
BACHELORARBEIT

Herr
Malte Stadtmann

**Analyse von mikrobiellen
Gemeinschaften aus einem
zweistufigen Prozess zur
Produktion von Biogas aus
alkalisch vorbehandeltem
Weizenstroh**

Mittweida, 2016

Fakultät Computer- und Biowissenschaften

BACHELORARBEIT

Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften aus einem zweistufigen Prozess zur Produktion von Biogas aus alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh

Autor:
Herr

Malte Stadtmann

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI13W1

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbel Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. Heike Sträuber

Einreichung:
Mittweida, 23.08.2016

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2016

Bibliographische Beschreibung:

Stadtman, Malte: Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften aus einem zweistufigen Prozess zur Produktion von Biogas aus alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh. - 2016. - 11, 53, 6 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2016

Englischer Titel

Analysis of microbial communities in a two-stage biogas process with alkaline pretreated wheat straw

Kurzbeschreibung:

In einem zweistufigen Reaktorsystem wurde Stroh und Schlempe vergoren. Dabei wurde der Erste-Stufe-Reaktor unterschiedlichen Maßnahmen ausgesetzt. Zur Strukturanalyse der mikrobiellen Gemeinschaften beider Reaktorstufen wurde eine T-RFLP-Analyse und statistische Auswertungen angefertigt.

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich Professor Dr. Wünschiers dafür danken, dass er meine Bachelorarbeit an der Hochschule Mittweida betreut hat.

Ferner gilt mein Dank Dr. Heike Sträuber, die mir ermöglichte, die Bachelorarbeit am UFZ Leipzig anzufertigen. Außerdem brachte sie als meine Betreuerin immer die nötige Geduld mit und hat durch hilfreiche Kommentare und Anmerkungen die Erstellung dieser Bachelorarbeit erleichtert.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sabine Kleinsteuber für hilfreiche Einschätzungen und Hilfe bei der T-RFLP-Auswertung bedanken.

Bei Ute Lohse möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich mit der nötigen Geduld in den Laboralltag eingearbeitet hat und diesen immer wieder durch unterhaltsame Gespräche kurzweiliger machte.

Ich möchte mich außerdem bei Canan Karakoç und Gözde Özbayram bedanken, die mir bei allen Problemen hilfsbereit zur Seite standen und die Mittagspausen durch ihre außerordentlich interessanten Themen länger erscheinen ließen.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Franz Wetzel, dem treuesten Begleiter der letzten 3 Studienjahre.

Natürlich möchte ich mich abschließend bei meiner Familie bedanken, die mir immer Rückhalt gegeben hat und mich bei meinen Zielen unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	9
1.1 Biogaserzeugung aus Biomasse.....	9
1.2 Anaerobe Vergärung.....	9
1.3 Haupt- und Nachgärersystem.....	13
1.4 Lignocellulose im Biogasprozess	13
1.5 Vorbehandlungsmöglichkeiten für lignocellulosehaltige Substrate	16
1.5.1 Mechanisches Vorbehandeln	16
1.5.2 Thermisches Vorbehandeln	17
1.5.3 Chemisches Vorbehandeln	18
1.5.3.1 Säurevorbehandlung	18
1.5.3.2 Alkalische Vorbehandlung	18
1.6 Analyse von Zusammensetzung und Dynamik mikrobieller Biogasgemeinschaften	19
1.6.1 T-RFLP-Analyse.....	19
1.6.2 NMDS (Nicht-metrische multidimensionale Skalierung)	21
2 Zielstellung	23
3 Material.....	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Molekularbiologische Reagenzien.....	24
3.3 Geräte.....	24
3.4 Reaktorsystem.....	25
4 Methoden	27
4.1 DNA-Extraktion.....	27
4.1.1 Gelelektrophorese nach DNA-Extraktion.....	27
4.2 PCR.....	28
4.2.1 16S rRNA-Gene (<i>Bacteria</i>)	28
4.2.2 <i>mcrA</i> -Gene (Markergerne für Methanogene)	28

4.2.3 Gelelektrophorese nach PCR	29
4.2.4 Aufreinigung und Quantifizierung der PCR-Produkte.....	30
4.3 Restriktionsverdau.....	30
4.4 Ethanolfällung	30
4.5 T-RFLP.....	31
4.6 Datenverarbeitung mit R	31
5 Ergebnisse	32
5.1 DNA-Isolation.....	32
5.2 PCR	34
5.3 Methanausbeute und Essigsäurekonzentration.....	35
5.4 Erste-Stufe-Reaktor.....	36
5.4.1 Struktur und Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft.....	36
5.4.2 Struktur und Dynamik der methanogenen Gemeinschaft	38
5.5 Zweite-Stufe-Reaktor	40
5.5.1 Struktur und Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft.....	40
5.5.2 Struktur und Dynamik der methanogenen Gemeinschaft	42
5.6 Gesamtsystem.....	46
5.6.1 Bakterielle Gemeinschaften	46
6 Diskussion	49
6. 1 Einfluss der alkalischen Substratvorbehandlung auf die mikrobiellen Gemeinschaften in der anaeroben Vergärung von Weizenstroh.....	49
6. 2 Einfluss der kürzeren SRT auf die anaerobe Vergärung von Weizenstroh und die mikrobiellen Gemeinschaften	50
6. 3 Einfluss der Bioaugmentation auf die anaerobe Vergärung von alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh und die mikrobiellen Gemeinschaften	51
7 Ausblick.....	52
8 Zusammenfassung.....	53
9 Summary	54
Literaturverzeichnis.....	55
Anhang	59
Selbstständigkeitserklärung	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Biogasprozess (G Gärer, AB acetogene Bakterien, HAB homoacetogene Bakterien, SAO syntrophe Acetatoxidierer, AM acetoklastische Methanogene, HM hydrogenotrophe Methanogene, ? bisher wenig erforschter Stoffwechselprozess) (Quelle: Dieckmann et al., 2016)	10
Abbildung 2. Cellulosekette; die glykosidische Bindung ist rot markiert [URL 1]	14
Abbildung 3. Variante eines Ligninmoleküls [URL 2]	15
Abbildung 4. Lignocellulosestruktur [URL 3]	16
Abbildung 5. T-RFLP-Analyse als Flussdiagramm [Quelle: URL-4].....	21
Abbildung 6. Zweistufiges Reaktorsystem zur Vergärung von Weizenstroh und Schlempe (Quelle: Wunsch, 2014)	25
Abbildung 7. Gelelektrophorese der isolierten DNA aus der ersten Stufe; Lane 1: 1000 kb Standard	32
Abbildung 8. Gelelektrophorese der isolierten DNA aus der zweiten Stufe; Lane 1: 1000 kb Standard	33
Abbildung 9. Gelbilder der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Proben 01-11 aus dem Erste-Stufe-Reaktor; links: 16S-Amplikon, rechts: <i>mcrA</i> -Amplikon). Lane 1 jeweils 100 bp Standard.....	34
Abbildung 10. Gelbilder der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Proben 37-47 aus dem Zweite-Stufe-Reaktor; oben: 16S-Amplikon, unten: <i>mcrA</i> -Amplikon). Lane 1 jeweils 100 bp Standard	34
Abbildung 11. T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>RsaI</i> . Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.	37
Abbildung 12. NMDS-Plot der mit <i>RsaI</i> erzeugten T-RFLP-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Erste-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte an den entsprechenden Probenahmetagen.	38
Abbildung 13. T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 64 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>BstNI</i> .	

	Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.....	39
Abbildung 14.	NMDS-Plot der mit <i>Bst</i> NI erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaft des Erste-Stufe-Reaktors unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte an den entsprechenden Probenahmetagen.	40
Abbildung 15.	T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>Rsa</i> I. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.....	41
Abbildung 16.	NMDS-Plot der mit <i>Rsa</i> I erzeugten T-RFs der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Zweite-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen. Die Phasen stellen die eingesetzten Maßnahmen als abiotische Vektoren dar.	42
Abbildung 17.	T-RF-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 64 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>Bst</i> NI. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.....	43
Abbildung 18.	NMDS-Plot der mit <i>Bst</i> NI erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.	45
Abbildung 19.	NMDS-Plot der mit <i>Rsa</i> I erzeugten T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaften aus Erste- und Zweite-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen. Die farbigen Cluster markieren den entsprechenden Reaktor.	47
Abbildung 20.	NMDS-Plot der mit <i>Bst</i> NI erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften aus Erste- und Zweite-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position	

	der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen. Die farbigen Cluster markieren den entsprechenden Reaktor.	47
Abbildung 21.	T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>MspI</i> . Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.	61
Abbildung 22.	NMDS-Plot der mit <i>MspI</i> erzeugten T-RF-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Erste-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.	61
Abbildung 23.	T-RF-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 47 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>MwoI</i> . Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.	62
Abbildung 24.	NMDS-Plot der mit <i>MwoI</i> erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften des Erste-Stufe-Reaktors unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.	62
Abbildung 25.	T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 61 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>MspI</i> . Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.	63
Abbildung 26.	NMDS-Plot der mit <i>MspI</i> erzeugten T-RF-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Zweiten-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.	63
Abbildung 27.	T-RF-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 60 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym <i>MwoI</i> . Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.	64
Abbildung 28.	NMDS-Plot der mit <i>MwoI</i> erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die	

Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.	64
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der Maßnahmen im Erste-Stufe-Reaktor.....	26
Tabelle 2. PCR-Programm 16SMyT30	28
Tabelle 3. PCR-Programm 52mcrA30.....	29
Tabelle 4. Enzym- und Pufferübersicht	30
Tabelle 5. Quantifizierung der isolierten DNA aus ausgewählten Proben beider Reaktorstufen	33
Tabelle 6. Quantifizierung der PCR-Produkte aus beiden Reaktorstufen	35
Tabelle 7. Durchschnittliche Methanproduktion und Essigsäurekonzentration in erster und zweiter Stufe innerhalb der fünf Prozessphasen. Die Mittelwerte wurden aus mindestens drei und höchstens sechzehn Werte (vom Ende jeder Phase) berechnet.	36
Tabelle 8. Anzahl der T-RFs (<i>Richness</i>) mit Standardabweichung der bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften aus beiden Reaktorstufen im Mittelwert nach Restriktion mit Enzymen <i>Bst</i> NI und <i>Rsa</i> I.	46
Tabelle 9. Probenübersicht erste Stufe	59
Tabelle 10. Probenübersicht zweite Stufe.....	59

Abkürzungsverzeichnis

AB	acetogene Bakterien
AFEX	ammonia fiber explosion
AM	acetoklastische Methanogene
AK	Absorptionskoeffizient
<i>BstN</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Gärer
HAB	homoacetogene Bakterien
HM	hydrogenotrophe Methanogene
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LE	Laborgeräte
LHW	Liquid hot water
<i>mcrA</i>	Methyl-Coenzym-M-Reduktase
<i>Msp</i>	<i>Moraxella species</i>
<i>Mwo</i>	<i>Methanobacterium wolfeii</i>
NMDS	Nichtmetrische multidimensionale Skalierung
PCR	Polymerasekettenreaktion
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>Rsa</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
SAO	Syntrophe Acetatoxidierer
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SRT	Solids Retention Time

1 Einleitung

1.1 Biogaserzeugung aus Biomasse

Erst nach Einführung einer gesetzlich garantierten Vergütung von eingespeisten Strom aus Biogas im Jahr 1990 fand eine stetige Zunahme des Baus von landwirtschaftlichen Biogasanlagen statt [Rosenwinkel, 2015]. Mit Verabschiedung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahre 2000 nahmen Erzeugung und Nutzung von Biogas in Deutschland beträchtlich zu. Bund und Länder förderten diese Entwicklung auch durch ein Marktanreizprogramm und zahlreiche Investitionsförderprogramme. Durch Novellierungen des EEG in den Jahren 2004 und 2009 wurde die Nutzung auch von nachwachsenden Rohstoffen von ökonomischen Interesse [FNR, 2013]. Die Nettostromproduktion der insgesamt fast 6.000 Biogasanlagen betrug 2010 ca. 15 Mio. MWh, was etwa 2,6 % des deutschen Stromverbrauchs entsprach [Rosenwinkel, 2015]. Unter Biomasse versteht man allgemein Stoffe organischer Herkunft. Im Energiesektor wird dabei in Energiepflanzen, Ernterückstände, organische Nebenprodukte und Abfälle unterschieden [FNR, 2013]. Im EEG werden als nachwachsende Rohstoffe als Pflanzen oder Pflanzenbestandteile verstanden, die in landwirtschaftlichen oder gartenbaulichen Betrieben anfallen und nach Ernte und Konservierung keine weitere Aufarbeitung benötigen. Dazu wird auch Gülle gezählt. Weizenstroh, zählt eher zu den Ernterückständen der Pflanzenproduktion [Rosenwinkel, 2015]. Eine Vielfalt an Technologien wie zum Beispiel das direkte Verbrennen in Feuerungsanlagen oder die Biogasproduktion ermöglicht es Wärme, Strom und/oder Kraftstoffe aus Biomasse zu gewinnen. Allgemein gliedert man die Veredelungsverfahren in thermo-, physikalisch- oder biochemische Veredelungen. Der anaerobe Abbau von Biomasse zu Biogas gehört zu den biochemischen Veredelungsverfahren [FNR, 2013].

1.2 Anaerobe Vergärung

Die anaerobe Vergärung wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen durchgeführt, die in unterschiedlichen Beziehungen und Abhängigkeiten zueinanderstehen. Die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses ist dabei von der mikrobiellen Gruppe abhängig,

die die niedrigste Gesamtaktivität besitzt. Über den Verlauf des anaeroben Abbaus nimmt die Diversität der Mikroorganismen ab und gleichzeitig nimmt ihre Spezialisierung zu [Dieckmann et al., 2016]. Anhand von Abbildung 1 wird nachfolgend der Biogasprozess erläutert.

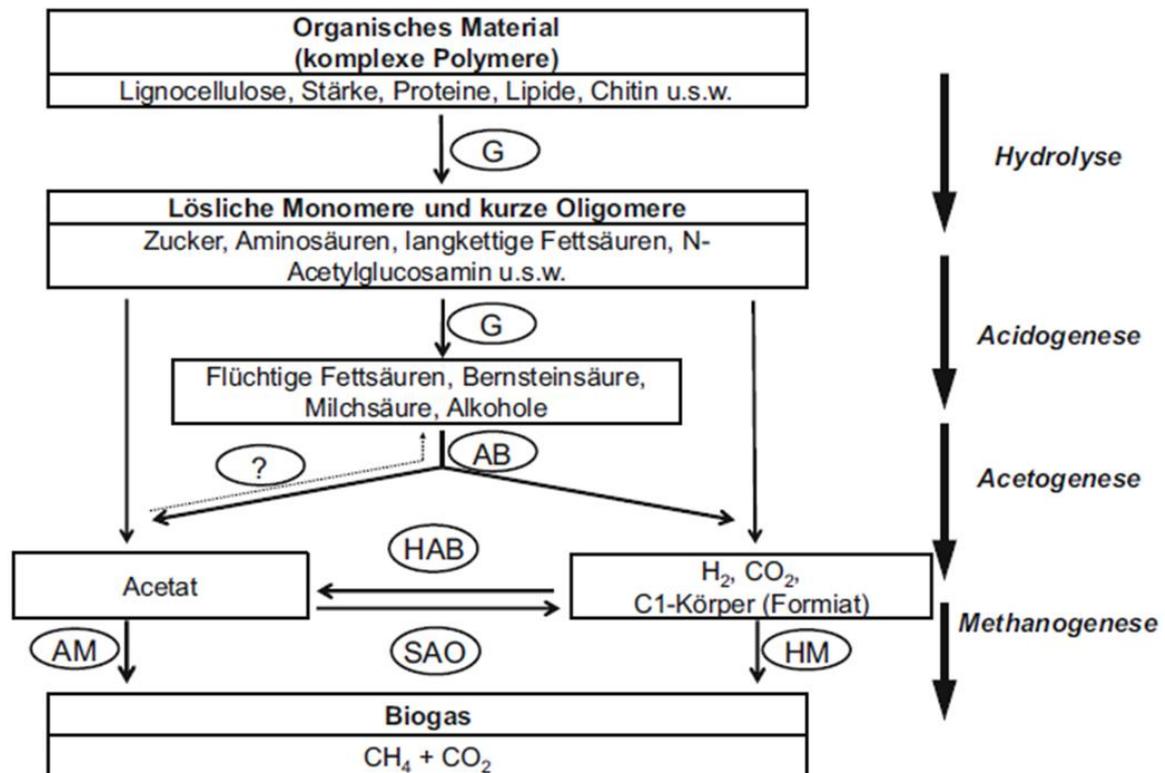


Abbildung 1. Biogasprozess (G Gärer, AB acetogene Bakterien, HAB homoacetogene Bakterien, SAO syntrophe Acetatoxidierer, AM acetoklastische Methanogene, HM hydrogenotrophe Methanogene, ? bisher wenig erforschter Stoffwechselprozess) (Quelle: Dieckmann et al., 2016)

