Acetat und Propionat nachweisbar, daneben wurden Lactat und Succinat in höheren Konzentrationen gefunden. Die MPN-Ansätze mit Cellulose als Wachstumssubstrat entwickelten sich nur sehr langsam, Wachstum in den höchsten noch positiven Verdünnungsstufen war erst nach einer Inkubationszeit von ca. 6 Wochen feststellbar. Die ermittelten Zellzahlen kultivierbarer Bakterien lagen mit  $2 - 8 \cdot 10^7$  Zellen/g um ein bis zwei Größenordnungen unter denen der Stärke- und Xylanansätze. Als vorherrschendes Stoffwechselprodukt war Acetat nachweisbar, daneben wurden in geringen Konzentrationen Lactat und Propionat gefunden.

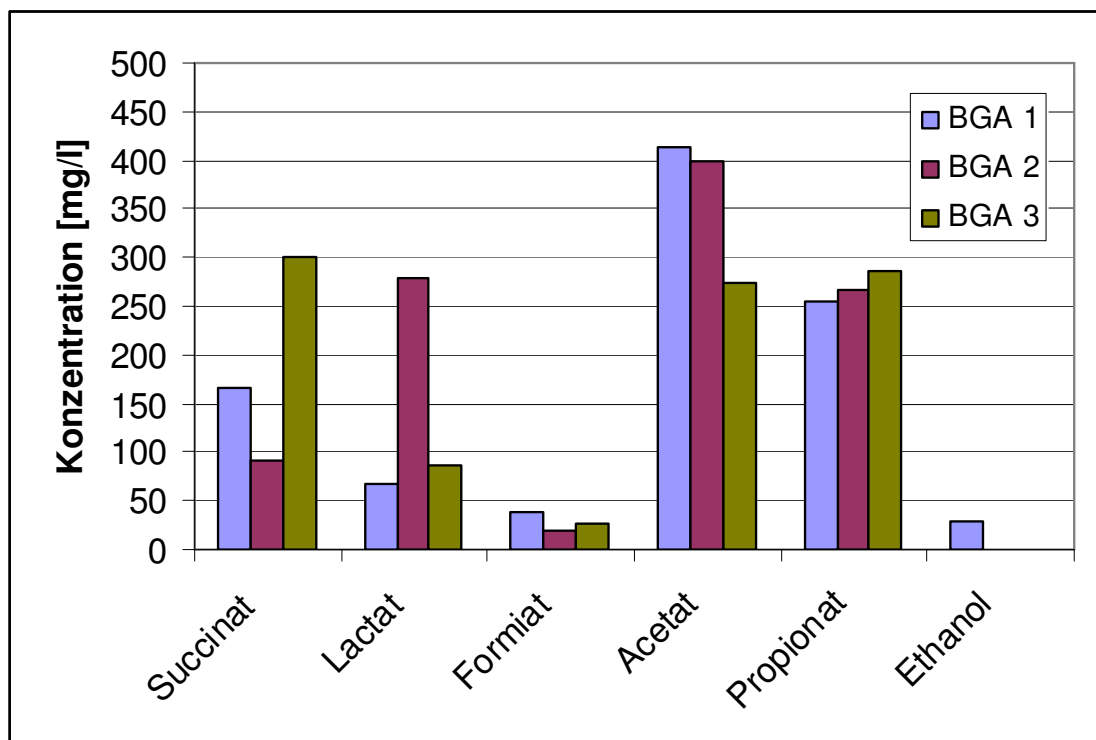


Abbildung 7: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Xylan als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1).

Aufgrund der hohen MPN-Zahlen mit Stärke als C-Quelle und des hier gefundenen Abbaus in Richtung Lactat als Hauptstoffwechselprodukt, wurde zusätzlich zu den pflanzlichen Polymeren Stärke, Cellulose und Xylan auch Lactat als Wachstumssubstrat im Rahmen von MPN-Ansätzen untersucht. Die hierbei ermittelten Zellzahlen lagen bei den verschiedenen Anlagen zwischen  $4,5 \times 10^7$  und  $1,5 \times 10^8$  Zellen/g. Interessanterweise zeigte sich hierbei in den höchsten positiven Verdünnungsstufen ein Abbau der Milchsäure zu Acetat und insbesondere zu Propionat (siehe Abbildung 8). Je Mol Lactat wurden hierbei zwischen 0,35 - 0,5 Mol Acetat sowie 0,55 – 0,6 Mol Propionat gebildet.

Die Ergebnisse der MPN-Serien mit verschiedenen Wachstumssubstraten deuten darauf hin, dass Lactat ein wichtiges Stoffwechselzwischenprodukt beim Abbau von organischem Material in Biogasfermentern darstellt. Ausgangspunkt der Lactatbildung scheint hierbei insbesondere der Stärkeanteil des Substrates zu sein, daneben ist zu berücksichtigen das Maissilagen einen erheblichen Lactatgehalt aufweisen der typischerweise zwischen 4 – 8 % der Trockenmasse liegt. Somit stellt Lactat auch ein bedeutendes primäres Fütterungssubstrat dar. Hinsichtlich des Auf-

trebens und der Akkumulation organischer Säuren in Biogasfermentern ist dies insofern von Bedeutung, als das die Untersuchungen zeigen, dass der Lactatabbau vertärkt in Richtung einer Propionsäurebildung erfolgt.

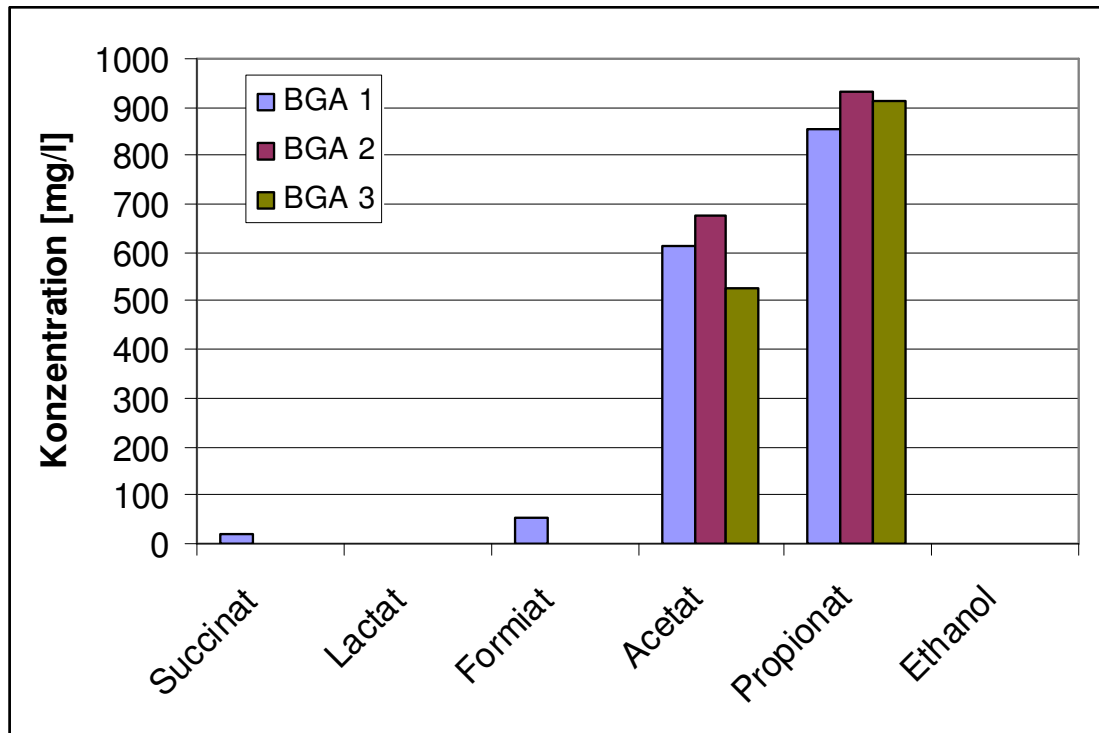


Abbildung 8: Säurespektrum der höchsten positiven MPN-Verdünnungsstufen mit Lactat als Wachstumssubstrat. BGA 1 = Arenrath; BGA 2 = Glahn; BGA 3 = Friedrich (Anlagenparameter siehe Tabelle 1).

### II.3.4 Isolierung und Charakterisierung hydrolytischer säurebildender Bakterien

Die vorherigen Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Propionsäurebildung im Wesentlichen indirekt über das Zwischenprodukt Lactat erfolgt, dieses entsteht wiederum hauptsächlich im Rahmen des Stärkeabbaus. Daneben konnte Propionsäure als eines von mehreren Stoffwechselprodukten des Hemicelluloseabbaus identifiziert werden. Auf dieser Grundlage konzentrierten sich die Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung säurebildender Bakterien insbesondere auf die stärke- und lactatabbauenden Organismen sowie auf die Hemicelluloseabbauer.

Zur Anreicherung und Isolierung wurden zunächst Kulturröhrchen mit dem Medium PB\_I, das mit dem jeweiligen Wachstumssubstrat supplementiert war, aus den höchsten positiven Verdünnungsstufen der MPN-Serien angeimpft. Ausgehend von den Anreicherungsansätzen erfolgte die Isolation über serielle Tiefagar-Verdünnungsreihen (Widdel & Pfennig 1984). Die Ansätze hatten einen Agargehalt von 1,2 – 1,4 % und wurden zwischen 1 - 4 Wochen inkubiert. Zur Ge-

winnung von Reinkulturen wurden 3 - 4 Verdünnungsreihen in Folge durchgeführt. Die verschiedenen aus den Stärkeansätzen gewonnenen Reinkulturen wiesen eine ähnliche Morphologie auf (siehe Abbildung 9; Kultur S-F8A).

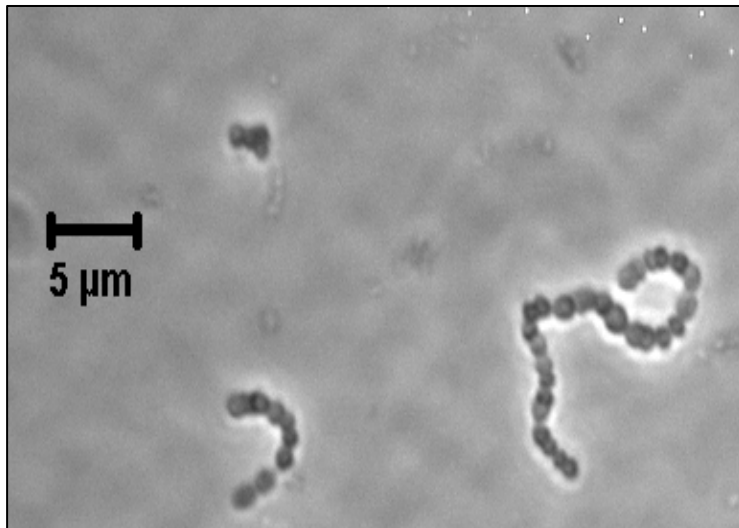


Abbildung 9: Reinkultur S-F8A.  
Isoliert mit Stärke als Wachstums-  
substrat aus BGA 3.

Es handelte sich um kokkenförmige Zellen mit einem Durchmesser von ca. 1 µm, typischerweise treten die Zellen in Ketten unterschiedlicher Länge auf. Die Reinkulturen bildeten aus dem Substrat Stärke überwiegend Lactat, daneben in geringen Konzentrationen Acetat und Ethanol. Die Fermentationscharakteristik und die Morphologie deuteten darauf hin, dass es sich bei den isolierten Kulturen um homofermentative Milchsäurebakterien handelte. Bestätigt konnte dies auf Grundlage einer Teilsequenz der 16S rDNA, hiernach läßt sich der Organismus der Gattung *Streptococcus* zuordnen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Nächste verwandte Spezies von Kultur S-F8A auf Basis der 16S rDNA.

Nächste bekannte Spezies (NCBI)	Accession-number	Sequenzidentität [%]	Sequenzlänge [bp]
<i>Streptococcus equinus</i> strain BP1-7	AB563264	99	709
<i>Streptococcus lutetiensis</i> Stamm NWL68	HQ293091	99	709
<i>Streptococcus infantarius</i> Stamm 908	EU163504	99	709
<i>Streptococcus pasteurianus</i> ATCC 43144	AP012054	99	709

Die Gewinnung von Reinkulturen aus den Hemicellulose- und Lactatansätzen erwies sich aufgrund längerer Inkubationszeiten der Anreicherungs- und Isolationsansätze sowie einer verstärkten Begleitflora als äußerst schwierig. Die Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung sind derzeit noch Gegenstand laufender Arbeiten.

#### II.4 Testen von Starterkulturen im Labormaßstab

Entsprechend dem Arbeitsplan wurden Starterkulturen zur Behebung der Propionsäureüberproduktion im Labormaßstab getestet. Zunächst wurden zur Bestimmung der Methanproduktionsraten und der Methan-anreicherungsmaxima ausgewählte methanogene Isolate aus Fermentern von NawaRo-Biogasanlagen und eines Laborfermenters gaschromatographisch gemessen. In 100 mL anaeroben Serumflschen wurden 18 mL 287-Medium (siehe Tabelle 7) ohne Acetat, mit Reaktorfiltrat mit 2 mL einer stationären methanogenen Kultur angeimpft und bei 39 °C im Schüttler mit 80 % H<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> (1 bar Überdruck) inkubiert. Der Produktionsrate jeder Kultur angepasst, wurde zu verschiedenen fortlaufenden Zeitpunkten der Methangehalt im Kulturgefäß über der Kultur gaschromatographisch ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass in der ersten Zeit der Inkubation immer genügend Substrat in der Gasphase war und der Druck direkt vor der Messung 1 bar Überdruck betrug, indem 80 % H<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> auf 1 bar Überdruck aufgepresst wurde. So war es möglich, die maximale Methanproduktionsrate und die maximale Methananreicherung jeder Kultur zu ermitteln. Folgend sind die Komponenten des verwendeten Gaschromatographen GC-2014 (Shimadzu, Duisburg) beschrieben.

Tabelle 18: GC-Bestandteile für die Messung des Methangehalts in der Gasphase über methanogenen Kulturen

Injektor	DINJ (manuell)
Säule	Carbosieve SII: 3 m, 3 mm, 100/120 µm, 250 °C
Vordetektor	PreCD
Detektor	WLD
Trägergas	Helium [He]
Analyse-Software	GC-Solution

Injektor, Vordetektor, sowie Detektor wurden auf 200 C erhitzt. Ein Volumen von je 0,5 mL wurde mit einer Spritze der Gasphase über anaeroben Kulturen entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Daraufhin wurde ein Messprogramm gestartet. Tabelle 19 zeigt die Methanproduktionsraten und Methananreicherungsmaxima mit Zeitpunkten methanogener Reinkulturen gezeigt werden.

Tabelle 19: Methanproduktionsraten und Methananreicherungsmaxima mit Zeitpunkten hydrogenotropher methanogener Kulturen.