Die anaerobe Vergärung lässt sich prinzipiell in vier metabolische Phasen gliedern. Die erste Phase wird Hydrolyse genannt [Rosenwinkel et al., 2015]. Biopolymere besitzen meistens Hydroxyl-, Amino- oder Sulfidsubstituenten, die sie angreifbar für Enzyme machen. Während der Hydrolyse zersetzen hydrolytische Bakterien komplexe Polymere (z.B. Fette, Proteine und Kohlenhydrate) in kurzkettige wasserlösliche Oligo-, Mono- und Dimere wie Glycerin, Fettsäuren, Aminosäuren und Zucker. Die Bakterien sondern dabei Hydrolasen wie Amylasen, Proteasen und Lipasen ab, um aus den unlöslichen Biopolymeren niedermolekulare Produkte zu bilden, die dann im weiteren Prozess aufgenommen und abgebaut werden [Rosenwinkel et al., 2015]. Die Expression solcher

Exoenzyme erfolgt bei Anwesenheit von Sensormolekülen wie Cellobiose für Cellulose, die die Anwesenheit von Biopolymeren anzeigen. Normalerweise sind Hydrolyseprodukte im Reaktor kaum nachweisbar, da die Aufnahme und Umsetzung der Hydrolyseprodukte sehr schnell stattfindet. Je nach Enzymmenge und Wahrscheinlichkeit des Kontaktes zwischen Enzym und reaktiver Oberfläche der Biomasse ergibt sich die Hydrolyserate. Je kleiner die Partikel bei gleichem Gesamtvolumen sind, desto besser verfügbar ist das Substrat für die Enzyme [Rosenwinkel et al., 2015]. Glykosidische Bindungen werden gespalten, wobei Mono- und Dimere mit der Summenformel $C_n(H_2O)_n$ entstehen. Cellulose wird durch Cellulasen zu Cellobiose gespalten, die durch Cellobiase in zwei Glukosemoleküle aufgetrennt wird. Hemicellulosen werden entsprechend der Hauptzuckerkomponenten durch Xylanasen oder Hydrolasen zu Dimeren wie Xylobiose und anschließend zu Pentosen aufgeschlossen [Rosenwinkel et al., 2015].

In der zweiten metabolischen Phase vergären fermentative Bakterien die Produkte der Hydrolyse unter Bildung von Alkoholen, Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und niedermolekularen organischen Säuren (vor allem Essigsäure, Propionsäure, *n*-Buttersäure, Milchsäure), weshalb sie auch Acidogenese (Säurebildung) genannt wird [Dieckmann et al., 2016; Rosenwinkel et al., 2015]. Extrazelluläre Hydrolyse und Umsetzung der Hydrolyseprodukte werden oft von den gleichen Organismen katalysiert [Rosenwinkel et al., 2015]. Die Aufnahme der Hydrolyseprodukte erfolgt hauptsächlich durch aktiven Transport in die Zelle, wo weitere Stoffwechselvorgänge wie die Glykolyse stattfinden. Die Diversität der bakteriellen Gärer kann mehrere Tausend verschiedene Arten, besonders aus den Klassen *Clostridia*, *Bacteroidia*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* und *Bacilli*, umfassen [Dieckmann et al., 2016]. Während der Acidogenese können durch mikrobielle Kettenverlängerungen Butter- aus Essigsäure oder Valerian- aus Propionsäure gebildet werden. Der Gärprozess gleicht demnach mehr einem mäandernden als einem linearen Stoffwechselgeschehen [Dieckmann et al., 2016].

Die dritte metabolische Stufe wird Acetogenese (Acetatbildung) genannt [Rosenwinkel et al., 2015]. Hier werden die organischen Säuren und Alkohole durch Oxidation (Alkohole), β -Oxidation (langkettige Fettsäuren) oder Decarboxylierung zu Acetat abgebaut. Außerdem entstehen Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und andere C1-

Verbindungen. Acetogene Bakterien benötigen für den Abbauprozess einen niedrigen Wasserstoffpartialdruck, da er nur so thermodynamisch möglich ist. Sie stehen deshalb in enger räumlicher Beziehung zu wasserstoffverbrauchenden Mikroorganismen. Diese Abhängigkeit von Mikroorganismen wird als Syntrophie bezeichnet. Als syntrophe Partner der acetogenen Bakterien agieren vor allem methanogene Archaeen oder sulfatreduzierende Bakterien. Außerdem besteht die Möglichkeit Acetat aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, also die umgekehrte Reaktion der syntrophen Acetatoxidation, zu bilden [Dieckmann et al., 2016]. Die beteiligten acetogenen Bakterien stammen vor allem aus den Ordnungen *Synergistales*, *Syntrophobacterales*, *Clostridiales* und *Thermoanaerobacteriales* [Dieckmann et al., 2016].

In der vierten metabolischen Stufe entsteht Methan durch die Aktivität spezialisierter strikt anaerober Mikroorganismen, den methanogenen Archaeen. Sie werden stoffwechselphysiologisch in drei Gruppen, die Hydrogenotrophen, Methylotrophen und Acetotrophen, eingeteilt [Dieckmann et al., 2016]. Beim hydrogenotrophen Weg wird Kohlenstoffdioxid mit Wasserstoff reduziert. Methylierte Verbindungen wie z.B. Methanol dienen beim methylotrophen Weg als Substrat. Beim dritten, acetoklastischen, Weg wird Acetat direkt unter Bildung von Methan und Kohlenstoffdioxid gespalten [Dieckmann et al., 2016]. In Kombination mit der hydrogenotrophen Methanogenese kann außerdem Acetat über den sonst thermodynamisch ungünstigen Weg der syntrophen Acetatoxidation zu Methan und Kohlenstoffdioxid abgebaut werden. Die meisten bekannten Methanbildner sind zur hydrogenotrophen und methylotrophen Methanogenese in der Lage. Insgesamt sind sechs verschiedene Ordnungen der methanogenen Archaeen beschrieben: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanocellales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* und *Methanopyrales*. Acetoklastische Methanogenese erfolgt durch *Methanosarcina* bei hohen und durch *Methanosaeta* bei niedrigen Acetatkonzentrationen. *Methanosaetaceae* stellt die einzige Familie dar, die ausschließlich den acetoklastischen Weg katalysieren kann [Dieckmann et al., 2016].

1.3 Haupt- und Nachgärersystem

In einem Haupt- und Nachgärersystem wird ein zweiter Reaktor (Nachgärer) dem sogenannten Hauptgärer nachgeschaltet [URL 5]. Dabei können Perkolationsysteme, in denen das feste Substrat mit einer Prozessflüssigkeit berieselt wird, mit methanogenen Reaktoren (z.B. Rührkesselreaktor) kombiniert werden [Lehtomäki, 2006]. Der Rührkesselreaktor oder CSTR (*continuous stirred tank reactor*) ist in der Biotechnologie auf Grund des großen Erfahrungsschatzes und insbesondere wegen des breiten Anwendungsspektrums weit verbreitet [Souidi, 2008]. Im einfachsten Fall besteht ein CSTR aus einem luftdichten Behälter und dem Rührwerk. Meist sind Komponenten wie Heiz-/Kühlmantel, Strombrecher, Rührmotor etc. verbaut. In einem Perkolationsreaktor soll eine Zirkulation von Prozessflüssigkeit das Vergären von stapelbaren Substraten wie z.B. Bioabfall effektiver gestalten. Da der Feststoffanteil des Perkolats gering ausfällt, können als methanogene Reaktoren auch Hochleistungsreaktoren wie UASB-Reaktoren (*upflow anaerobic sludge blanket*) oder Festbettreaktoren benutzt werden. Die anaerobe Vergärung in zweistufigen Perkolationsystemen kann zu einem höheren Methanertrag als bei einem einstufigen Perkolationsreaktor führen [Lehtomäki, 2006].