Kultur	$\Delta\text{CH}_4_{\text{max}}$ [mmol · L <sup>-1</sup> pro Tag]	Zeitpunkt $\Delta\text{CH}_4_{\text{max}}$ [d]	$\text{CH}_4_{\text{max}}$ [mmol/L]	Zeitpunkt $\text{CH}_4_{\text{max}}$ [d]
BGA Friedrich				
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1	24,4	9	186,8	15
<i>Methanoculleus bourgensis</i> Stamm TAF1.1	72	35	201,2	71
BGA Wagner				
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1	6,2	15	69,6	26
BGA Glahn				
<i>Methanosarcina mazei</i> Stamm BEG3	19,0	18	167,4	27
Laborfermenter 4				
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm LFP4.1	38,2	5	176,8	45

Obwohl die Kultur von *Methanobacterium formicicum* Stamm LFP4.1 die leistungsfähigste war, wurde sich als den Einsatz als Kokultur in Propionsäure-abbauenden Kulturen für Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 entschieden, da *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 im Vergleich zu den anderen getesteten hydrogenotrophen methanogenen Archaea mit kürzester Dauer das Kulturflaschenvolumen mit Methan ausfüllte.

Von PFI erhaltene Propionsäure-abbauende Mischkulturen Fp1, Wp1, Wp2, Gp1, Ap1 und Ap3 (Siehe II.1) wurden für Kombinationsversuche mit hydrogenotrophen methanogenen Eigenisolaten verwendet. Mit jeder Kultur wurden vier Kultivierungsansätze gleichzeitig gestartet:

- PI-Medium mit 5 % Propionsäureverwerter beimpft
- PI-Medium mit je 5 % Propionsäureverwerter und zusätzlich 5 % methanogenen Archaea beimpft
- PI-Medium mit 5 % Propionsäureverwerter und nach zwei Wochen mit zusätzlich 5 % methanogenen Archaea beimpft
- PI-Medium mit 5 % methanogenen Archaea beimpft (Negativkontrolle)

Diese Kulturen wurden bei 39 °C inkubiert und wöchentlich jeweils eine HPLC-Probe genommen, um den Propionsäuregehalt während des Zellwachstums bestimmen zu können.

#### II.4.1 Medien zur Ermittlung des mikrobiellen Abbaus von Propionsäure

Für die Tests des mikrobiellen Abbaus von Propionsäure unterschiedlicher Mikroorganismenmischungen aus Propionsäure-abbauenden syntrophen Kulturen und hydrogenotrophen methanogenen *Archaea* wurde das Medium PI (Tabelle xy) verwendet, dem Propionsäure als einzige C-Quelle zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 39 °C im Inkubator.

#### II.4.2 Messung des Abbaus von Propionsäure durch Mikroorganismen

Mit einer HPLC wurde der Abbau der Propionsäure durch Mikroorganismenmischungen in PI-Medium gemessen. Die hierzu verwendete HPLC setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen, die in Tabelle 20 aufgeführt sind:

Tabelle 20: HPLC-Bestandteile zur Messung des Propionsäureabbaus durch Mikroorganismen.

Automatischer Probengeber	SIL-20A HT
Entgaser	DGU-20A3
Pumpen A und B	LC-20AD
Controller	CBM-20A
Iontauscher-Säule (in Ofen)	Prontosil C8SH <sup>1)</sup>
UV-VIS Detector	SPD-10A VP
Analyse-Software	LC-Solution

<sup>1)</sup> C8: Sulfanfolgruppen mit acht Kohlenstoffatomen in der Kette



Wöchentlich wurde 1 mL aus Kulturen entnommen und 20 min bei  $16,1 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert, um Zellen und Mediapartikel zu sedimentieren. Vom Überstand wurden 800  $\mu\text{L}$  in 32 x 11,6 mm Proben-Gefäße überführt und mit 8 mm Schraubkappen mit Silicon/PTFE Septum im Kappenloch verschlossen. Es war möglich, die genommenen Proben bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  über mehrere Wochen zu lagern, da der Propionsäuregehalt stabil blieb. Die genommenen Proben wurden in den automatischen Probengeber der HPLC gestellt. 20  $\mu\text{L}$  Injektions-Volumen wurden durch den automatischen Probengeber eingespritzt, mit dem Programm zur Auftrennung einiger Komponenten des Mediums über die Ionentauscher-Säule aufgetrennt und mit dem UV-VIS Detektor erfasst. Darauf folgte das Programm zum Waschen der Säule. Bei diesem Programm erfolgte ein Pufferwechsel über einen Gradienten. Zum Schluss wurde die für das erste Programm notwendige Pufferzusammensetzung wieder hergestellt und die Säule equilibriert. Die Programmparameter für die Messung des Propionsäuregehalts in den Medien PI sind in Tabelle 21 beschrieben (zeitlicher Ablauf von links nach rechts).

Tabelle 21: Programmablauf zur Messung des Propionsäuregehalts im Medium PI.

	<b>Auftrennung einiger Komponenten des Mediums</b>	<b>Puffergradient zum Waschen der Säule</b>	<b>Rückführung der Säule in Ausgangszustand</b>	<b>Equilibrieren der Säule</b>
Zeit [min]	14	2	1	15
50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4^-$ Puffer [%]	100	100-20	20-100	100
100 % Methanol-Puffer [%]	0	0-80	80-0	0
Durchflussrate [mL/min]	1	1	1	1

Um die Säule vollständig von Mediumsrückständen zu befreien, wurde das HPLC-System über Nacht mit Methanol gewaschen.

Es folgen in Tabelle 22 die Messdaten eines oben beschriebenen Versuchsansatz mit der Propionsäure-verwertenden Mischkultur Gp1 (Zusammensetzung siehe II.1.5) aus BGA Glahn und das hydrogenotrophe Eigenisolat in Reinkultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 (beschrieben in II.2.2) aus BGA Friedrich als Wasserstoff verbrauchender Mikroorganismus.

Tabelle 22: Verlauf des Propionsäuregehalts [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] in PI-Medium beimpft mit der syntrophen Mischkultur Gp1 ohne, beziehungsweise mit *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 (kurz: TAF1) und TAF1 als Negativkontrolle.

	Gp1 [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	Gp1 + TAF1 [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	Gp1 + TAF1W2 <sup>1)</sup> [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	TAF1 (Negativkontrolle) [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]
Start	18,5	17,6	18,3	17,9
Woche 1	18,2	17,2	18,3	17,9
Woche 2	17,4	16,7	16,7	18,0
Woche 3	15,5	14,6	13,9	17,9
Woche 4	14,1	12,6	11,8	17,7
Woche 5	11,0	6,6	8,1	17,7

1) W2 entspricht Zugabe von 5 % der stationären Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 nach zweiwöchiger Inkubation der Kultur Gp1

Die Werte in Tabelle 22 zeigen einen Abbau von Propionsäure in den Spalten Gp1, Gp1 + TAF1 und Gp1 + TAF1W2 (W2 entspricht Zugabe von 5 % der Kultur TAF1 nach zwei Wochen Inkubation) über einen Inkubationszeitraum von vier Wochen. Wie beabsichtigt, ließ sich während der Inkubation der Kontroll-Kultur *Methanobacterium formicicum* TAF1 in PI-Medium kein Propionsäureabbau feststellen (fünfte Spalte Tabelle 22). Das zeigte, dass die Konzentration von Propionsäure unter den oben erklärten Inkubationsbedingungen im Medium konstant blieb und *Methanobacterium formicicum* TAF1 in Reinkultur nicht in der Lage war, den Propionsäuregehalt abzubauen. In Abbildung 10 sind die oben tabellarisch aufgeführten Propionsäurekonzentrationen graphisch dargestellt, um den Abbau des Propionats besser überblicken zu können.

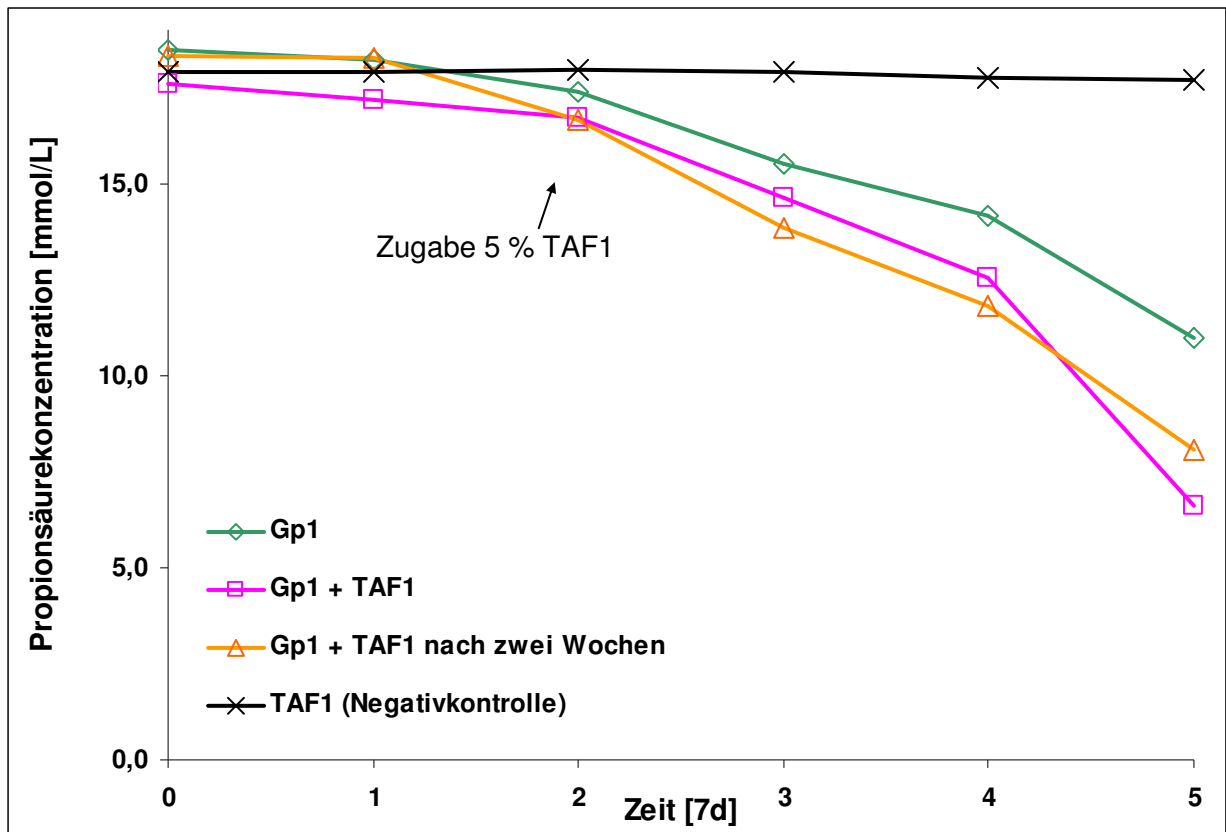


Abbildung 10: Abbau von Propionsäure [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] durch Mischkulturen Gp1 ( $\diamond$ ), Gp1+ *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 (TAF1;  $\square$ ), Gp1+TAF1W2 (W2 entspricht Zugabe von *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 nach zwei Wochen Inkubation;  $\Delta$ ) und TAF1 in PI-Medium als Negativkontrolle; x.

Abbildung 10 zeigt eine deutliche Verringerung der in Medium PI befindlichen Propionsäure im Gegensatz zum Inkubationsverlauf des Negativkontrollmediums PI, beimpft mit TAF1. Der Propionsäuregehalt der Kultur Gp1 ( $\diamond$ ) ohne TAF1 sinkt langsamer als der Gehalt der Kulturen Gp1 mit TAF1 ( $\square$ ) und Gp1 mit TAF1 nach zwei Wochen' ( $\Delta$ ), was eine Propionsäurekonzentration von  $11,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu lag der Propionsäuregehalt der Kultur ‚Gp1 + TAF1‘ nach fünfwöchiger Inkubation bei  $6,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  und bei Kultur ‚Gp1 mit TAF1 nach zwei Wochen‘ bei  $8,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Bei der Klärung der Effizienz des Zugabezeitpunkts der hydrogenotrophen Kultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 ist die folgende

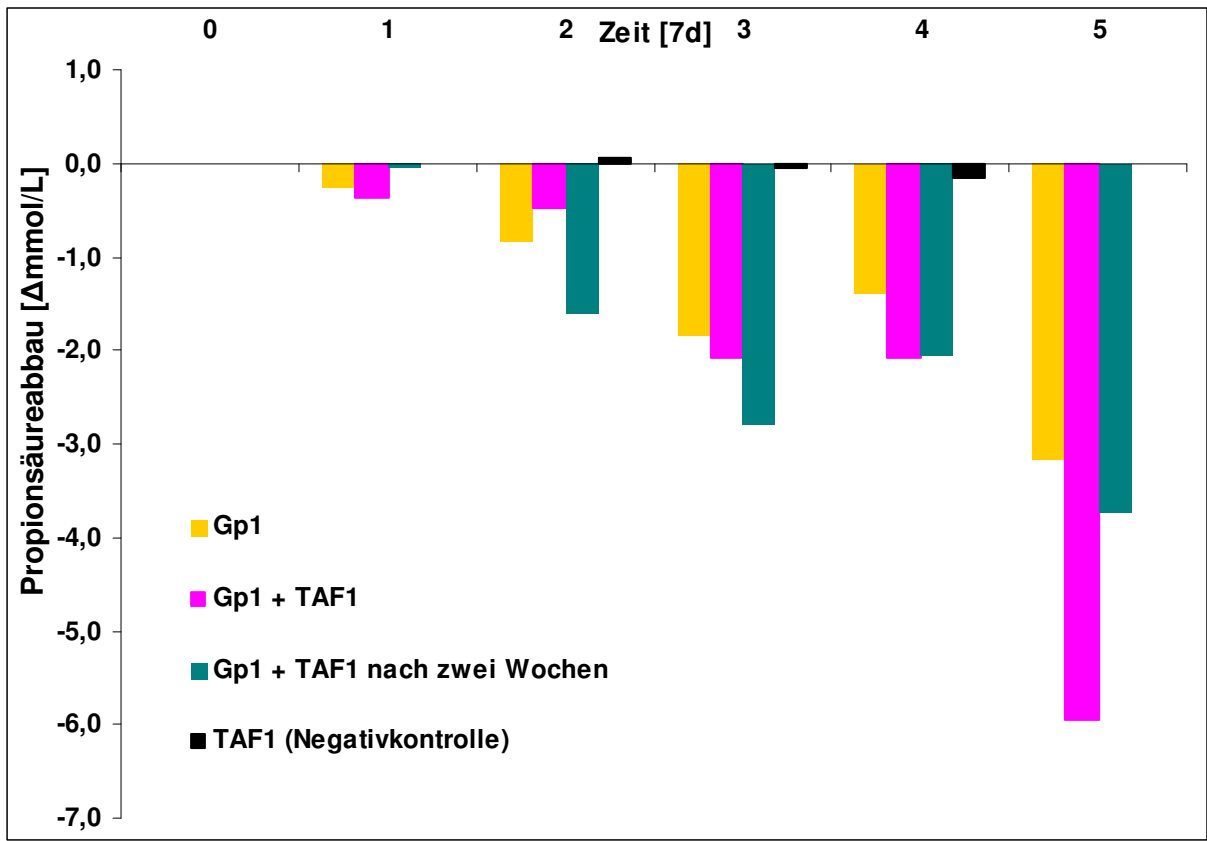


Abbildung 11 behilflich. Sie zeigt die Abbauraten der Propionsäure in  $\Delta$  mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>.

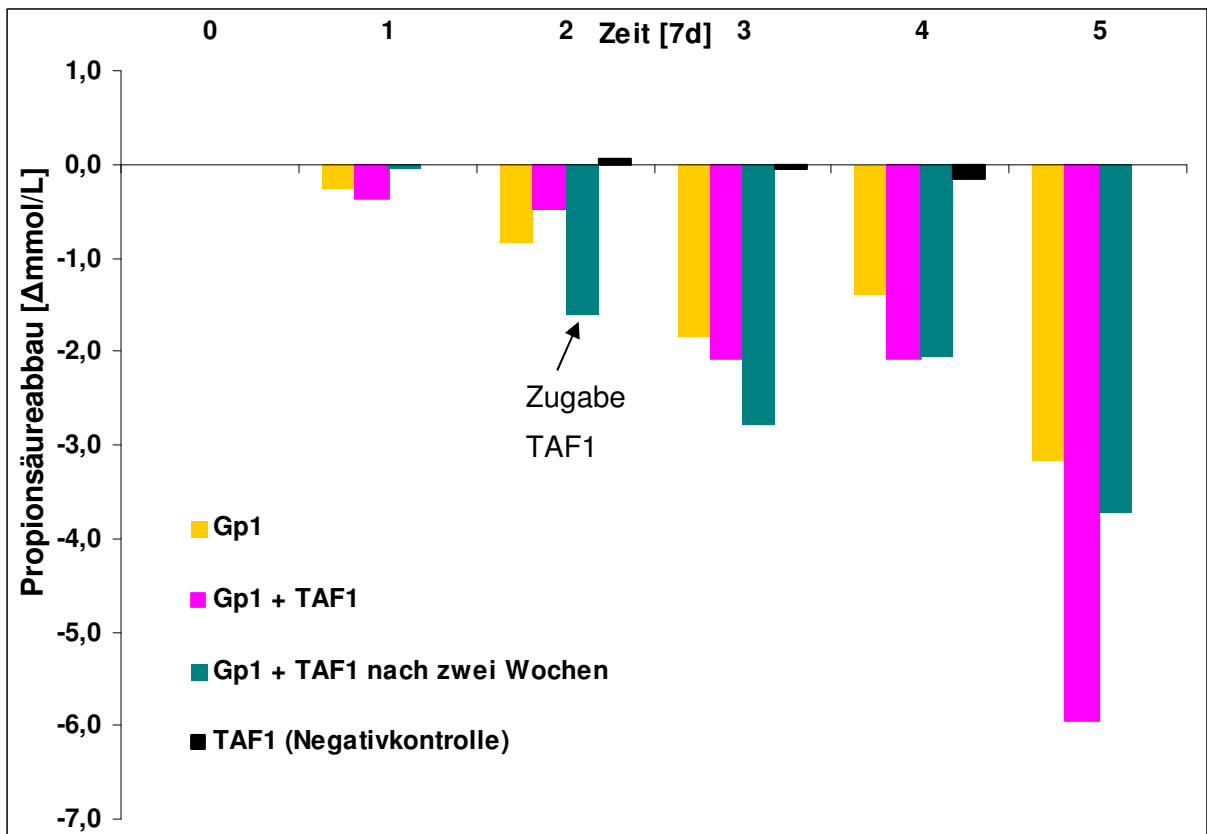


Abbildung 11: wöchentlicher Propionsäureabbau in  $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  der Kultur Gp1 (gelb), Gp1 + TAF1 (pink), Gp1 + TAF1W2 (türkis) und TAF1 als Negativkontrolle (schwarz)

Auch wenn Kultur ‚Gp1 + TAF1W2‘ (türkis) bereits ohne TAF1 nach Woche 1 im Vergleich zu den anderen Kulturen Gp1 (gelb) und Gp1 + TAF1‘ (pink) die meiste Propionsäure abbaute, legte Kultur Gp1 nach Zugabe von TAF1 am Tag des Abschlusses der zweiten Woche weiter an Aktivität zu (siehe Messung Woche 3). Die Propionsäurekonzentration nach fünf Wochen betrug  $8,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Dies ist auf die 5%ige Zugabe der stationären Reinkultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 zurückzuführen, da diese Kultur den beim Propionsäureabbau entstehenden Wasserstoff zu Methan verstoffwechselte (Daten nicht gezeigt), bevor der Wasserstoffpartialdruck den Vorgang des Propionsäureabbaus hemmen konnte. Der Vergleich des Propionsäuregehalts der Kulturen Gp1 + TAF1 ( $\square$ ) und Gp1 + TAF1W2 ( $\Delta$ ) in Abbildung 10 verdeutlicht, dass die Zugabe der Reinkultur *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 eine Effizienzsteigerung des Propionsäureabbaus zur Folge hatte.

## II.5 Testen von Starterkulturen in Versuchsfermentern

Im Verlauf des Projektes konnten verschiedene syntrophe Konsortien aus Praxisanlagen gewonnen werden. Nachdem der Abbau von Propionsäure im Labormaßstab mit definierten Medien nachgewiesen werden konnte, erfolgte in der nächsten Phase die Überprüfung der Kulturen unter praxisnahen Bedingungen.

### II.5.1 Versuchsreihe 1 – Zugabe nach erfolgter Säurebildung

Ziel des ersten Versuchsansatzes war es, bei zwei parallel betriebenen Biogas-Reaktoren durch eine schnelle Erhöhung der Fütterungsmenge eine Überbelastung des Fermentationsprozess zu simulieren. Nach einer verstärkten Akkumulation flüchtiger organischer Säuren, insbesondere von Propionsäure, erfolgte die Zugabe einer syntrophen Kultur zu einem Reaktor um mögliche Effekte hinsichtlich des Propionsäureabbaus zu beobachten. Die Untersuchungen wurden mit Pilot-Biogasfermenter im 100 l Maßstab durchgeführt (Arbeitsvolumen jeweils 80 l). Zum Einsatz kamen zwei baugleiche liegende Durchflussfermenter mit Zentralrührwerk (siehe Abbildung 12).



Abbildung 12: Durchfluss-Biogasfermenter im Halbtechnischen Maßstab (100 L).

Die doppelwandigen, aus Edelstahl gefertigten Reaktoren waren voll durchmischt und wurden bei einer konstanten Temperatur von 40 °C ( $\pm 1$  °C) betrieben. Die Reaktoren wurden parallel angefahren mit Fermenterflüssigkeit aus dem Nachgärer einer Praxisanlage welche ohne Zusatz von Spurenelementen oder sonstigen Supplementen betrieben wird. Als Substrate wurden den Fermentern Maissilage und Rindergülle zugegeben. Die chemische Charakterisierung der Einsatzstoffe ist in Tabelle 23 angegeben. Nach einer 15-tägigen Anfahrphase folgte zunächst eine Stabilisierungsphase von 45 Tagen.

Tabelle 23: Chemische Charakterisierung der Einsatzstoffe (Versuchsansatz 1).

<b>Substrat</b>	<b>TM*</b> [%]	<b>Glühverlust</b> [% TM]	<b>oTM*</b> [%]	<b>pH</b>	<b>Milchsäure</b> [mg/kg]	<b>FOS**</b> [mg/kg]	<b>Ethanol</b> [mg/kg]	<b>NH4-N</b> [mg/kg]
Impfslamm	7,68	79,1	6,07	7,72	-	< 50	-	2117
Maissilage	31,9	95,9	30,6	3,57	25077	2830	3513	-
Rindergülle	7,93	82,7	6,56	6,96	-	6684	-	1810

\* korrigiert um den Gehalt an flüchtigen organischen Säuren und Ethanol; \*\* flüchtige organische Säuren

Im Rahmen der Stabilisierungsphase wurde beiden Fermentern täglich 700 g Maissilage und 500 g Rindergülle zugeführt, hieraus resultierte eine organische Faulraumbelastung von 3,1 und eine hydraulische Verweilzeitzeit von ca. 66 Tagen. Zur Prozesskontrolle wurden im Verlauf der Fermentation regelmäßig die in Tabelle 24 angegebenen Parameter bestimmt.

Tabelle 24: Parameter zur Überprüfung der Prozessstabilität.

Parameter	Untersuchungsintervall		Methodik
	täglich	wöchentlich	
Gasproduktion	X		Trommelgaszähler
Methangehalt	X		Methan-IR Sensor
pH-Wert	X		pH-Einstabmesskette
Flüchtige organische Säuren		X	gaschromatographisch
NH <sub>4</sub> -N		X	titrimetrisch
Trockenmasse		X	gravimetrisch (Trockenschrank 105 °C)
Organische Trockenmasse		X	gravimetrisch (Muffelofen 550 °C)

Im Verlauf der Stabilisierungsphase erreichte Reaktor FA einen durchschnittlichen Biogasertrag (ohne Berücksichtigung der Anfahrphase) von 597,5 NI/kg oTM Biogas, Reaktor FB produzierte im gleichen Zeitraum 594,6 NI/kg oTM (siehe Abbildung 13). Die ermittelten durchschnittlichen Methangehalte im produzierten Biogas wiesen keine signifikanten Abweichungen auf (52,7 % Reaktor FA; 52,4 % Reaktor FB). Auch bei den weiteren untersuchten Prozessparametern zeigte sich eine hohe Übereinstimmung, insbesondere waren keine erhöhten Gehalte an flüchtigen organischen Säuren im Verlauf der Stabilisierungsphase feststellbar. Auf dieser Basis konnte für die folgende Belastungsphase und Zugabe der Mikroorganismen von gleichen Ausgangsbedingungen ausgegangen werden.

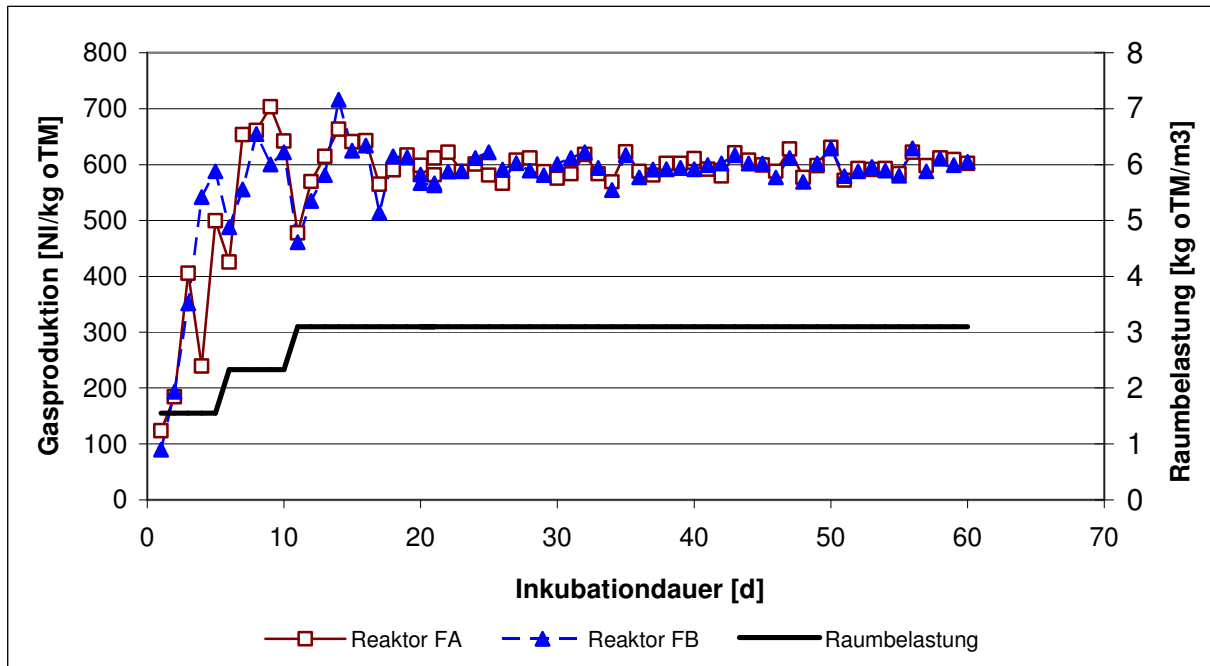


Abbildung 13: Gasproduktion der Reaktoren FA und FB während der Anfahr- und Stabilisierungsphase (Versuchsansatz 1).

Nach Abschluss der Stabilisierungsphase erfolgte der Belastungstest mit einer Erhöhung der Raumbelastung in kurzen Intervallen. Innerhalb von 5 Tagen wurde die Raumbelastung stufenweise von 3,1 auf 5,2 erhöht. In der Belastungsphase wurden die Konzentrationen der Essigsäure und Propionsäure täglich gemessen (siehe Abbildung 14).



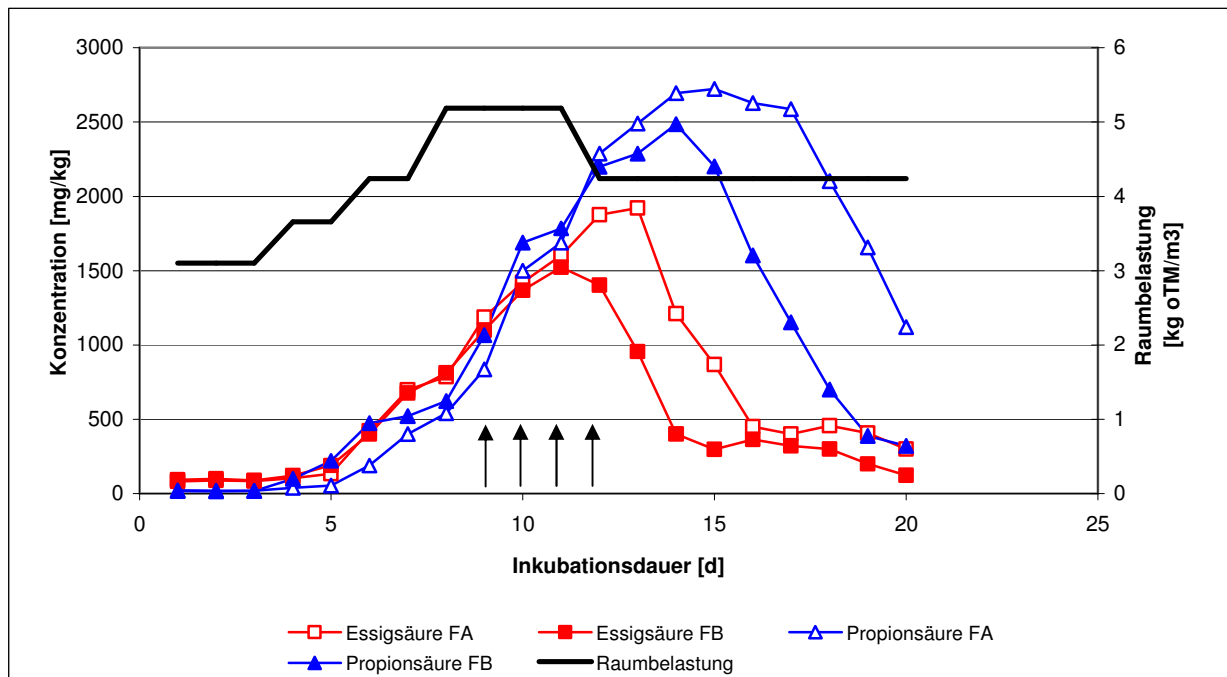


Abbildung 14: Entwicklung der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen der Reaktoren FA und FB während der Belastungsphase (Versuchsansatz 1). Pfeile markieren die Zugabe von jeweils 10 ml der Kultur AP1 zu Reaktor FB.