1.4 Lignocellulose im Biogasprozess

Lignocellulose stellt einen reichlich vorkommenden und nachwachsenden Rohstoff dar, der in Zukunft eine immer wichtigere Rolle einnehmen wird. Er kann für die Herstellung von Kraftstoffen und Chemikalien verwendet werden. Die Produktion von Energieträgern wie z.B. Bioethanol wird heute schon erfolgreich mit Substraten wie Zuckerrohr, Mais oder Weizen betrieben. Die Nutzung eines reichlich vorkommenden Reststoffes wie Stroh würde die Produktion von Bioethanol oder Biogas noch konkurrenzfähiger gegenüber den fossilen Rohstoffen machen [Zaldivar, 2001]. Als Reststoff steht Stroh zudem nicht in Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion wie es bei Mais, Zuckerrohr oder Weizen der Fall ist. Der Vorteil von Lignocellulose ist vor allem die hohe Verfügbarkeit und kein Konkurrenzdruck mit der Lebensmittelindustrie. Lignocellulose findet man vor allem in landwirtschaftlichen Reststoffen wie Weizenstroh, Maisstängeln, Sojabohnenrückständen oder Zuckerrohrbagassen, aber auch in industriellen Reststoffen

der Papier- und Zellstoffindustrie. Der Anteil von Lignocellulose an weltweit verfügbarer Biomasse beträgt schätzungsweise 50% und ist damit das häufigste erneuerbare organische Material [Chen, 2014].

Pflanzliches Material erhält Festigkeit und Struktur hauptsächlich durch drei Hauptpolymere – Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Zusammen werden sie auch als Lignocellulose bezeichnet [Sanderson, 2011; Hendriks, 2008]. Aufsummiert entsprechen die drei Lignocellulose-Komponenten im Durchschnitt 80% des Gesamtgewichts vom Substrat [Chen, 2014]. Der restliche Anteil besteht aus Proteinen, Fetten, Wasser, Pektin und anderen Substanzen. In Stroh ist dieser Anteil wesentlich geringer und der Anteil an Asche höher [Chen, 2014]. Cellulose ist weltweit das häufigste Polymer bestehend aus tausenden β -D-Glucose-Molekülen verknüpft durch β -1,4-glykosidische Bindungen (Abbildung 2). Die sich wiederholende Struktureinheit ist ein Disaccharid und wird als Cellobiose bezeichnet [Chen, 2014]. Cellobioseketten organisieren sich in sogenannten Cellulosefibrillen, die nur durch schwache Wasserstoffbrückenbindungen gebunden sind [Hendriks, 2008]. Der Verband aus Cellobioseketten, Lignin und Hemicellulose bildet ein hydrolyseresistentes Molekül. Cellulose kann enzymatisch oder durch Einsatz von konzentrierten Säuren gelöst werden [Chen, 2014].

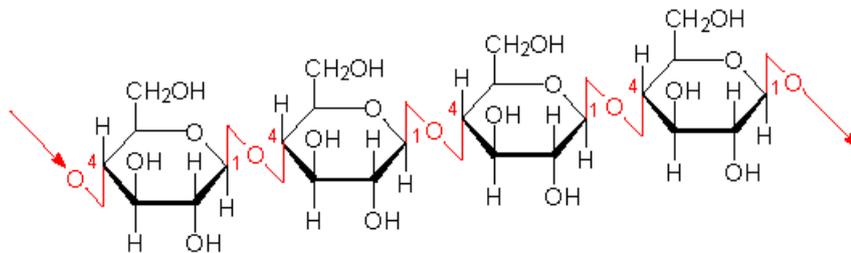


Abbildung 2. Cellulosekette; die glykosidische Bindung ist rot markiert [URL 1]

Hemicellulose ist im Gegensatz zu Cellulose ein heterogenes Polymer. Es besteht aus verschiedenen Zuckermolekülen wie Hexosen (Glucose, Galactose oder Mannose), Pentosen (Xylose und Arabinose) und Uronsäuren [Chen, 2014]. Die Zusammensetzung von Hemicellulose ist dabei abhängig von der Pflanze. In landwirtschaftlich anfallendem Pflanzenmaterial wie Stroh dominieren Xylane [Hendriks, 2008]. Auf molekularer Ebene besitzen Hemicellulosen meist kurze seitliche Ketten aus verschiedenen Zuckern, wodurch das Molekül insgesamt einfach zu hydrolysieren ist. Hemicellulose verbindet

Cellulose und Lignin und schafft somit Starrheit im Cellulose-Hemicellulose-Lignin-Netzwerk [Hendriks, 2008]. Lignin, das in der Natur am meisten vorkommende aromatische Polymer, ist ein komplexes Molekül aus verknüpften Polymeren mit einem phenolischen Charakter [Sanderson, 2011]. Abbildung 3, in der ein Ligninmolekül dargestellt ist, zeigt die komplexe Struktur, die Lignin annehmen kann. Lignin gibt der Pflanze strukturelle Unterstützung, Undurchlässigkeit sowie Schutz vor oxidativem Stress und mikrobiellen Angriffen [Hendriks, 2008]. Die starken Bindungen innerhalb des Lignin-Moleküls erschweren dessen Spaltung. Die genaue Zusammensetzung von Lignin hängt von der jeweiligen Pflanzenart ab.

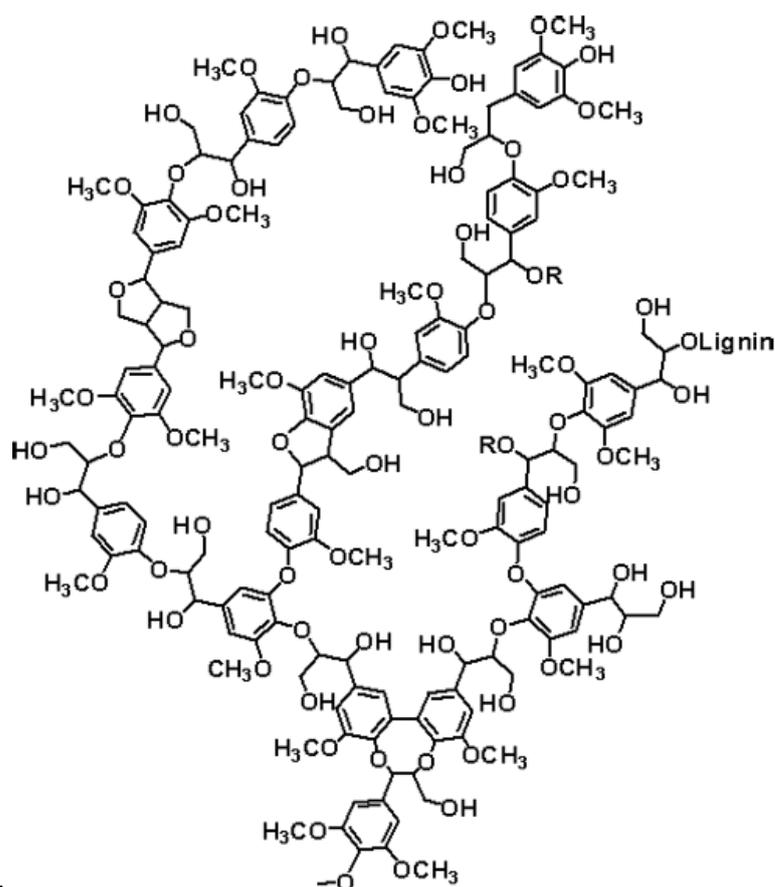


Abbildung 3. Variante eines Ligninmoleküls [URL 2]

Cellulose, Hemicellulose und Lignin bilden multiforme Zusammensetzungen. Abbildung 4 zeigt die gemeinsame Struktur von Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Ein anaerober Abbau von Lignin ist nicht bekannt. Die abbaubaren Substanzen Cellulose und Hemicellulose sind für die hydrolytischen Bakterien dadurch nur schwer zugänglich. Mit

einer alkalischen Substratvorbehandlung kann die Lignocellulosematrix aufgelöst und dadurch eine anaerobe Vergärung von Cellulose und Hemicellulose erleichtert werden. Als Folge dessen wird die Hydrolyseeffizienz und schließlich der Methanertrag gesteigert [Dieckmann et al., 2016; Chen, 2014].