Bei beiden Reaktoren zeigte sich schnell eine deutliche Zunahme der flüchtigen organischen Säuren, zunächst der Essigsäure und anschließend mit einer leichten Verzögerung der Propionsäure. Nachdem die Propionsäurekonzentration jeweils 1000 mg/kg überschritten hatte, wurde Reaktor FB an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 mL der Kultur AP1 zugegeben. Die Kulturen waren 21 Tage vorher angeimpft worden und wiesen zum Zeitpunkt des Einsatzes eine Gesamtzellzahl von ca.  $2 \cdot 10^8$  je mL auf. Bezogen auf das Arbeitsvolumen des Reaktors ergab sich hieraus aus Zugabe von ca.  $1 \times 10^5$  Zellen je mL Fermenterflüssigkeit. Zunächst war kein Effekt durch die Zugabe der Mikroorganismen feststellbar, bei beiden Reaktoren zeigte sich ein weiterer Anstieg der Säurekonzentrationen. Um eine zu starke Versäuerung der Reaktoren zu verhindern wurde die Raumbelastung nach 4 Tagen von 5,2 auf 4,2 reduziert. Auch nach der Reduzierung stiegen die Propionsäurekonzentrationen beider Reaktoren zunächst weiter an. Bei Reaktor FB war allerdings bereits ein Rückgang der Essigsäurekonzentration zu beobachten, welche von Maximalwert von ca. 1500 mg/kg innerhalb von 3 Tagen auf weniger als 500 mg/kg zurückging. Auch bei Reaktor FA war ein Rückgang der Essigsäurekonzentration feststellbar, allerdings im Vergleich deutlich verzögert (siehe Abbildung 14). Zudem lag der ermittelte Maximalwert mit knapp 2000 mg/kg deutlich höher als bei Reaktor FB. Ein signifikanter

Unterschied zwischen den Vergleichsreaktoren war auch in der weiteren Entwicklung der Propionsäurekonzentrationen feststellbar. Bei Reaktor FB setzte der Rückgang deutlich früher ein und war wesentlich stärker ausgeprägt. So war die Konzentration sechs Tage nach Zugabe der Mikroorganismen bereits auf 700 mg/kg gefallen, zum gleichen Zeitpunkt wies Reaktor FA noch mehr als 2000 mg/kg Propionsäure auf. Auf Grundlage des ersten Versuchsansatzes konnte somit ein signifikanter Einfluss der zugegebenen Mikroorganismen auf die Versäuerungscharakteristik im Rahmen des Belastungstests nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich auch, dass ein beschleunigter Abbau erst mit einer Verzögerung von mehreren Tagen einsetzt. Dies dürfte im Wesentlichen auf das relativ langsame Wachstum der eingesetzten Mikroorganismen zurückzuführen sein. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage inwieweit eine frühere Zugabe der Organismen möglicherweise eine verstärkte Versäuerung verhindern kann. Diese Fragestellung wurde im Rahmen eines weiteren Versuchsansatzes untersucht.

## II.5.2 Versuchsreihe 2 – Zugabe vor Säurebildung

Für den zweiten Versuchsansatz wurden die Reaktoren zunächst geleert und komplett neu angefahren. Bezüglich der Einsatzstoffe ergaben sich im Vergleich zum ersten Versuchsansatz Abweichungen da neue Substrate eingesetzt wurden. Die chemische Charakterisierung ist in Tabelle 25 angegeben.

Tabelle 25: Chemische Charakterisierung der Einsatzstoffe (Versuchsansatz 2).

<b>Substrat</b>	<b>TM*</b> [%]	<b>Glühverlust</b> [% TM]	<b>oTM*</b> [%]	<b>pH</b>	<b>Milchsäure</b> [mg/kg]	<b>FOS**</b> [mg/kg]	<b>Ethanol</b> [mg/kg]	<b>NH4-N</b> [mg/kg]
Impf Schlamm	7,88	79,9	6,30	7,77	-	< 50	-	1917
Maissilage	29,3	96,4	28,2	3,62	20077	3130	2013	-
Rindergülle	8,42	81,7	6,88	7,05	-	5608	-	1986

\* korrigiert um den Gehalt an flüchtigen organischen Säuren und Ethanol; \*\* flüchtige organische Säuren

In gleicher Weise wie bei Versuchsansatz 1 erfolgte nach einer 15-tägigen Anfahrphase eine Stabilisierungsphase von 45 Tagen. Aufgrund der veränderten Substratcharakteristik der Einsatzstoffe ergaben sich leichte Änderungen in der Spezifikation des Fermentationsansatzes. Die täglich zugegebene Menge Maissilage belief sich auf 750 g und die zugeführte Rindergülle auf 450 g, hieraus ergab sich eine leicht reduzierte Raumbelastung von 3,0 bei gleicher

hydraulischer Verweilzeit von ca. 66 Tagen. Die Überprüfung der Prozessparameter erfolgte in gleicher Weise wie bei Versuchsansatz 1 (siehe Tabelle 23). Bezüglich der ermittelten durchschnittlichen Gaserträge während der Stabilisierungsphase zeigten sich im zweiten Ansatz 611,7 NI/kg oTM bei Reaktor FA und 616,1 bei Reaktor FB (siehe Abbildung 15). Die regelmäßige Überprüfung der Prozessparameter ergab keine signifikanten Abweichungen zwischen den Vergleichsfermentern.

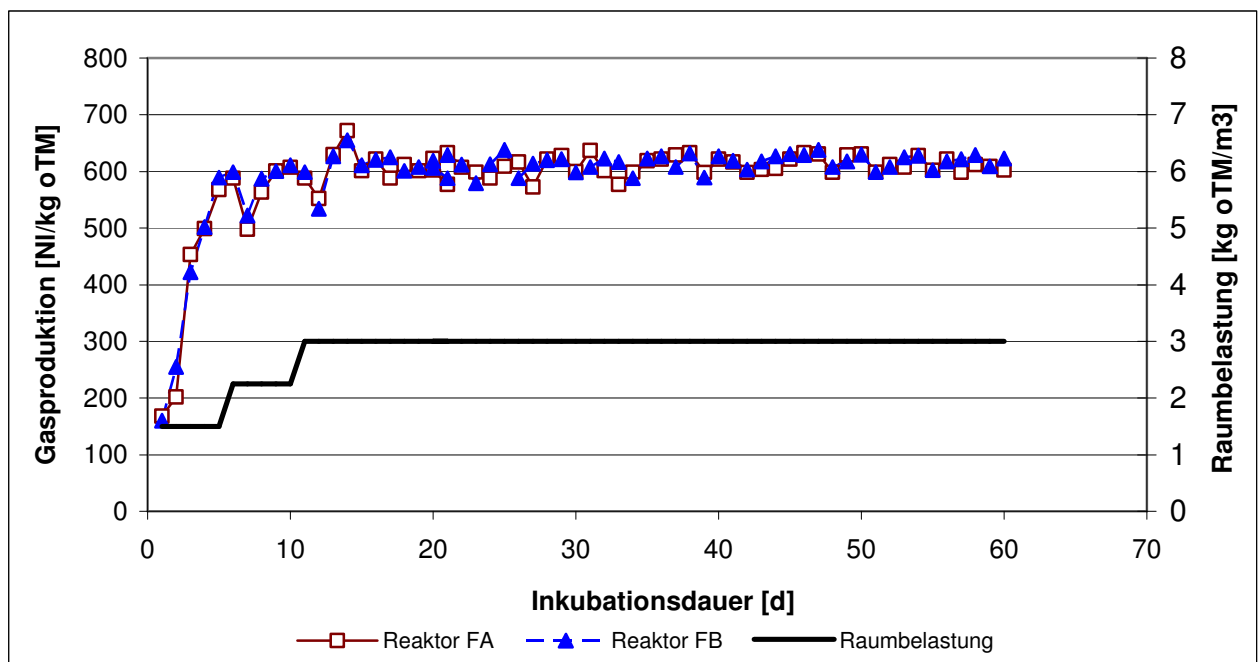


Abbildung 15: Gasproduktion der Reaktoren FA und FB während der Anfahr- und Stabilisierungsphase (Versuchsansatz 2).

Im Rahmen des zweiten Versuchsansatzes erfolgte die Zugabe der Kultur AP1 bereits zum Ende der Stabilisierungsphase. Analog zum Versuchsansatz 1 wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 mL der Kultur zugegeben (siehe Abbildung 16).

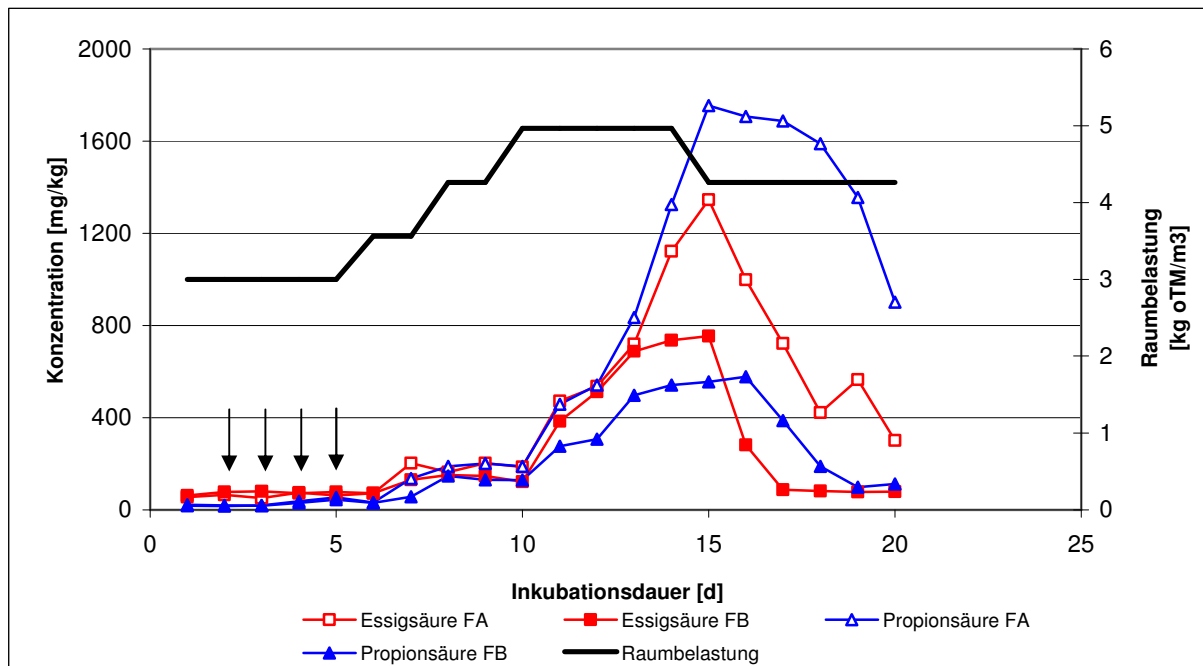


Abbildung 16: Entwicklung der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen der Reaktoren FA und FB während der Belastungsphase (Versuchsansatz 2). Pfeile markieren die Zugabe von jeweils 10 mL der Kultur AP1 zu Reaktor FB.

Im Verlauf des zweiten Belastungstests zeigte sich zunächst eine weniger stark ausgeprägte Säurebildung als bei Versuchsansatz 1. Deutlich wird dies anhand des Kontrollreaktors FA (ohne Zusatz), bei dem die Säurebildung erst bei der höchsten Belastungsstufe verstärkt einsetzte und im weiteren Verlauf niedrigere Maximalwerte auftraten. Der Effekt der Zugabe von Kultur AP1 zu Reaktor FB zeigte sich während der höchsten Belastungsstufe. So fiel der Anstieg der Essigsäure, insbesondere aber der Propionsäure, deutlich geringer aus als bei Reaktor FA. Maximal wurden bei Reaktor FB im Verlauf rund 750 mg/kg Propionsäure gemessen während bei Reaktor FA in der Spitze ca. 1800 mg/kg auftraten. Deutlich wird auch der relativ schnelle Rückgang der Säurekonzentrationen auf Werte <100 mg/kg nach der Reduzierung der Raumbelastung.

## II.6 Entwicklung von Sondenkits und PCR-Methoden

Das Arbeitspaket 6 umfasste die Entwicklung von stammspezifischen DNA-Sonden sowie spezieller PCR-Techniken zur Quantifizierung bestimmter Spezies. Auf der Basis der Projektplanung wurden die Arbeiten mit Beginn des dritten Projektjahres aufgenommen.

Um stammspezifische DNA-Sonden zu entwickeln, wurden eine Charakterisierung der Kulturen mit Propionsäure-abbauern aus Biogasanlagen (BGAs) vorgenommen, indem das Substratverhalten getestet wurde, eine phylogenetische Charakterisierung der Mikroorganismen in den Propionsäure abbauenden Kulturen und Isolierungen durchgeführt wurden, um Hinweise zu erlangen, welche Mikroorganismenspezies in den Kulturen Propionsäure abbauen.

### II.6.1 Charakterisierung des Substratverhaltens Propionsäure-abbauender Starterkulturen aus Biogasanlagen mit Fumarat

Die substratspezifische Charakterisierung Propionsäure-abbauender Kulturen aus BGA's belief sich auf die Ermittlung des Substratverhaltens der Starterkulturen mit Fumarsäure neben Propionsäure im Medium PI. Stams *et al.* (1993) veröffentlichte, dass Propionsäure oxidierende Bakterien in Mischkultur aus einem Laborfermenter durch Zugabe von 40 mM Fumarsäure ins Medium Propionsäure abbauen, ohne synthrophe Kultivierung mit methanogenen Archaea. Dabei wurde die Methanogenese mit Acetat durch 5 mM Bromoethansulfonsäure inhibiert (Scholten *et al.* 2000, Zinder *et al.* 1984). Bromoethansulfonsäure ist ein strukturell analoges Molekül zu 2-Mercaptoethansulfonsäure (Coenzym M) (Smith *et al.* 1981). Die flüchtigen Säuren wurden chromatographisch mit Hilfe eines HPLC-Systems ermittelt. Die verwendete HPLC setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen.

Tabelle 26: Anlagen-Komponenten des HPLC-Systems (Shimadzu, Japan):

Automatischer Probengeber	SIL-20A HT
Entgaser	DGU-20A3
Pumpen A und B	LC-20AD
Controller	CBM-20A
Vorsäule (in Ofen)	Prontosil C18SH <sup>1)</sup>
Ionentauscher-Säule (in Ofen)	Prontosil C8SH <sup>1)</sup>
RI-Detektor	ERC-7515B
Software	LC-Solution

<sup>1)</sup> C8/18: Sulfanolverbindungen mit acht/achtzehn Kohlenstoffatomen in der Kette

Eine externe Standardmischung aus 1 g/L Essigsäure, 1 g/L Fumarsäure, 1 g/L Bernsteinsäure und 2 g/L Propionsäure in Wasser wurde bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Empfindlichkeit des RI Detektors wurde auf  $0,5 \cdot 10^{-5}$  RIU/F.S. und die Temperatur der Messzelle auf 45 °C gestellt. Mit dem RI Detektor wurde folgendes Arbeitsprogramm dem HPLC-System vorgegeben: 20 µL

Injektionsvolumen wurden durch den automatischen Probengeber in das HPLC-System gespritzt. Das injizierte Volumen wurde mit einem 12 minütigen Programm zur Auftrennung des Mediums über die Ionentauscher-Säule aufgeteilt und mit dem RI Detektor erfasst. Die Proben wurden direkt hintereinander gemessen. Die Programmparameter für die Messung des Propionsäuregehalts in den Medien PI mit einem RI Detektor sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Programmablauf zur RI Messung des Propionsäuregehalts im Medium PI.

<b>Programmschritt</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer [%]</b>	<b>100 % Methanol [%]</b>	<b>Durchflussrate [mL · min<sup>-1</sup>]</b>
Probenauftrennung	12	100	0	1
Waschschritt ü. N.	ü.N. <sup>1</sup>	10	90	0,05
Equilibrieren der Säule		100	0	1

<sup>1</sup> Nach spätestens 10 h Laufzeit über Nacht mit 90 % Methanol mit einer Flussrate von 0,05 mL · min<sup>-1</sup> equilibriert, um die Säule vollständig von Mediumrückständen zu befreien.

Das Waschen der Säule erfolgte über Nacht mit 90 % 100 %igem Methanol und 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer bei einer Durchflussrate von insgesamt 0,2 mL · min<sup>-1</sup>. Am nächsten Messtag wurde die Säule wieder equilibriert, indem 100 % 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer mit einer Durchflussrate von 1 mL · min<sup>-1</sup> über die Säule liefen.

Es folgen Tabellen und Abbildungen, in welchen exemplarisch die Messdaten von dem oben beschriebenen Versuchsansatz mit den Propionsäure-verwertenden Kulturen Fp1 aus BGA Friedrich, Wp1 und Wp2 aus BGA Wagner, Gp1 aus BGA Glahn, Ap1 und Ap3 aus BGA Arenrath zum einen mit 40 mM Fumarat („Kulturname‘a) und zum anderen mit 40 mM Fumarat und 5 mM Bromoethansulfonsäure („Kulturname‘b) im Medium besprochen werden.

Tabelle 28: Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Fp1a in [mmol · L<sup>-1</sup>].

Messpunkt [7d] <sup>1</sup>	Acetat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Succinat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Fumarat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Propionsäure [mmol · L <sup>-1</sup> ]
Start	1,0	0,0	20,7	18,5
2	1,5	0,1	10,2	20,5
4	1,9	0,0	7,8	19,7
5	2,3	0,1	8,0	20,7
6	2,2	0,2	6,6	19,3
7	2,6	0,4	6,9	18,9
8	3,8	0,5	5,9	17,7
9	4,4	0,7	5,3	15,8
10	5,9	0,8	5,0	14,5

<sup>1</sup> [7d] entspricht einer Woche

Die deutlichste Substratverwertung erfuhr Fumarat, welches durch die Kultur Fp1a innerhalb von zwei Wochen auf die Hälfte abgebaut wurde. Ab Woche sechs lässt sich aus den Werten der Tabelle 28 ein Propionsäureabbau ablesen, mit gleichzeitiger Akkumulation des Acetats. Succinat reicherte sich während der gesamten Messzeit nicht signifikant im Medium der Kultur Fp1a an.

Um einen eingehenderen Blick in das Substratverhalten der Kultur Fp1a über die Dauer der Messungen zu erhalten, zeigt Abbildung 17 die in Tabelle 28 beschriebenen Werte der gemessenen Substratgehalte in der Kultur Fp1a einem Graphen.

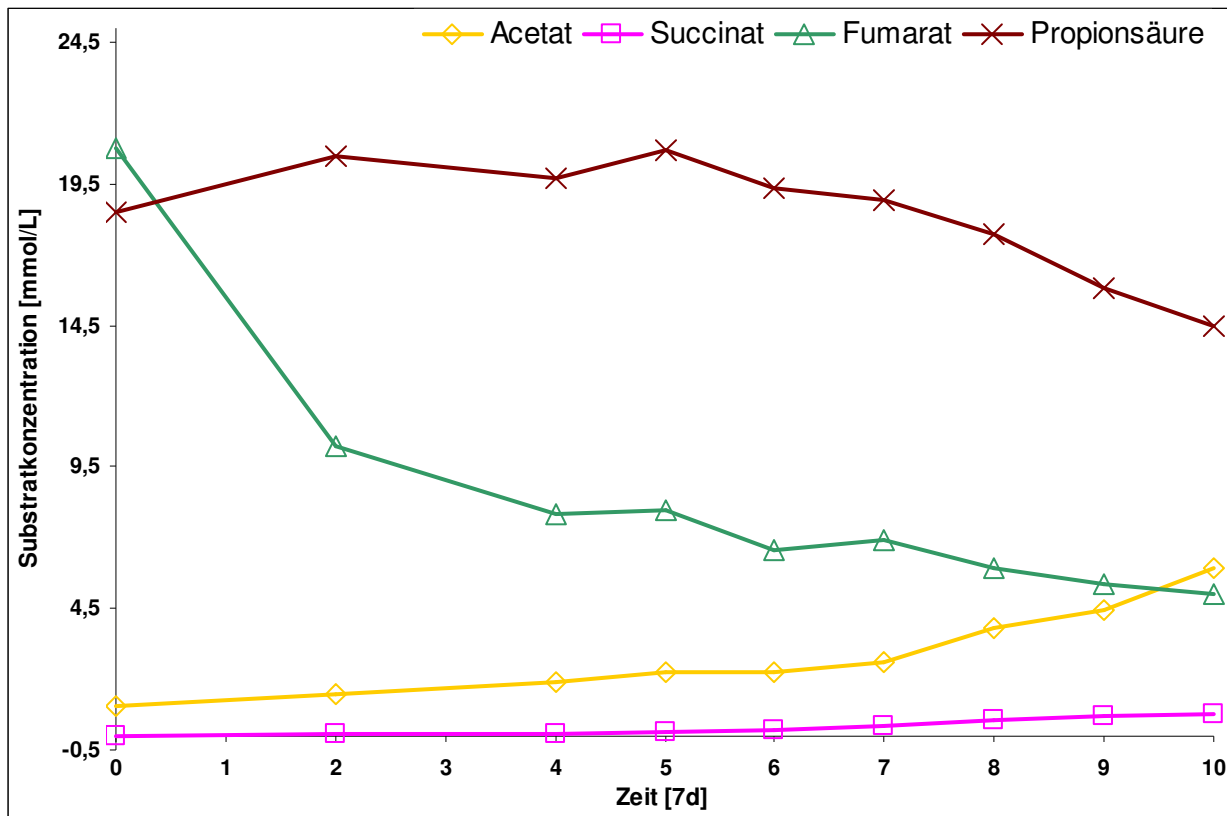


Abbildung 17: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium in  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  gegen die Zeit [7d] der Kultur Fp1a, mit Zusatz von  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Fumarat im Medium; Zeichen: Gehalt von  $\square$  = Acetat,  $\diamond$  = Succinat,  $\Delta$  = Fumarat,  $\circ$  = Propionat im zellfreien Kulturmedium.

Zunächst baute die Kultur Fp1a Fumarat ab. Der Succinatgehalt reicherte sich während der gesamten Inkubationszeit nicht äquivalent im Medium an (Stams *et al.* 1993). Ein geringer Anstieg des Acetatsgehalts im Medium der Kultur Fp1a wurde detektiert. Nach der fünften Woche setzte der Propionsäureabbau ein, was eine leichte Erhöhung der Akkumulationsrate des Acetats zur Folge hatte (Abbildung 17). Allerdings zeigte sich keine stöchiometrisch erwartete Akkumulation des Acetats was in Abbildung 18 verdeutlicht wird.



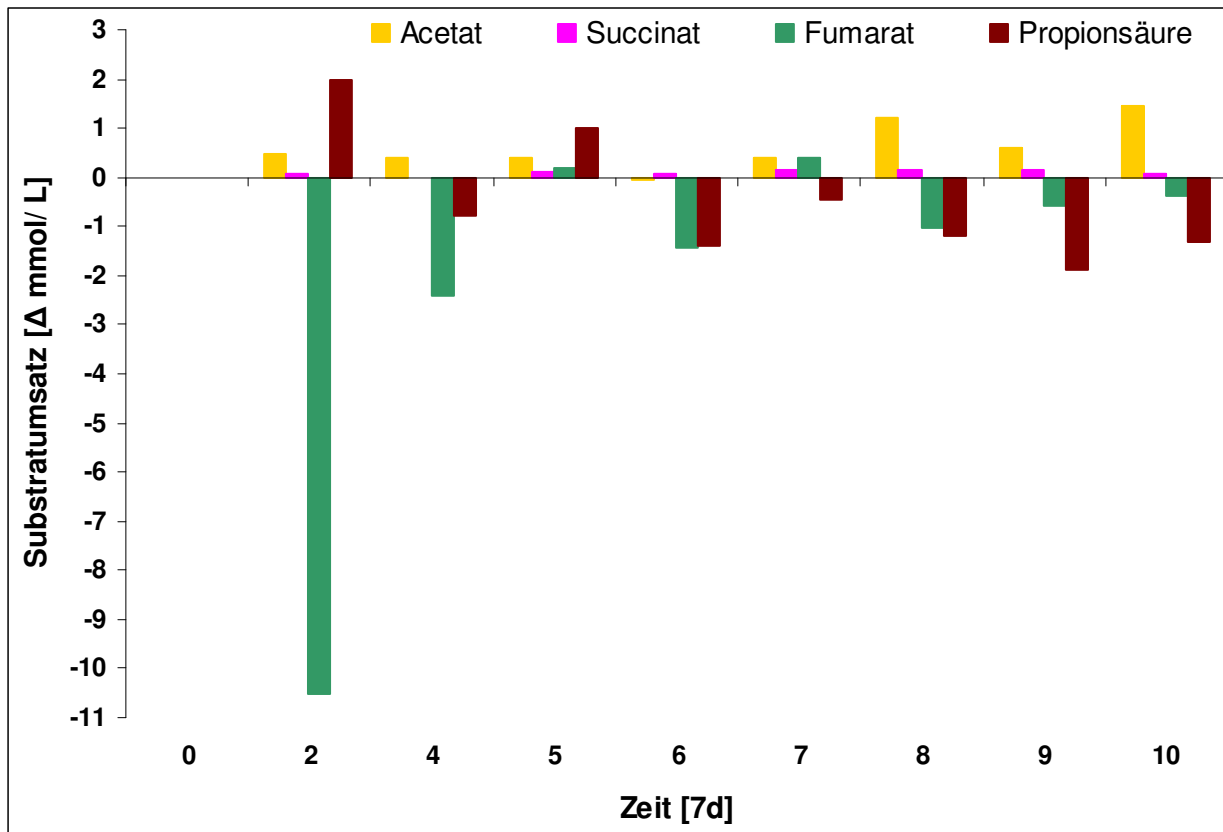


Abbildung 18: zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Fp1a gegen die Zeit [7d]; gelb = Acetatumsatz, pink = Succinatumsatz, türkis = Fumaratumsatz, braun = Propionsäureumsatz.

Die geringen Akkumulationen des Succinats und des Acetats lassen vermuten, dass diese Zwischensubstrate entweder teilweise von Mikroorganismen abgebaut wurden, oder Fumarat zu einem anderen Produkt umgesetzt wurde. Für den Abbau von Acetat könnten acetoclastische methanogene Archaea verantwortlich sein, was archeale 16S-rDNA Analysen der Kultur Fp1a bestätigten (Daten nicht gezeigt).

Die Kulturen Fp1b und Wp2b zeigten ein vergleichbares Substratverhalten wie Kultur Fp1a (Daten nicht gezeigt). Die Kulturen Wp2a (laut 16S-rDNA Analysen, keine methanogenen Archaea in Kultur, Daten nicht gezeigt), Ap3a und Ap3b zeigten vergleichbare Fumaratabbauraten wie die Kultur Fp1a, mit dem einen Unterschied, dass kein Propionsäureabbau einsetzte (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgend ist das Substratverhalten der Kulturen Gp1a und Gp1b beginnend mit Tabelle 29 anhand der Kultur Gp1a erläutert.

Tabelle 29: Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Gp1a in [mmol·L<sup>-1</sup>].

Messpunkt [7d] <sup>1</sup>	Acetat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Succinat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Fumarat [mmol · L <sup>-1</sup> ]	Propionsäure [mmol · L <sup>-1</sup> ]
Start	1,1	0,0	16,6	17,2
2	7,1	3,8	4,4	19,2
4	6,5	10,9	0,0	18,0
5	6,6	10,7	0,0	17,7
6	7,3	10,7	0,0	17,6
7	7,6	12,3	0,0	18,0
8	7,8	12,3	0,0	17,9
9	6,7	11,6	0,0	17,7
10	6,8	11,7	0,0	18,5

<sup>1</sup> [7d] entspricht einer Woche

Bei der Betrachtung der Werte in Tabelle 29 fällt der vollständige Abbau des Fumarats innerhalb von vier Wochen auf. Korrelierend zeigt Tabelle 29 die steigenden Werte des Succinats und des Acetats. Die Werte des Propionats schwankten während der gesamten Messdauer um den ursprünglichen Wert zu Beginn der Testreihe. Zur Veranschaulichung sind die in Tabelle 29 aufgelisteten Werte graphisch in Abbildung 19 aufgezeigt.

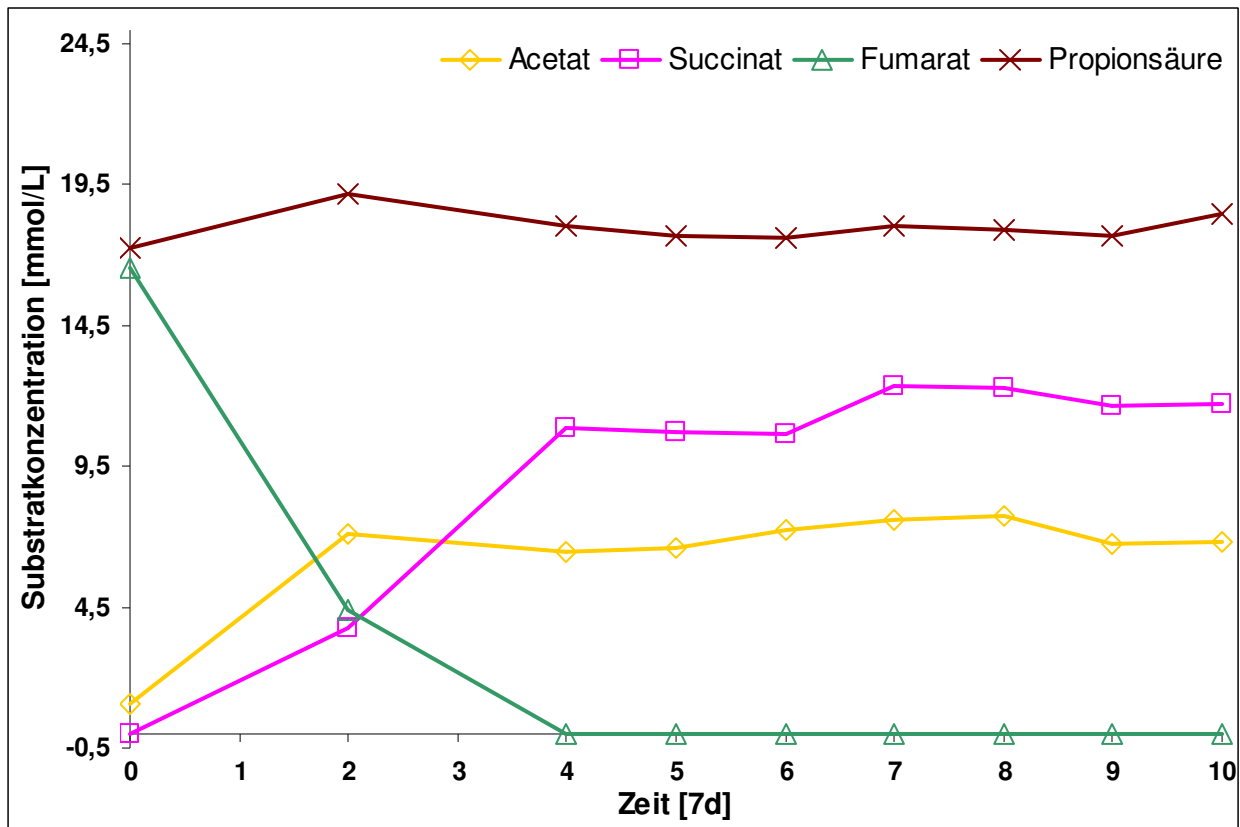


Abbildung 19: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium in  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  gegen die Zeit [7d] der Kultur Gp1a, mit Zusatz von  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Fumarat im Medium; Zeichen: Gehalt von  $\square$  = Acetat,  $\diamond$  = Succinat,  $\Delta$  = Fumarat,  $\circ$  = Propionat im zellfreien Kulturmedium.