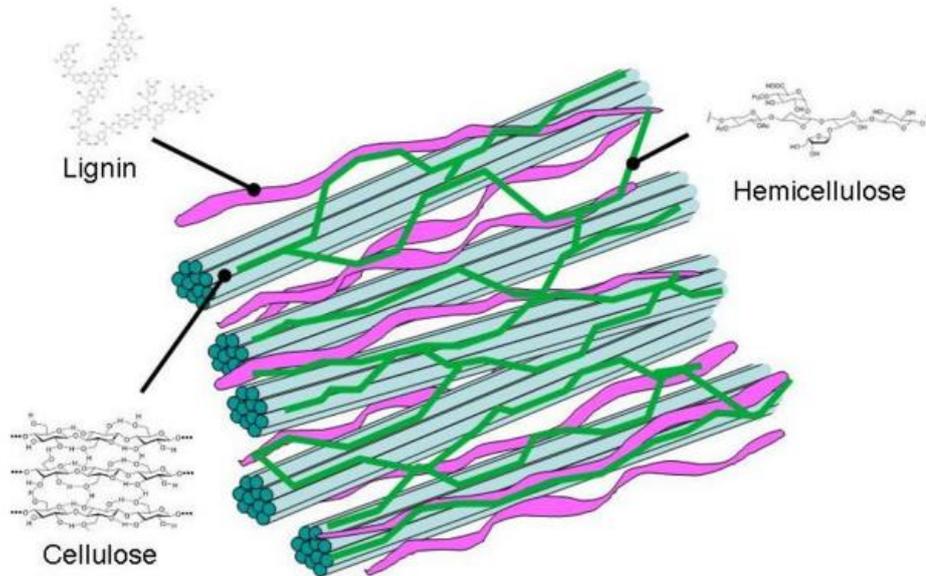


Abbildung 4. Lignocellulosestruktur [URL 3]

1.5 Vorbehandlungsmöglichkeiten für lignocellulosehaltige Substrate

Schon lange wird daran geforscht, die Verdaulichkeit von lignocellulosehaltiger Biomasse zu verbessern um hauptsächlich eine effiziente Umsetzung von (Hemi-) Cellulose zu Ethanol, Methan oder auch Wasserstoff gewährleisten zu können [Hendriks; 2008]. Eine erfolgreiche Vorbehandlung setzt voraus, dass die Eigenschaften und Charakteristiken der lignocellulosehaltigen Biomasse erkannt werden. Die Bioverdaulichkeit von lignocellulosehaltigen Substraten ist besonders durch Faktoren wie die kristalline Struktur der Cellulose, den Ligningehalt und die verfügbare Oberfläche begrenzt [Zaldivar; 2001].

1.5.1 Mechanisches Vorbehandeln

Eine mechanische Vorbehandlungsmethode ist das Mahlen, auch Walzen oder Fräsen genannt. Ziel dabei ist die Zerkleinerung der lignocellulosehaltigen Biomasse. Nehmen

Partikelgröße und Polymerisationsgrad ab, steigt die potenziell angreifbare Oberfläche [Hendriks; 2008]. Dadurch kann die Hydrolyseeffizienz abhängig von der Biomasse sowie Art und Dauer des Mahlens um 5-25% gesteigert werden. Ebenso kann die Verdauungszeit um 23-59% reduziert werden. In der Konsequenz wird auch der Methanertrag um 5-25% verbessert.

1.5.2 Thermisches Vorbehandeln

1.5.2.1 Dampfvorbehandlung/Dampfexplosion (ST/SE)

Beim Dampfvorbehandeln wird Biomasse mit heißem Dampf und Druck in einem Reaktor versetzt. Nach einer kurzen Zeit wird der Dampf, der Temperaturen bis zu 240 °C erreicht, abgelassen und die Biomasse dadurch schnell abgekühlt. Ziel dabei ist das Aufschließen der Hemicellulose wodurch die Cellulose besser hydrolytisch erreichbar gemacht werden soll sowie das Verhindern von Inhibitorbildung [Hendriks; 2008]. Während der Dampfvorbehandlung werden Teile der Hemicellulose hydrolysiert und bilden dadurch Säuren, die die weitere Hydrolyse katalysieren. Man spricht von einem *auto-cleave* Effekt [Hendriks; 2008]. Eine dabei zu beachtende Größe ist die Feuchtigkeit der Biomasse. Sie beeinflusst die Vorbehandlungszeit dahingehend, dass die optimale Bedampfzeit steigt je höher der Feuchtigkeitsanteil ist. Insgesamt trägt die Dampfvorbehandlung das Risiko Produkte wie Furfural, Hydroxymethylfurfural (HMF) oder lösliche, phenolische Bestandteile frei zu setzen, die später die Methanogenese hemmen.

1.5.2.2 Liquid hot water (LHW)

Eine weitere thermische Vorbehandlungsmethode ist das LHW-Verfahren. Dabei wird anstelle von Dampf flüssiges, heißes Wasser eingesetzt. Ziel dabei ist es hauptsächlich die Hemicellulose aufzulösen und mögliche Inhibitorbildung zu verhindern [Hendriks; 2008]. Ein wichtiger Faktor ist dabei der pH-Wert, der zwischen 4 und 7 gehalten werden sollte. Der wesentliche Unterschied zwischen Dampf- und LHW-Methode ist die Anzahl der aufgeschlossenen Produkte, welche bei der LHW-Methode signifikant höher ausfällt. Allerdings ist die Konzentration der aufgeschlossenen Teilchen bei der Dampfmethode höher, da der Wassereintrag geringer ist. Diese niedrige Produktkonzentration bei der

LHW-Methode verringert die Gefahr hemmender Produkte wie Furfural oder ausfallenden phenolischen Ligninkomponenten [Hendriks; 2008].

1.5.3 Chemisches Vorbehandeln

1.5.3.1 Säurevorbehandlung

Die Vorbehandlung lignocellulosehaltiger Substrate mit Säuren bei Raumtemperatur erhöht die anaerobe Verdaulichkeit, indem die Hemicellulose aufgeschlossen und dadurch die Cellulose besser erreichbar wird [Hendriks; 2008]. Verwendet werden verdünnte oder konzentrierte Säuren. Die Xylane und somit die Hemicellulose werden dabei hydrolysiert, was auch zur Folge haben kann, dass Monomere wie Furfural, Hydroxymethylfurfural (HMF) oder andere flüchtige Produkte in saurer Umgebung entstehen. Während der Säurevorbehandlung fallen außerdem Bestandteile des Lignins aus. Dieser Effekt ist bei starken Säuren ausgeprägter. Methanogene können bis zu einer bestimmten Konzentration Furfural und HMF tolerieren, wodurch die Säurevorbehandlung bei der Methangasproduktion attraktiv bleibt.

1.5.3.2 Alkalische Vorbehandlung

Bei der alkalischen Vorbehandlung findet eine Art Solvatisierung statt, wodurch die Biomasse anschwillt. Dadurch wird sie leichter zugänglich für Enzyme und Bakterien [Hendriks; 2008]. Hohe alkalische Konzentrationen erzeugen eine Art alkalische Hydrolyse, bei der Seitenketten abgetrennt und gelöste Polysaccharide zersetzt werden können. Das Abtrennen der Seitenketten ist vorteilhaft für die spätere Umsetzung, erhöht jedoch die Anzahl an niedermolekularen Verbindungen, was die Gefahr birgt, Kohlenstoff in Form von Kohlenstoffdioxid zu verlieren. Xylane können selektiv mit Kaliumhydroxidlösung entfernt werden. Die Temperatur wird dabei auf Raumtemperatur oder niedriger gehalten, um das Abtrennen der Seitenketten zu unterdrücken. Bei der alkalischen Vorbehandlung werden Teile der Basen verbraucht. Außerdem findet Lösen von Lignins und eine Modifizierung des kristallinen Zustandes der Cellulose statt. Die Veränderungen der Cellulosestruktur können jedoch zu einer dichteren und thermostabileren Cellulose führen. Eine andere übliche Vorbehandlung ist die thermochemische Vorbehandlung mit Einsatz von Kalk. Kalk ist billig und eignet sich auch deswegen, da das Calcium in Form von unlöslichem Calciumcarbonat einfach

wiedergewonnen werden kann [Hendriks; 2008]. Die thermische Kalkvorbehandlung findet bei 100-150 °C und 0,1 g Ca(OH)₂ pro g Substrat statt. Kalk hat den Effekt, dass es das Substrat zugänglicher für die Hydrolyse macht, indem es das sogenannte „Acetyl- und Ligninventil“ öffnet. Bei einer Biomasse mit hohem Ligninanteil versucht man eine thermische in Kombination mit einer alkalisch-oxidativen Vorbehandlung. Sauerstoff soll hierbei als Oxidationsmittel die enzymatische Verdaulichkeit erhöhen. Bei der sogenannten AFEX-Vorbehandlung verwendet man Ammoniak, welches im Verhältnis 1:1 (kg Ammoniak: kg trockene Biomasse) 10-60 Tage bei Raumtemperatur eingesetzt wird [Hendriks; 2008]. Verwendet man eine Temperatur von bis zu 120 °C, dauert die Vorbehandlung nur einige Minuten.