Abbildung 19 zeigt das Substratverhalten der Kultur Gp1a. Die Graphik verdeutlicht, dass Fumarat durch die Kultur Gp1a zum einen zu Succinat und zum anderen zu Acetat verstoffwechselt wurde. Um die Verhältnismäßigkeiten der Verstoffwechslung des Fumarats zu Succinat und Acetat herauszustellen, zeigt die Abbildung 20 die Substratumsätze der Kultur Gp1a.

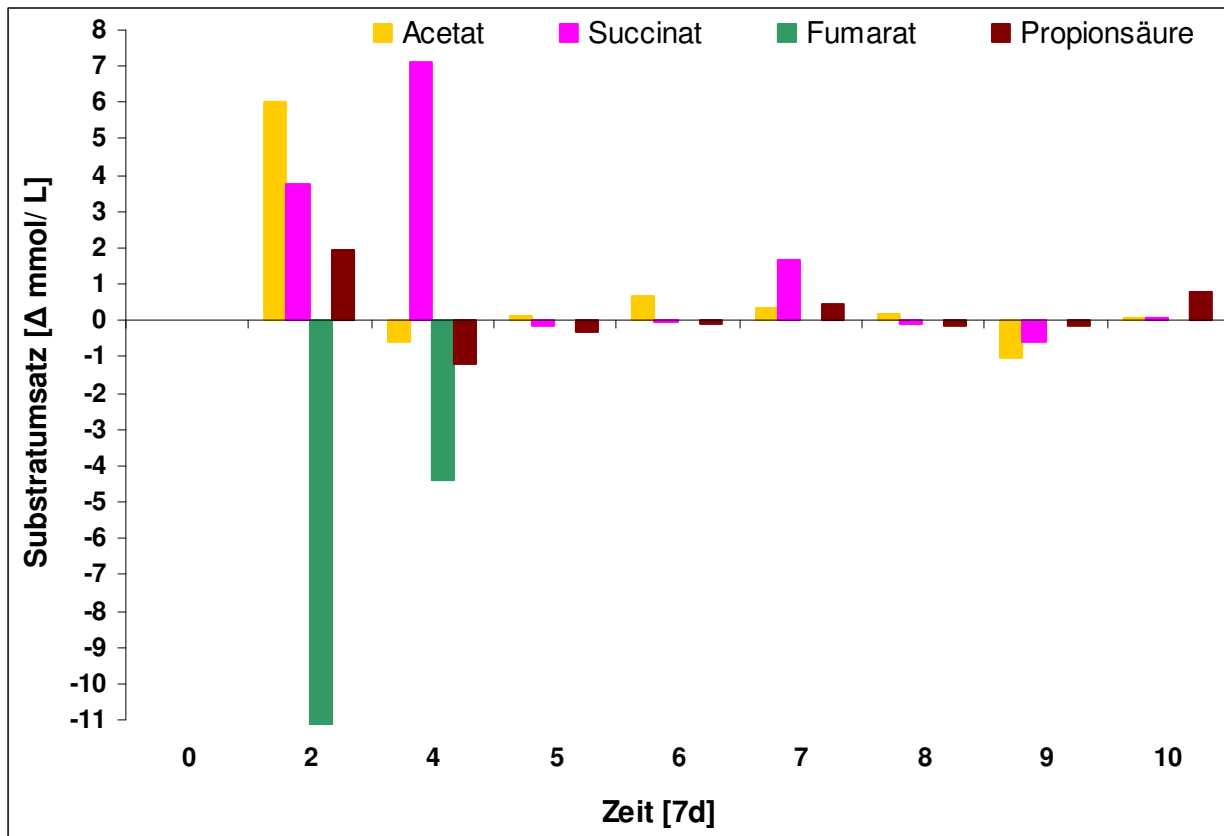


Abbildung 20: zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Gp1a gegen die Zeit [7d]; gelb = Acetatumsatz, pink = Succinatumsatz, türkis = Fumaratumsatz, braun = Propionsäureumsatz.

Fumarat wurde in den ersten beiden Inkubationswochen im Verhältnis 3:2 zu Acetat und Succinat umgesetzt. Das Verhältnis von 1:1 Umsatz des Fumarats in Acetat und Succinat übersteigenden Mengen Acetat könnten aus dem im Reaktorfiltrat enthaltenen Glycerin (Daten nicht gezeigt) gebildet worden sein. Einige Arten der Sulfatreduzierer sind befähigt, Acetat aus Glycerin herzustellen (Dinkel *et al.* 2010). Die folgenden zwei Wochen wurde Fumarat restlos zu Succinat umgesetzt, wobei die Anreicherung des Acetats stagnierte, was auf weitere Aktivität der Sulfatreduzierer und/ oder acetoclastischen methanogenen Archaea hindeutet, welche Acetat zur Sulfatreduktion nutzen beziehungsweise aus Acetat Methan herstellen. Qualitative Methanmessungen haben jedoch in der Gasphase über Kultur Gp1 kein Methan ergeben (Daten nicht gezeigt). Während des gesamten Versuchs, wurde kein signifikanter Umsatz von Propionsäure durch die Kultur Gp1a ermittelt. Kultur Gp1b verhielt sich wie die Kultur Gp1a, mit dem Unterschied, dass der Gesamtumsatz niedriger ausfiel.

Eine weitere Variante eines Substratverhaltens mit zusätzlichem Fumarat im PI-Medium zeigte Kultur Ap1a. Tabelle 30 zeigt die Molmassen pro Liter der Kultur Ap1a.

Tabelle 30: Durchschnittlicher Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure im zellfreien Medium pro Messpunkt der Kultur Ap1a in [mmol·L<sup>-1</sup>].

<b>Messpunkt [7d]<sup>1</sup></b>	<b>Acetat [mmol · L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Succinat [mmol · L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Fumarat [mmol · L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Propionsäure [mmol · L<sup>-1</sup>]</b>
Start	0,00	0,00	13,10	16,46
2	1,90	0,00	11,62	19,98
4	3,04	0,00	9,79	16,70
5	0,00	0,00	8,07	11,37
6	0,00	0,58	6,90	4,50
7	0,00	1,54	5,92	0,00
8	0,00	1,97	4,80	0,00
9	1,02	2,28	4,71	0,00
10	0,00	2,47	3,46	0,00

<sup>1</sup> [7d] entspricht einer Woche

Auffallend ist, dass die Kultur Ap1a ab der zweiten Woche im Vergleich zu den bereits vorgestellten Substratverhalten der Kulturen Fp1a und Gp1a Propionsäure massiv abbaut. Eine vergleichbare Akkumulation eines gemessenen Produkts war nicht messbar. Um eine einfachere Interpretation der Messwerte zu ermöglichen, sind die Werte (Tabelle 30) zur Veranschaulichung in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

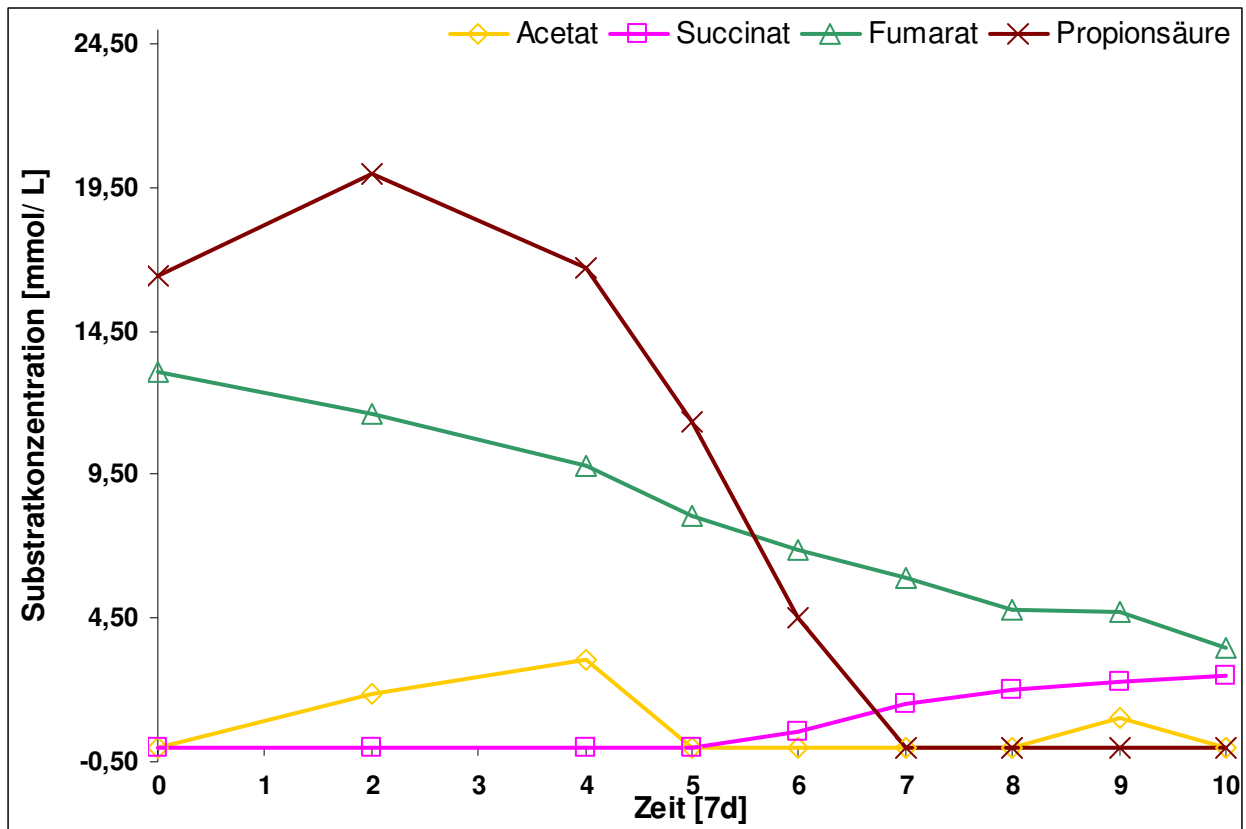


Abbildung 21: Gehalt von Acetat, Succinat, Fumarat und Propionsäure in zellfreiem Kulturmedium [ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ] gegen die Zeit in Wochen [7d] der Kultur Ap1a mit Zusatz von  $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Fumarat, und  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BrES; Zeichen: Gehalt von  $\square$  = Acetat,  $\diamond$  = Succinat,  $\Delta$  = Fumarat,  $\circ$  = Propionat im zellfreien Kulturmedium.

Wie schon in Tabelle 30 gezeigt, wurde Propionsäure innerhalb von sieben Wochen restlos abgebaut (Abbildung 21). Dabei wurde innerhalb der ersten zwei Wochen verhältnismäßig wenig Acetat im Medium angereichert und zwischen Woche vier und fünf ganz abgebaut. Dies deutet auf eine Aktivität von Acetat-verwertenden methanogenen Archaea hin, was mit 16S-rDNA Analysen bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

Fumarat wurde während der gesamten Inkubation relativ gleichförmig abgebaut. Es akkumulierte bis Woche sechs kein Succinat. Als die Propionsäure einen Gehalt von  $4,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  zeigte, akkumulierte Succinat aufgrund des weiter andauernden Fumaratabbaus.

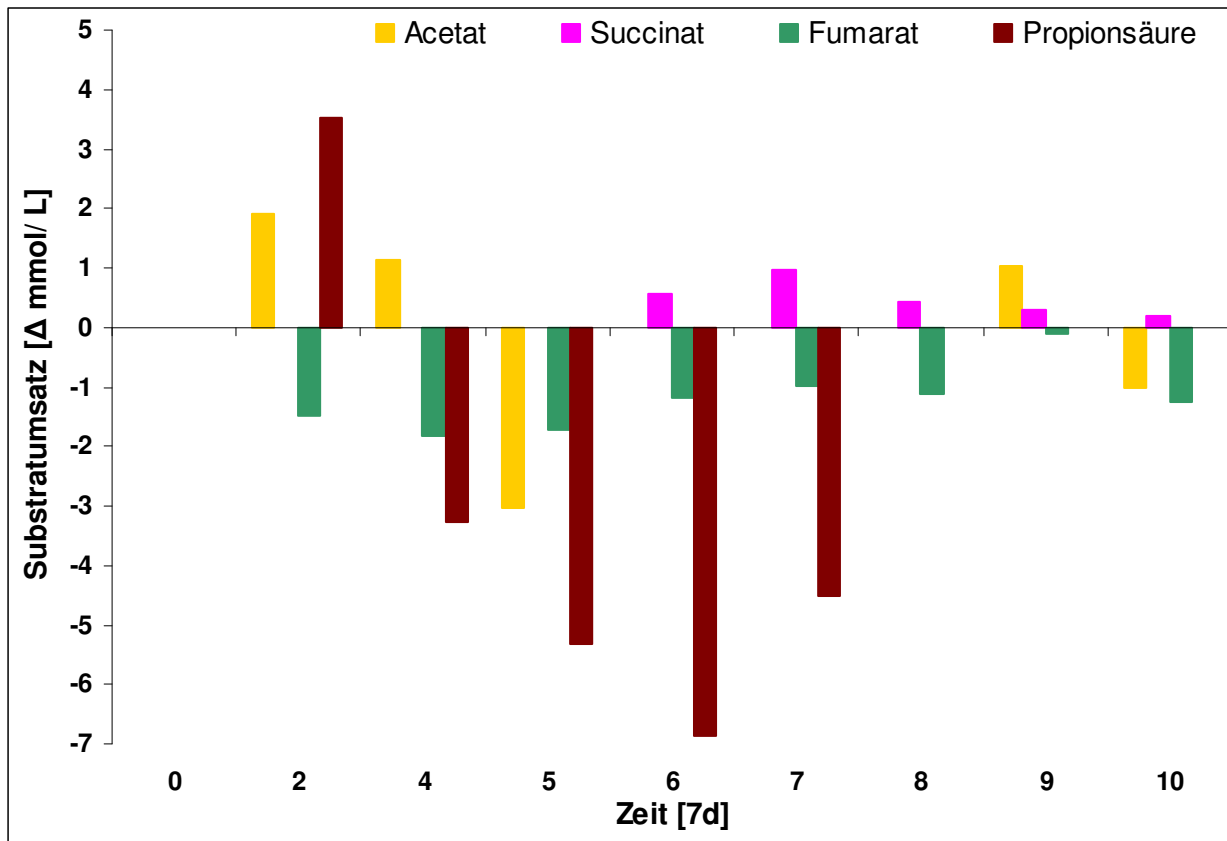


Abbildung 22: zweiwöchentliche Substratumsätze [ $\Delta \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] der Kultur Ap1a gegen die Zeit [7d]; gelb = Acetatumsatz, pink = Succinatumsatz, türkis = Fumaratumsatz, braun = Propionsäureumsatz.