1.6 Analyse von Zusammensetzung und Dynamik mikrobieller Biogasgemeinschaften

Untersuchungen von mikrobiellen Gemeinschaften und deren Dynamik benötigen kulturunabhängige Methoden, wie das Vervielfältigen von rRNA-Genen mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [Vidali, 2001]. Während phylogenetische Informationen über einen dominanten Organismus einer Gemeinschaft leicht über geklonte PCR-Produkte generiert werden können, steigen Aufwand und Kosten bei der Analyse mehrerer Proben [Vidali, 2001]. Bei der PCR werden phylogenetische oder funktionelle Markergene amplifiziert. Das *mcrA*-Gen codiert die Methyl-Coenzym-M-Reduktase. Es kommt in allen methanogenen Archaeen vor und dient deshalb als phylogenetischer und funktioneller Marker. Das 16S-rRNA-Gen ist ein universeller phylogenetischer Marker für Bakterien und auch Methanogene (Luton et al., 2002). Primersysteme, die eine Vielzahl von Mitgliedern der Domäne *Bacteria* abdecken, können in der PCR für die Amplifikation des 16S-rRNA-Gens angewendet werden [Osborn et al., 2000].

1.6.1 T-RFLP-Analyse

Eine Analyse mittels terminalem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP) ist eine schnelle *fingerprinting* Methode zum *profiling* eines homologen Amplikons z.B. des 16S-rRNA- oder *mcrA*-Gens komplexer Gemeinschaften von Mikroorganismen. Dabei können Beziehungen zwischen Diversität, Struktur, Dynamik und bestimmten

Umweltbedingungen untersucht werden [URL-4]. Die Methode findet z.B. Anwendung bei Untersuchungen der Bakterienflora im Speichel oder bei Untersuchungen von Boden-, Wasser- und Schlammproben aus Bioreaktoren, Anreicherungskulturen, Pflanzenwurzeln, Wasser aus Goldminen oder Schweinedärmen. Anwendung findet die Methode auch in der Forensik sowie bei der Qualitätskontrolle von Wasser und Nahrungsmitteln [Liesack & Dumfield, 2004]. Sie zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie eine kultivierungsunabhängige, schnelle, sensitive und reproduzierbare Methode ist. Die Methode beginnt mit der DNA-Extraktion und –Aufreinigung (siehe Abbildung 5). Anschließend werden die Markergene amplifiziert. Dazu werden *forward* oder *reverse* Primer am 5'-Terminus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die PCR-Produkte werden anschließend gelöst und mit Restriktionsenzymen, die eine 4-Basenpaarerkennungsseite haben z.B. *Bst*NI oder *Rsa*I, geschnitten. Dadurch werden fluoreszenzmarkierte terminale Restriktionsfragmente (T-RFs) erzeugt. Die geschnittenen, unterschiedlich langen Fragmente werden dann mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Auf Grund der Markierung am 5'-Ende können die Fragmente detektiert und quantifiziert werden, wodurch eine Reihe von Peaks (Fragmenten) unterschiedlicher Größen und Höhen entstehen [Osborn et al., 2000]. Ein Peak steht für ein Profil, also einen Organismus, aus der Probe. Die verwendete Apparatur muss die Fähigkeit besitzen, mindestens zwei Farbstoffe zu detektieren, da ein Größenstandard mitgeführt werden muss. Abschließend wird eine Cluster-Analyse basierend auf den erstellten Profilen angefertigt. Ein wesentlicher Vorteil der T-RFLP-Analyse ist die hohe Reproduzierbarkeit der Größe und Signalintensität der individuellen T-RF-Profile einer Probe [Liesack & Dumfield, 2004].

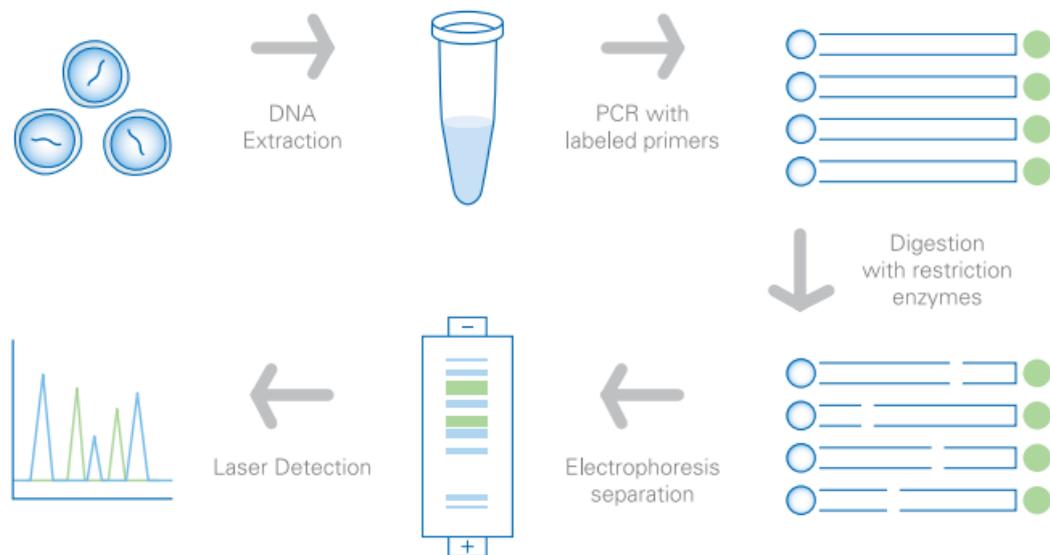


Abbildung 5. T-RFLP-Analyse als Flussdiagramm [Quelle: URL-4]

1.6.2 NMDS (Nicht-metrische multidimensionale Skalierung)

Eine multidimensionale Skalierung ist eine Ähnlichkeitsstrukturanalyse, dessen Ziel es ist, Objekte räumlich so anzuordnen, dass deren Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten durch den Abstand zueinander abgebildet werden [Borg & Groenen, 2005]. Je weiter entfernt voneinander, desto unähnlicher sind sich also die Objekte und umgekehrt. Dabei werden Informationen über Objektpaare erhoben, um daraus metrische Informationen über die Objekte zu ermitteln. Bei der metrischen multidimensionalen Skalierung werden die Objekte mit Abständen d_{ij} in einem m -dimensionalen Raum so angeordnet, dass die euklidischen Distanzen in diesem Raum möglichst den Distanzen d_{ij} entsprechen [Clarke & Warwick, 2001]. Die NMDS erweitert die metrische multidimensionale Skalierung dahingehend, dass keine explizite Funktion f zur Umwandlung von (Un-)Ähnlichkeiten in Distanzen angegeben wird. Außerdem werden nicht-euklidische Geometrien zur Auffindung von Konfigurationen angewendet. Unter Konfiguration versteht man die Lösung der multidimensionalen Skalierung. NMDS verwenden beispielsweise die Algorithmen Bray-Curtis. Um eine optimale Anpassung der NMDS-Lösung an die Rohdaten zu gewährleisten, gibt es verschiedene Gütekriterien. Besonders erwähnenswert ist der Stresswert. Er gibt eine Aussage über das Verhältnis von Distanzen und auftretender Disparität. Ein NMDS-Plot kann mit Programmen wie R erstellt werden.

T-RF-Profile werden mittels NMDS geplottet, wobei die Stellungsunterschiede den Unähnlichkeiten der Profile angepasst sind. Eine größere Distanz bedeutet eine größere Unähnlichkeit [Borg & Groenen, 2005]. Ebenso können Korrelationen von entscheidenden Prozessparametern zur Struktur und Dynamik der Gemeinschaft angefertigt werden.

2 Zielstellung

In dieser Arbeit sollten die Zusammensetzung und Dynamik von bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften in einem zweistufigen Reaktorsystem zur anaeroben Vergärung von Weizenstroh untersucht werden. Das Reaktorsystem bestand aus einem Perkolationsreaktor als Hauptgärer und einem CSTR als Nachgärer. Im Prozessverlauf wurde unbehandeltes sowie alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh im Erste-Stufe-Reaktor als Substrat eingesetzt. Außerdem wurde in diesem Reaktor die Feststoffverweilzeit (*solids retention time*, SRT) verkürzt sowie eine alkalitolerante Anreicherungskultur aus einem Umwelthabitat eingesetzt (Bioaugmentation). In der Bachelorarbeit sollte der Einfluss dieser Maßnahmen (alkalische Substratvorbehandlung, Verkürzung der SRT und Bioaugmentation) im Erste-Stufe-Reaktor auf die mikrobiellen Gemeinschaften des Erste- und Zweite-Stufe-Reaktors mittels molekularbiologischer Techniken untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

- EDTA: 125 mM pH 8,0 in HPLC-H₂O, Pulver von Roth
- Ethidiumbromid: 5 mg/mL in TBE-Puffer
- TAE (20x)