Abbildung 22 zeigt, dass die Spitzenwerte des Propionsäureabbaus der Kultur Ap1a zwischen den Wochen Fünf und Sechs liegen. In dieser Darstellung wird deutlich, dass in der Woche Neun der Fumaratabbau stagnierte und Acetat gebildet wurde. Der Fumaratabbau wurde bis Woche zehn wieder aufgenommen und bis Woche zehn wurde Acetat wieder restlos abgebaut (Abbildung 21).

Während dieser Testreihe, in welcher der Substratumsatz der Propionsäure-abbauenden Kulturen mit zusätzlich Fumarat beziehungsweise mit Fumarat und BrES im PI-Medium gemessen wurde, zeigte die Kultur Wp1a keinen Substratumsatz. Daher wurde die Kultur Wp1a in weiterführenden Versuchsansätzen nicht weiter berücksichtigt.

Nach Überimpfen der Propionsäure-abbauenden Kulturen mit Fumarat, beziehungsweise mit Fumarat und BrES im PI-Medium wurden die Propionsäureabbauraten erneut detektiert (Daten nicht gezeigt) und die effektivste Kultur aus jeweils einer beprobten Biogasanlage ausgewählt

und zur weiteren Charakterisierung verwendet. Die effektivsten Propionsäure-abbauenden Kulturen waren Fp1a, Wp2a, Gp1b und Ap1a.

## II.6.2 Stammidentifizierung Propionsäure-abbauender Bakterien

Die Kulturen Fp1a, Wp2a, Gp1b und Ap1a wurden ebenfalls Stamm-Identifiziert, indem Gesamt-DNA aus den Kulturen isoliert, amplifiziert, kloniert und schließlich sequenziert wurde, wie in II.2.2 beschrieben. Hierfür wurden bakterielle Oligonukleotide verwendet, was in Tabelle 31 gezeigt wird.

Tabelle 31: Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung bakterieller 16S-rDNA.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C] <sup>a</sup>
BSF8 <sup>1</sup> (forward)	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	50	57,3
BSR1541 <sup>1</sup> (reverse)	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	20	60	61,4
Eub519fGC (forward)	[CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CC] CAG CAG CCG CGG TAA TA	55	78	88,5
Eub519f (forward)	CAG CAG CCG CGG TAA TA	17		50
Eub1070r (reverse)	AGC TGA CGA CAG CCA T	16	56	46

<sup>1</sup> Coton *et al.* 2005, A. Willmotte *et al.* 1993

<sup>a</sup> Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Wie bei dem PCR-Programm zur Amplifizierung archaealer 16S-rDNA (Tabelle 10) wurde aus dem GC-Gehalt und der Länge der synthetischen Oligonukleotide für bakterielle 16S-rDNA-Analyse der T<sub>m</sub> berechnet. Aus dem T<sub>m</sub> wurde eine Anlagerungstemperatur für das PCR-Programm zur Amplifizierung bakterieller 16S-rDNA ermittelt (Tabelle 32).



Tabelle 32: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94	1	35
Anlagerung	62,4	1	35
Elongation	72	1,5	35
Abschließende Extension	72	10	1
Gesamt-Zyklen			35

Die Unterschiede zum PCR-Programm zur Amplifizierung archaealer 16S-rDNA liegt in der Anlagerungstemperatur des PCR-Programms bakterieller 16S-rDNA und, dass keine *touch-down*-Funktion zwischengeschaltet ist (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Der weitere Arbeitsablauf gestaltete sich wie bei der molekularbiologischen Identifizierung mithilfe der 16S-rDNA in II.2.2 beschrieben.

Durch richtungsweisende Sequenzierungsergebnisse von 16S-rDNA-Fragmenten Propionsäure-abbauender Mischkulturen (Tabelle 6 und Tabelle 33) wurden verschiedene Medien hergestellt, um den Mikroorganismen der sehr stabilen Mischkulturen andere Substrate anzubieten, um im besten Fall Propionsäure-abbauende Mikroorganismen zu Isolieren. Die Medien wurden nach einigen dominierend auftretenden Mikroorganismen ausgewählt, die bei der Sequenzierung der 16S-rDNA-Fragmente aus Propionsäure-abbauenden Mischkulturen die nächstverwandten Mikroorganismen auf Art-Ebene waren.

Tabelle 33: Ergebnisse der 16-rDNA-Analyse der effektivsten Propionsäure-abbauenden Kulturen in PI-Medium.

RFLP- Muster	DGGE- Bande	Sequenzlänge [bp]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rRNA)	Übereinstimmung [%]
<b>Kultur Gp1b</b>				
Gp1b-6	(1/30) <sup>1</sup>	816 (793/810) <sup>2</sup>	<i>Desulfovibrio sp. A2</i>	98
Gp1b-29	(1/30) <sup>1</sup>	901 (888/901) <sup>2</sup>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Stamm Miyazaki F	99
<b>Kultur Fp1a</b>				
Fp1a-1	(1/6) <sup>1</sup>	572 (521/580) <sup>2</sup>	<i>Spirochaetes bacterium SA-10</i>	90
Fp1a-2	(1/6) <sup>1</sup>	930 (919/934) <sup>2</sup>	<i>Spirochetales bacterium Anreicherungskultur Klon D2CL_Bac_16S_Clone1</i>	99
Fp1a-3	(1/6) <sup>1</sup>	809 (734/799) <sup>2</sup>	<i>Spirochaetes bacterium Stamm SA-10</i>	92
Fp1a-4	(1/6) <sup>1</sup>	555 (504/554) <sup>2</sup>	<i>Spirochaetes bacterium Stamm SA-10</i>	91
Fp1a-5	(1/6) <sup>1</sup>	718 (649/713) <sup>2</sup>	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> Stamm JW/YJL-S1 clone 3	92
Fp1a-6	(1/6) <sup>1</sup>	660 (603/660) <sup>2</sup>	<i>Spirochaetes bacterium Stamm SA-10</i>	92
	Fp1a-5 (1/6) <sup>3</sup>	319	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> Stamm ALA-3	99
	Fp1a-6 (1/6) <sup>3</sup>	443	<i>Spirochaeta sp. Buddy</i>	99
<b>Kultur Wp2a</b>				
	Wp2a-1 (1/2) <sup>3</sup>	454	<i>Wolinella succinogenes</i> ATCC29543	100
			<i>Tepidanaerobacter sp. T2</i>	100
	Wp2a-2 (1/2) <sup>3</sup>	452	<i>Clostridium sp. F-02</i>	97
			<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i> Stamm OL	97

<sup>1</sup> Verhältnis von Klonen mit gleichem Muster zu gesamten Klonen einer Kultur, <sup>2</sup> Verhältnis der mit der Referenzsequenz übereinstimmenden Sequenz zur verglichenen Gesamtsequenzlänge, <sup>3</sup> Verhältnis der DGGE-Bande zu Gesamtbanden in der gleichen Spur

Durch Klonierung und anschließender RFLP wurden in Kultur Gp1b zwei unterschiedliche Muster ausgewählt und sequenziert. Diese Muster wurden beide dem Genus *Desulfovibrio* zugeordnet. In Kultur Fp1a wurde ebenfalls ein Vertreter des Genus *Desulfovibrio* ermittelt. Allerdings nicht durch Klonierung und anschließender RFLP, sondern durch die Methode der DGGE. Die Sequenzierung ließ nur eine Einordnung auf Genusebene zu, da die Übereinstimmungen der Klon-Fragmente mit Sequenzen aus Datenbanken unter 95 % lagen. In jedem Fall müssen Spiro-

chaeten in der Kultur Fp1a enthalten sein, da mikroskopische Untersuchungen eine typische Spirillen-Form zeigten und das Sequenzierungsergebnis somit untermauerten.

Die Kultur Wp2a wurde ebenfalls molekularbiologisch mithilfe der DGGE analysiert. Hierbei ergaben die Sequenzierungen der beiden Banden aus dem DGGE-Gel (nicht gezeigt) zwei unterschiedliche Spezies. *Wolinella succinogenes* ist ein Bakterium der  $\epsilon$ -Proteobacteria und *Tepidanaerobacter* ist ein Vertreter der Clostridia. Beides sind anaerob wachsende Bakterien.

Eine 16S-rDNA-Analyse war mit Kultur Ap1a nicht möglich, da Verunreinigungen durch Schwebstoffe im PI-Medium die DNA-Isolierung verhinderten. Daher wurden die DSMZ-Medien für schon mithilfe 16S-rDNA identifizierte Mikroorganismen in den Propionsäure-abbauenden Kulturen zur parallelen Kultivierung verwendet: DSMZ-Medium 1264 für Spirochaeten, DSMZ-Medium 520 für Clostridien, DSMZ-Medium 248 für *Aminobacterium colombiense* (II.1.5) und DSMZ-Medium 63 mit und ohne Laktat für Sulfatreduzierer mit jeweils 10 % Inokulum der Propionsäure-abbauenden Mikroorganismen beimpft und bei 39 °C inkubiert.

Bakterielle DNA aus Kulturen wurde mittels Klonierung, folgender RFLP und abschließender Sequenzierung identifiziert. In den folgenden Tabellen sind die Stamm-Identifizierungen zusammengefasst.

Tabelle 34: Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Fp1a in DSMZ-Medium 1264, DSMZ-Medium 520 und DSMZ-Medium 63 ohne Laktat.

RFLP-Muster	Sequenzlänge [bp]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rDNA)	Übereinstimmung [%]
<b>Kultur Fp1a1264</b>			
Fp1a1264-b2 (1/9) <sup>1</sup>	433 (495/531) <sup>2</sup>	<i>Ruminobacillus xylanolyticum</i>	94
Fp1a1264-d2 (1/9) <sup>1</sup>	451 (441/450) <sup>2</sup>	<i>Spirochaeta</i> sp. Buddy	99
Fp1a1264-u (2/9) <sup>1</sup>	185 (184/185) <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i> Stamm KO11	99
<b>Kultur Fp1a63 – Laktat</b>			
Fp1a63-10 (1/50) <sup>1</sup>	439 (437/438) <sup>2</sup>	<i>Shigella sonnei</i> <sup>†</sup>	99
	439 (437/438) <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i> Stamm NA114	99
Fp1a63-11 (1/50) <sup>1</sup>	521 (492/523) <sup>2</sup>	<i>Geovibrio thiophilus</i> Stamm AAFu3	95
Fp1a63-14 (1/50) <sup>1</sup>	677 (673/674) <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus hominis</i> Stamm AB246	99
	677 (673/674) <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus hominis</i> Stamm CCGE2260	99
<b>Kultur Fp1a520</b>			
Fp1a520 (1/1) <sup>1</sup>	144 (147/157) <sup>2</sup>	<i>Ruminobacillus xylanolyticum</i>	94

<sup>1</sup> Verhältnis von Klonen mit gleichem Muster zu gesamten Klonen einer Kultur, <sup>2</sup> Verhältnis der mit der Referenzsequenz übereinstimmenden Sequenz zur verglichenen Gesamtsequenzlänge.

In den Unterkulturen der Propionsäure-abbauenden Kultur Fp1a mit Medium 1264, sowie mit Medium 520 wurde je ein Vertreter des Genus *Ruminobacillus* ermittelt, welcher bisher noch nicht rein kultiviert wurde. Desweiteren wurden in den Unterkulturen mit Medium 1264 und 63, ohne Laktat, Vertreter der Enterobacteriaceen identifiziert. In Medium 63, ohne Laktat wurde ein Muster *Geovibrio thiophilus* zugeordnet. Dieser Mikroorganismus ist befähigt, Sulfat mithilfe von Acetat zu reduzieren (M. T. Madigen *et al.* 2000). *Geovibrio thiophilus* könnte für die geringe Akkumulation von Acetat (Abbildung 18) im Medium verantwortlich sein.

Tabelle 35: Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Wp2a in DSMZ-Medium 1264 und DSMZ-Medium 63 ohne Laktat.

RFLP-Muster	Sequenzlänge [bp <sub>Ges</sub> ]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rDNA)	Übereinstimmung [%]
<b>Kultur Wp2a1264</b>			
Wp2a1246-a (4/12) <sup>1</sup>	319 (273/285) <sup>2</sup>	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM12261	96
Wp2a1246-a2 (1/12) <sub>1</sub>	789 (787/789) <sup>2</sup>	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM12261	99
Wp2a1246-e (1/12) <sup>1</sup>	465 (460/462) <sup>2</sup>	<i>Wolinella succinogenes</i> ATCC29543	99
Wp2a1246-x (1/12) <sup>1</sup>	560 (557/558) <sup>2</sup>	<i>Wolinella succinogenes</i> ATCC29543	99
Wp2a1246-z (3/12) <sup>1</sup>	802 (723/796) <sup>2</sup>	<i>Petrotoga mobilis</i> Stamm SJ95	91
<b>Kultur Wp2a63 – Laktat</b>			
Wp2a63-4 (8/39) <sup>1</sup>	594 (590/594) <sup>2</sup>	<i>Shigella dysenteriae</i> Stamm AS7	99
Wp2a636 (10/39) <sup>1</sup>	403 (400/403) <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i> W	99
Wp2a6317 (19/39) <sup>1</sup>	874 (873/874) <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i> W	99
	874 (873/874) <sup>2</sup>	<i>Shigella flexneri strain T92</i>	99

<sup>1</sup> Verhältnis von Klonen mit gleichem Muster zu gesamten Klonen einer Kultur, <sup>2</sup> Verhältnis der mit der Referenzsequenz übereinstimmenden Sequenz zur verglichenen Gesamtsequenzlänge

Mit Kultur Wp2a wurden ebenfalls Unterkulturen hergestellt. Eine Sequenzanalyse war aus den Kulturen mit den Medien 1264 und 63, ohne Laktat, möglich. Aufgrund zu vieler während des Wachstums entstandener Schwebstoffe im Medium der Kulturen Wp2a in DSMZ-Medium 520 war eine DNA-Isolierung nicht möglich. Hier wurde wie in der Ursprungskultur *Wolinella succinogenes* identifiziert. Bei der Analyse der Kultur Wp2a in 1246-Medium wurde ein ebenfalls durch vorherige Analysen (Tabelle 6) bekannter Mikroorganismus identifiziert, *Aminobacterium colombiense*. Dieser Mikroorganismus ist befähigt, anaerob Aminosäuren zu verstoffwechseln.

Tabelle 36: Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Gp1b in DSMZ-Medium 1264 und DSMZ-Medium 63 ohne Laktat.