3.2 Molekularbiologische Reagenzien

- HPLC-H₂O von J.T. Baker
- Rox 500 Red Dna Size Standard von Nimagen
- Map Marker 1000 von BioVentures
- Loading Dye – 6 x Puffer: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % (w/v) Sucrose in H₂O (dest.)
- 1 kb Standard von New England BioLabs GmbH
- 100 bp Standard von New England BioLabs GmbH
- Restriktionsenzyme und Puffer von New England BioLabs GmbH (*RsaI*, *MspI*, *MwoI*, *BstNI*, Puffer Cut Smart, Puffer 3, Puffer 3.1)
- Biozym LE Agarose Biozym von Scientific GmbH
- MyTaq Mix (2x) von Bioline
- Mlas 5' GGTGGTGTMGGDTTCACMCARTA 3',
mcrA-rev 5' CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT 3',
UniBac27f-FAM 5' GAG TTT GAT CMT GGY TCA G 3',
Univ1492r 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'
von Eurofins Genomics
- NucleoSpin Microbial DNA von Machery-Nagel GmbH & Co. KG
- SureClean von Bioline

3.3 Geräte

- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5430 R Eppendorf AG
- Brutschrank: G-Heraeus-Brutschrank von Heraeus Instruments
- Genetic Analyzer: ABI-PRISM 3130xl von Applied Biosystems / HITACHI

- Thermocycler: C1000 Touch Thermal Cycler von Bio-Rad
- Thermocycler: Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler DNA-Engine von Bio-Rad
- UV-Vis-Spektralphotometer: NanoDrop ND-1000
- Elektrophoresekammer: Mupid-One Electrophoresis System von Nippon Genetics Europe GmbH
- Transilluminator: Chemí Genius Bio Imaging System von Syngene

3.4 Reaktorsystem

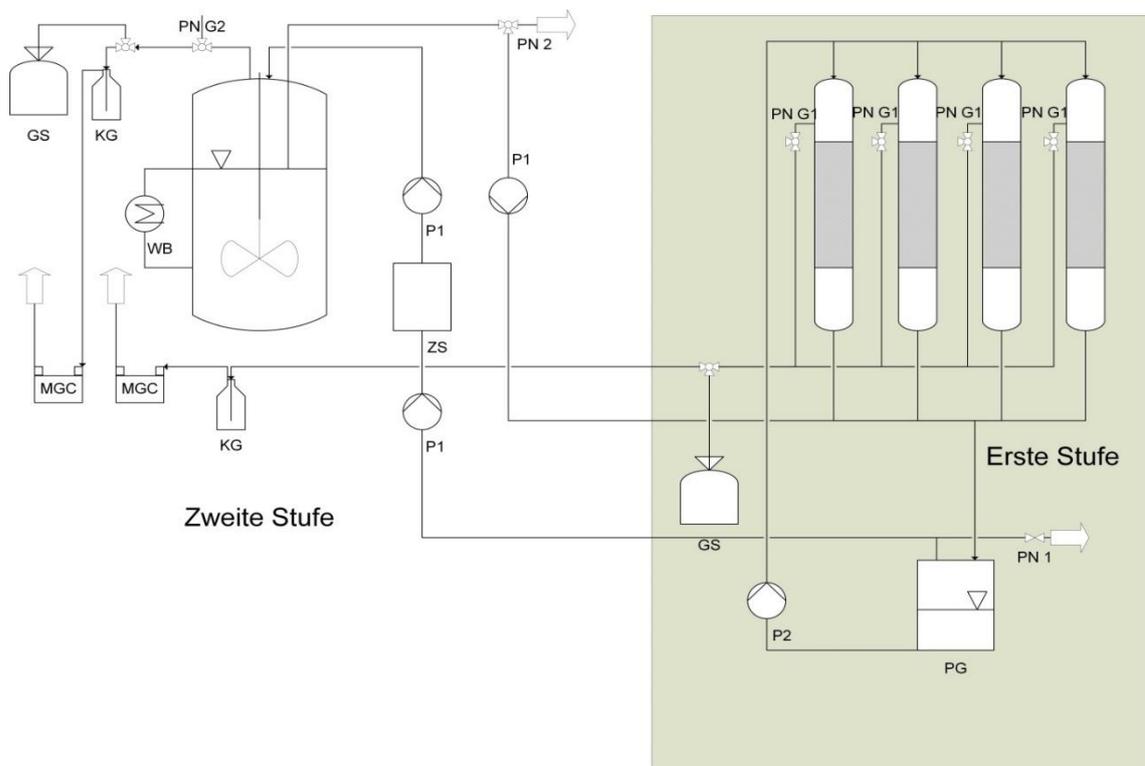


Abbildung 6. Zweistufiges Reaktorsystem zur Vergärung von Weizenstroh und Schlempe (Quelle: Wunsch, 2014)

In einem zweistufigen Reaktorsystem (siehe Abbildung 6), bestehend in der ersten Stufe aus einem semikontinuierlichen Perkulationsreaktor aus insgesamt 4 Säulen, wurde ein Stroh-Schlempe-Gemisch anaerob vergoren. Jede Säule wurde zunächst aller 18 d, später aller 8 d, der Anlage entnommen und der feste Gärrest mit frischem Substrat ersetzt. Bei jedem dieser Wechsel wurden als Substrate 35 g Weizenstroh und 57,81 g gemahlene Getreideschlempe sowie 17,5 g Gärrest als Inokulum eingesetzt. Das Perkolat aus der ersten Stufe wurde gesammelt und 540 mL täglich als Substrat in die zweite Stufe, einen Rührkesselreaktor, gepumpt. Die erste Stufe war unterschiedlichen Maßnahmen

(alkalische Substratvorbehandlung mit Calciumhydroxid, Verkürzung der SRT von 19 d auf 9 d, Bioaugmentation) ausgesetzt (siehe Tabelle 1). Bei der Bioaugmentation wurde eine an den alkalischen pH-Wert angepasste, aus einem Umwelthabitat angereicherte Kultur (S37°C Kultur nach Porsch et al., 2015) eingesetzt um besonders die Hydrolyseeffizienz zu verbessern. Der Versuch lief insgesamt ungefähr 330 Tage (Tag 400-730, siehe Tabelle 1). Vor Tag 400 wurden Prozessparameter variiert um einen stabilen Prozess zu etablieren.

Tabelle 1. Übersicht der Maßnahmen im Erste-Stufe-Reaktor

Zeit [d]	Datum	Maßnahme
400	09.10.2012	Beschickung der ersten Stufe mit unbehandeltem Stroh sowie Schlempe, SRT: 18 d (Beginn Phase 1)
511	28.01.2013	Substratwechsel auf vorbehandeltes Stroh (Beginn Phase 2)
632	29.05.2013	SRT verkürzt auf 8 d (Beginn Phase 3)
660	26.06.2013	Substratwechsel auf unbehandeltes Stroh (Beginn Phase 4)
695	31.07.2013	Substratwechsel auf vorbehandeltes Stroh + Bioaugmentation (Beginn Phase 5)

4 Methoden

In dieser Arbeit fand keine Reaktorbetreuung statt. Weder die Probenahmen noch der Einsatz der Maßnahmen wurden während der Bachelorarbeit durchgeführt.

4.1 DNA-Extraktion

Aus ausgewählten Proben von Prozessflüssigkeit (Perkolat) des Erste-Stufe-Reaktors bzw. Gärmedium des Zweite-Stufe-Reaktors wurde die genomische DNA nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Microbial DNA Kit von Macherey-Nagel isoliert. Die 1,5 mL Proben waren zuvor unmittelbar aus dem Reaktorsystem genommen, zehn Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend bei -20 °C gelagert worden.

4.1.1 Gelelektrophorese nach DNA-Extraktion

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese wurde überprüft, ob die isolierte DNA fragmentiert vorliegt. Sollte die DNA in mehreren Fragmenten vorliegen, würden mehrere Banden für eine Probe auf dem Gel erkennbar sein. Für das 0,8%ige Gel wurde Biozym LE Agarose in TAE (20x) gelöst, auf Gelträger gegossen und abgekühlt. 10 µL DNA wurden je mit 1 µL LoadingDye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wurden 5 µl 1 kb-Marker verwendet. Die Gelelektrophorese für isolierte DNA lief 25 min bei 135 V. Anschließend wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid gefärbt und im Transilluminator bei 150 nm betrachtet.

4.1.2 Quantifizierung der isolierten DNA

Die DNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop ND-100 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Gemessen wurde 1 µL Probe. Es wurden die Adsorptionskoeffizienten (Ak) $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ und $\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$ ermittelt, um Aussagen über die Reinheit der isolierten DNA treffen zu können. Für den Blindwert wurde der Elutionspuffer des DNA-Extraktionskits verwendet.