RFLP-Muster	Sequenzlänge [bp <sub>Ges</sub> ]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rDNA)	Übereinstimmung [%]
<b>Kultur Gp1b1264</b>			
Gp1b1264-a (4/12) <sup>1</sup>	319 (273/285) <sup>2</sup>	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM12261	96
Gp1b1264-g (1/12) <sup>1</sup>	817 (756/801) <sup>2</sup>	<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i> Stamm SK031	95
Gp1b1264-g2 (1/12) <sup>1</sup>	852(783/830) <sup>2</sup>	<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i> Stamm SK031	95
Gp1b1264-g3 (1/12) <sup>1</sup>	811 (769/815) <sup>2</sup>	<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i> Stamm SK031	95
Gp1b1264-β (1/12) <sup>1</sup>	847 (814/842) <sup>2</sup>	<i>Geovibrio thiophilus</i> DSM11263	97
Gp1b1264-u (1/12) <sup>1</sup>	siehe Fp1a1264-u <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i> Stamm KO11	99
Gp1b1264-v (1/12) <sup>1</sup>	678 (675/678) <sup>2</sup>	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM12261	99
Gp1b1264-y2 (1/12) <sup>1</sup>	765 (507/592) <sup>2</sup>	<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i> Stamm BA-2	86
<b>Kultur Gp1b63-L</b>			
Kultur Gp1b63 (1/1) <sup>1</sup>	468 (467/467) <sup>2</sup>	<i>Tissierella sp.</i> Stamm LBN 292	100

<sup>1</sup> Verhältnis von Klonen mit gleichem Muster zu gesamten Klonen einer Kultur, <sup>2</sup> Verhältnis der mit der Referenzsequenz übereinstimmenden Sequenz zur verglichenen Gesamtsequenzlänge; <sup>3</sup> Tabelle 34

Auch in den Unterkulturen von Gp1b wurden neben Spirochaeten und Peptococcen, *Aminobacterium colombiense* und *Geovibrio thiophilus* durch die Sequenzierung von Klon-16S-rDNA ermittelt. Die Analyse der Kultur Gp1b in 63-Medium, ohne Laktat, ergab sich ein weiterer Stamm der Ordnung *Clostridiales*. Zu viele während des Wachstums der Kulturen Gp1b in DSMZ-Medium 520 entstandene Partikel verhinderten eine DNA-Isolierung.

Tabelle 37: Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung und nach DGGE aus der Propionsäure-abbauenden Kultur Ap1a in DSMZ-Medium 1264 und DSMZ-Medium 520.

RFLP-Muster	Sequenzlänge [bp <sub>Ges</sub> ]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rDNA)	Übereinstimmung [%]
<b>Kultur Ap1a1264</b>			
Ap1a1264-b (3/12) <sup>1</sup>	785 (735/786) <sup>2</sup>	<i>Ruminobacillus xylanolyticum</i>	94
Ap1a1264-k (6/12) <sup>1</sup>	187 (806/813) <sup>2</sup>	<i>Clostridium sartagoforme</i> DSM1292	99
Ap1a1264-l (1/12) <sup>1</sup>	835 (640/681) <sup>2</sup>	Rumen bacterium Stamm NC-09	94
	835 (754/833) <sup>2</sup>	<i>Ruminobacillus xylanolyticum</i>	91
Ap1a1264-u (2/12) <sup>1</sup>	Siehe Fp1a1264-u <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i> Stamm KO11	99
<b>Kultur Ap1a520</b>			
Ap1a520 (1/1) <sup>1</sup>	136 (126/129) <sup>2</sup>	<i>Clostridium sartagoforme</i> DSM1292	98

<sup>1</sup> Verhältnis von Klonen mit gleichem Muster zu gesamten Klonen einer Kultur, <sup>2</sup> Verhältnis der mit der Referenzsequenz übereinstimmenden Sequenz zur verglichenen Gesamtsequenzlänge; <sup>3</sup> Tabelle 34

In der Kultur Ap1a in 520-Medium, sowie Ap1a in 1264-Medium wurde das Bakterium *Clostridium sartagoforme* ermittelt. Dieses Clostridium wurde erstmals in Wunden von Pferden entdeckt und ist befähigt, anaerob flüchtige Fettsäuren herzustellen. Bei den Analysen der Unterkultur Ap1a in Medium 1264 wurde das bisher unkultivierte Bakterium des Genus *Ruminobacillus* erneut gefunden. Auch bei den Kulturen Ap1a in DSMZ-Medium 63 machten zu viele während des Wachstums entstandene Schwebstoffe eine DNA-Isolierung unmöglich.

Sequenzierungen bakterieller 16S rDNA-Fragmente der Propionsäure-abbauenden Kulturen führten zu verschiedenen Mikroorganismen. Dies wurde teilweise von den Sequenzierungsergebnissen der bakteriellen 16S rDNA-Fragmente aus Kulturen mit unterschiedlichem Nahrungsangebot bestätigt beziehungsweise bestimmten Mikroorganismen zugeordnet werden.

### II.6.3 Substratverhalten einiger Typstämme aus den Propionsäure-abbauenden Kulturen

Es wurde bei der Vereinzelung von Mikroorganismen auch Propionsäure-abbauenden Kulturen mit Verdünnungsreihen und Reinigungsausstrichen gearbeitet, ohne Antibiotika einsetzen zu können. Daher wurden Typstämme der Stamm-Identifizierten Arten *Clostridium sartagoforme*<sup>T</sup>, *Aminobacterium colombiense*<sup>T</sup>, *Wolinella succinogenes*<sup>T</sup> als möglicherweise Propionsäure-abbauende Bakterien und *Geovibrio thiophilus*<sup>T</sup> als Wasserstoff verwertender Sulfatreduzierer bei

der DSMZ bestellt und Kombinationstests zusammen mit dem acetoclastischen Eigenisolat *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 und dem hydrogenotrophen Eigenisolat *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 durchgeführt. Dabei wurden die Kulturen in PI-Medium (II.1.2) bei 39 °C inkubiert. Teilweise wurde in regelmäßigen Abständen die Gasphase über den Medien ausgetauscht, um den Wasserstoffpartialdruck gering zu halten. *Geovibrio thiophilus*<sup>T</sup>, *Methanobacterium formicicum* Stamm TAF1 und *Methanosarcina barkeri* Stamm HWS2.1 wurden jeweils als Negativkontrollen einzeln in PI-Medium mit inkubiert. Die Versuchskulturen sind in folgender Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38: Kombinationstests von bakteriellen Typstämmen und methanogenen Eigenisolaten in PI-Medium.

<b>Mikroorganismen</b>	<b>Regelmäßiger Austausch der Gasphase</b>
<i>Clostridium sartagoforme</i> <sup>T</sup>	-
<i>Clostridium sartagoforme</i> <sup>T</sup>	+
<i>Clostridium sartagoforme</i> <sup>T</sup> + TAF1	+
<i>Clostridium sartagoforme</i> <sup>T</sup> + HWS2.1	+
<i>Clostridium sartagoforme</i> <sup>T</sup> + <i>G. thiophilus</i> <sup>T</sup>	+
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>T</sup>	-
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>T</sup>	+
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>T</sup> + TAF1	+
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>T</sup> + HWS2.1	+
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>T</sup> + <i>G. thiophilus</i> <sup>T</sup>	+
<i>Aminobacterium colombiense</i> <sup>T</sup>	-
<i>Aminobacterium colombiense</i> <sup>T</sup>	+
<i>Aminobacterium colombiense</i> <sup>T</sup> + TAF1	+
<i>Aminobacterium colombiense</i> <sup>T</sup> + HWS2.1	+
<i>Aminobacterium colombiense</i> <sup>T</sup> + <i>G. thiophilus</i> <sup>T</sup>	+
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1	-
<i>Methanosarcina barkeri</i> Stamm HWS2.1	+
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1	-
<i>Methanobacterium formicicum</i> Stamm TAF1	+
<i>Geovibrio thiophilus</i> <sup>T</sup> DSM11263	-
<i>Geovibrio thiophilus</i> <sup>T</sup> DSM11263	+

Der Versuchsablauf ist mit dem Ende des dritten Projektjahres noch nicht abgeschlossen worden, so dass die Aussage noch aussteht, welcher der Mikroorganismen Propionsäure abbaut. In Folge Dessen war es noch nicht möglich Propionsäure-abbauer spezifische Sonden herzustellen, um zukünftig zu ermöglichen Propionsäure-abbauer während des *Monitorings* zu detektieren.



## II.7 Verwertung der Ergebnisse

Zielsetzung des Projektes war es Lösungsansätze anzubieten um Fehlgärungen in Biogasanlagen frühzeitig zu erkennen sowie Starterkulturen zu entwickeln um einen beschleunigten Propionsäureabbau zu erreichen. Im Rahmen des Vorhabens konnten wesentliche Grundlagen erarbeitet werden um mittelfristig praxisreife Lösungen anbieten zu können. Auf Basis der umfangreichen molekularbiologischen Arbeiten und der hieraus gewonnenen Sequenzinformationen können DNA-Sonden zur Identifizierung und Quantifizierung von relevanten Gruppen des Biogasprozesses abgeleitet werden. Auf dieser Grundlage ließen sich mögliche Änderungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft infolge von veränderten Prozessparametern einer Biogasanlage beobachten. Neben neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen über die Interaktionen der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen, können mittelfristig auch neue analytische Dienstleistungen für Biogasanlagen auf der Basis von DNA-Analysen entwickelt werden. Voraussetzung hierfür sind allerdings noch weiterführende Untersuchungen zur Abundanz bestimmter mikrobieller Gruppen sowie zur Populationsdynamik in Abhängigkeit von bestimmten Prozessparametern.

Darüber hinaus konnten im Rahmen des Projektes stabile Propionsäure-abbauende Mischkulturen gewonnen werden. Im Technikumsmaßstab konnte bereits die prinzipielle Eignung als Starterkulturen für einen beschleunigten Abbau nachgewiesen werden. Zudem wurden Effekte einer vorbeugenden Zugabe zur Vermeidung einer verstärkten Propionsäurebildung demonstriert. Hinsichtlich eines praktischen Einsatzes bzw. einer kommerziellen Anwendung für Biogasanlagen sind noch verfahrenstechnische Fragestellungen zu beantworten. Dies betrifft die Anzucht der Mikroorganismen in einem technischen Maßstab sowie Fragen der Haltbarkeit und Lagerfähigkeit.

## II.8 Erkenntnisse von Dritten

Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen beschäftigt haben (u.a. Kröber *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009, Krause *et al.* 2008, Klocke *et al.* 2008). Die Schwerpunkte lagen hierbei allerdings ausschließlich auf kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Diversitätsanalysen. Hinsichtlich der gesamten mikrobiellen Populationen wurden dabei Vertreter der Ordnung *Clostridiales* als die häufigsten in Biogasanlagen vorkommenden Organismen aus der Domäne der Eubakterien beschrieben, während aus der Gruppe der methanogenen *Archaea* insbesondere Vertreter der Ordnungen *Methanomicrobiales* und *Methansarcinales* dominierten. Interessanterweise deuten die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen darauf hin, dass innerhalb der physiologischen Gruppe der hydrogenotrophen Methanbakterien die Gattung *Methanoculleus* von besonderer Bedeutung in Biogasanlagen ist. Dieses wurde, alternativ zur Analyse von 16S rDNA Sequenzen, auch auf Basis phylogenetischer Analysen des *mcrA* Gens bestätigt ( $\alpha$ -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M Reduktase; Kröber *et al.* 2009). Weiterhin zeigen die verschiedenen molekularbiologische Untersuchungen eine große Anzahl nicht näher zuordenbarer Sequenzen aus Biogasanlagen, dies zeigt das ein erheblicher Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft in diesem Ökosystem durch bislang nicht bekannte Arten repräsentiert wird. Neuere Erkenntnisse zu den mikrobiellen Populationen in Biogasanlagen auf der Basis von charakterisierten Isolaten liegen nach dem Kenntnisstand der Antragsteller nicht vor.

Darüber hinaus deuten verschiedene Untersuchungen und Veröffentlichungen darauf hin, dass die Versorgung mit Spurenelementen eine Rolle hinsichtlich der Prozessstabilität in Biogasanlagen spielt (u.a. Preißler 2009). Auch Untersuchungen, die am PFI durchgeführt wurden, zeigten einen stabilisierenden Effekt von Spurenelementen bei Prozessstörungen auf die Fermenterbiologie (Dröge *et al.* 2008). Aufgrund der Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen sowie des weitgehenden Fehlens von charakterisierten Isolaten, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, welche Spurenelemente in welchen Konzentrationen im Einzelfall benötigt werden.

## **II.9 Veröffentlichungen**

Ergebnisse des Projektes wurden auf der folgenden Tagung vorgestellt:

Kerstin Seyfarth, Robbin Stantscheff, Helmut König und Stefan Dröge (2009b): Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. In: Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2.-4.12.2009, Erding, Band 3, 637-641.

Kerstin Seyfarth, Robbin Stantscheff, Stefan Dröge, Helmut König (2009a): Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. In: Ausstellerkatalog, Tag der Technologie, Rheinland Pfalz 26.10.2009, Mainz, S. 18.

Weiterhin ist eine Veröffentlichung in einen Fachjournal in Arbeit:

Robbin Stantscheff, Kerstin Seyfarth, Micheal Klocke, Stefan Dröge and Helmut König. Culturable methanogenic microbiota from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants and lab-scale biogas fermenters. In Vorbereitung (vergl. Anlage)

### III Literatur

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

Baena, S., Fardeau, M. -L., Labat, M., Ollivier, B., Thomas, P., Garcia J. -L., & Patel, B. K. C [1998]: *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe* 4: 241 – 250.

Breitig, G. & v. Trümping, W. (1982): *Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung*, Band II, Kap. 1.3.21. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Coton, E., Coton, M. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 63: 296-304

Dröge, S., Ewen, A., & Pacan, B. (2008): Wenn es in Spuren mangelt. *Biogasjournal* 02/08: 30-35.

Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A. & Harada, H. (2002): *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1729-1735.

Kocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K. & Linke, B. (2007): Microbial community analysis of abiogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 139-151

Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt K., Souidi, K., Mumme, J., & Linke, B. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and applied microbiology* 31:190-205.

Klocke, M., Mundt, K., Sontag, M., Schönberg, M., Linke B. 2009. Microbial community structure within a two-stage biogas reactor system with bioleaching of rye silage. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 68:126-139.

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. *J Biotechnol.* 31: 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 plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol.* 142: 38-49.

Liu, F.H., Wang, S.B., Zhang, J.S., Zhang, J., 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. *J Appl Microbiol.* 106:952-66.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2000. Brock Biology of Microorganisms. Brock Mikrobiologie. Spektrum Verlag 2000, 8. Auflage 2001, ISBN 3-8274-0566-1.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. 2010. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants Applied and Environmental Microbiology. 76:2540–2548.
- Preißler, D. (2009): Die Bedeutung der Spurenelemente bei der Ertragssteigerung und Prozessstabilisierung. Vortrag 18. Jahrestagung Fachverband Biogas e.V., 03.02. – 05.02.2009, Hannover.
- Sass, H. (1997): Vorkommen und Aktivität sulfatreduzierender Bakterien in der Oxykline limnischer Sedimente. Dissertation, Hartung-Gorre Verlag Konstanz.
- Schink, B. (1991): Syntrophism among prokaryotes. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Schleifer, K-H. (Ed.), The prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 276-299.
- Schink, B. (1997): Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 262-280.
- Smith, M. R., Mah, R. A. 1981. 2-Bromoethanesulfonate: A Selective Agent for Isolating Resistant *Methanosarcina* Mutants Current Microbiology 1:321-326.
- Stams, A. J. M., Dijk, van, J. B., Dijkema, C., Plugge, C. M. 1993. Growth of Syntrophic Propionate-Oxidising Bacteria with Fumarate in the Absence of Methanogenic Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 59: 1114-1119.
- Tatsuoka, N., Mohammed, N., Mitsumori, M., Tajima, K., Hara, K., Kurihara, M., Itabishi, H. 2007. Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. Animal Science Journal 78:512-518.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., De Wachter, R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. FEBS 317: 96-100.
- Wright, A.-D. G., Pimm, C. 2003. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. J. of Microbiol. Methods 55:337– 349.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., Minato, H. 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence *In Situ* Hybridization. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:1732-1742.