4.2 PCR

4.2.1 16S rRNA-Gene (*Bacteria*)

Für die Amplifizierung der 16S rRNA-Gene wurden die Primer UniBac27f-FAM (markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM) und Univ1492r verwendet:

UniBac27f-FAM 5' GAG TTT GAT CMT GGY TCA G 3'

Univ1492r 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

Der PCR-Ansatz (12,5 µL) wurde wie folgt erstellt:

- je 0,7 µL Primer
- 6,25 µL MyTaq Mix
- 3,85 µL PCR-Wasser
- 1 µL Template-DNA

Das für die Amplifizierung der 16S-Gene verwendete Programm 16SMY30 beinhaltetete neben dem initialen Denaturieren und dem Vervollständigen 30 Zyklen Denaturieren, Annealing und Elongation (Tabelle 2).

Tabelle 2. PCR-Programm 16SMY30

Parameter	Temperatur [°C]	Zeitdauer	Zyklen
Initiales	95	1 min	1 x
Denaturieren			
Denaturieren	95	15 s	30 x
Annealing	58	15 s	
Elongation	72	10 s	
Vervollständigen	72	15 min	1 x
Finales Kühlen	8	-	-

4.2.2 *mcrA*-Gene (Markergen für Methanogene)

Für die Amplifizierung der *mcrA*-Gene wurden die Primer mlas und *mcrA*-rev (markiert mit Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM) verwendet:

mlas 5' GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA 3'

mcrA-rev 5' CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT 3'

Der PCR-Ansatz (12,5 μL) wurde wie folgt erstellt:

- je 0,7 μL Primer
- 6,25 μL MyTaq Mastermix
- 3,85 μL PCR Wasser
- 1 μL Template-DNA

Das für die Amplifizierung der *mcrA*-Gene verwendete Programm 52mcrA30 beinhaltete neben dem initialen Denaturieren und dem Vervollständigen fünf Zyklen Denaturierung sowie Annealing und Elongation. Der Temperaturanstieg von Annealing zur Elongation erfolgte bei 0,1 K/s. Darauf folgten 30 Zyklen Denaturieren, Annealing und Elongation (Tabelle 3).

Tabelle 3. PCR-Programm 52mcrA30

Parameter	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeitdauer	Zyklen
Initiales	95	3 min	1 x
Denaturieren			
Denaturieren	95	30 s	5 x
Annealing	48	45 s	
Elongation	72	30 s	ramp*
Denaturieren	95	30 s	30 x
Annealing	52	45 s	
Elongation	72	30 s	
Vervollständigen	72	20 min	1 x
Finales Kühlen	8	-	-

* 0,1 K/s von der Annealing- zur Elongationstemperatur

4.2.3 Gelelektrophorese nach PCR

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese wurde die Qualität der amplifizierten DNA überprüft. Für ein 1,5%iges Gel wurde Biozym LE Agarose in TAE (20x) gelöst. In jede Kammer wurden 5 μL TAE (20x), 1 μL LoadingDye und 1,5 μL Probe pipettiert. Die *mcrA*-Amplikons wiesen eine Länge von 500 bp und die 16S-Amplikons eine Länge von ungefähr 1500 bp auf. Als DNA-Standard wurde ein 100 bp-Marker verwendet. Durch das Mitführen einer Nullprobe (Wasser anstatt DNA verwendet) wurde eine Verunreinigung des Mastermixes überprüft. Die Gelelektrophorese für PCR-Produkte lief

20 min bei 135 V. Anschließend wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid gefärbt und im Transilluminator bei 150 nm betrachtet.

4.2.4 Aufreinigung und Quantifizierung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem SureClean Kit von BioLine gemäß den Angaben des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurden die DNA-Amplikons mit dem NanoDrop 1000 wie oben beschrieben photometrisch vermessen.

4.3 Restriktionsverdau

Die Restriktion erfolgte mit jeweils 2 U (Tabelle 4) der Enzyme *RsaI* und *MspI* (16S rRNA-Amplikons) bzw. *MwoI* und *BstNI* (*mcrA*-Amplikons) in der Regel über Nacht gemäß Angaben des Herstellers. Es gab folgende Abweichungen: *BstNI* für 2 h bei 60 °C, *MwoI* bei 37 °C. Tabelle 4 zeigt, welcher und wie viel µl Puffer zu dem entsprechenden Enzym verwendet wurde.

Für einen 10 µL Ansatz wurden verwendet:

2 U	Enzym
1 µL	10 x Puffer
40 ng (<i>mcrA</i>); 80 ng (16S)	gereinigtes PCR-Produkt
x µL	H ₂ O (HPLC grade)

Aus den photometrischen Messungen wurde das benötigte Volumen an gereinigtem PCR-Produkt berechnet. Bei sehr hoher Konzentration wurde 1:10 verdünnt.

Tabelle 4. Enzym- und Pufferübersicht

Enzym [µL]	Puffer [1 µL]
<i>RsaI</i> 0,2	Cut Smart
<i>MspI</i> 0,2	Cut Smart
<i>MwoI</i> 0,4	3
<i>BstNI</i> 0,1	3,1

4.4 Ethanolfällung

Zu jeder Probe wurden 2,5 µL EDTA (125 mM pH 8,0 in HPLC-H₂O) und 30 µL absolutes Ethanol gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 25 min bei 14.000 × g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurden 80 µL

70%iges Ethanol zu jeder Probe zugegeben und 20 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Restethanol in einem Exsikkator entfernt.

4.5 T-RFLP

Zu den getrockneten Pellets wurden 9,75 μ l Hi-Di™ Formamide und 0,25 μ L markierter Molekulargewichtsstandard (GeneScan ROX 500 für *mcrA*-Fragmente; MapMarker 1000 für 16S-rRNA-Amplikonfragmente) pipettiert. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Im ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurden die Restriktionsfragmente jeder Probe elektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenzsignalstärke detektiert. Die jeweilige Länge der fluoreszierenden T-RFs wurde entsprechend des Standards von der Software GeneMapper 5 ermittelt. Die taxonomische Zuordnung der *mcrA*-T-RFs fand auf Basis von experimentellen und berechneten T-RF-Längen von geklonten *mcrA* Amplikons aus mehreren lab-scale und full-scale Biogasanlagen statt [Bühlig et al., 2016].

4.6 Datenverarbeitung mit R

Für jedes verwendete Enzym wurden die T-RF-Profile aller Proben mit einem R-Script verarbeitet. Dabei wurde das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt und anschließend die Abundanz der geschnittenen Fragmentlängen prozentual ermittelt. Die Abundanz jeder Fragmentlänge in jeder Reaktorprobe wurde in einer Matrix dargestellt. Die Matrix diente als Datensatz für Diagramme und NMDS-Plots. Für die multidimensionale statistische Analyse wurde das R-Paket vegan in der Software R 3.3.0 importiert. Unter Anwendung des Bray-Curtis-Gleichheitsindex wurden Präsenz, Absenz und Abundanz der T-RF-Profile in Form einer Ähnlichkeitsmatrix zusammengefasst. Bei der Darstellung der Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den verschiedenen T-RF-Profilen wurden die Probenahmetage als Datenpunkte dargestellt. Die NMDS-Ergebnisse wurden abschließend mit Hilfe des Monte Carlo Algorithmus mit 1000 Permutationen getestet.

5 Ergebnisse

In einem zweistufigen Reaktorsystem wurden Weizenstroh und Getreideschlempe (als *N*-Quelle) vergoren. Dabei wurde die zweite Stufe täglich mit Prozessflüssigkeit aus der ersten Stufe beschickt. Die erste Stufe war unterschiedlichen Maßnahmen (alkalische Substratvorbehandlung, Verkürzung der SRT, Bioaugmentation) ausgesetzt.

Bei der T-RFLP-Analyse wurden die Markergene der 16S-rRNA (*Bacteria*) bzw. *mcrA* (Methanogene) mittels PCR amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *RsaI* und *MspI* bzw. *BstNI* und *MwoI* geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

5.1 DNA-Isolation

Auf Grund der hohen Anzahl an untersuchten Proben werden im Folgenden Ergebnisse der DNA-Isolation und PCR exemplarisch dargestellt. Nach der DNA-Isolation wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft, ob die DNA fragmentiert, also zerstört, vorliegt. Abbildung 7 und 8 zeigen die isolierte DNA der Proben 1-11 bzw. 36-47 aus dem Erste-Stufe- bzw. Zweite-Stufe-Reaktor ohne Anzeichen einer Fragmentierung. In Kombination mit der NanoDrop-Quantifizierung wurde festgestellt, ob die Qualität für eine PCR ausreichte.

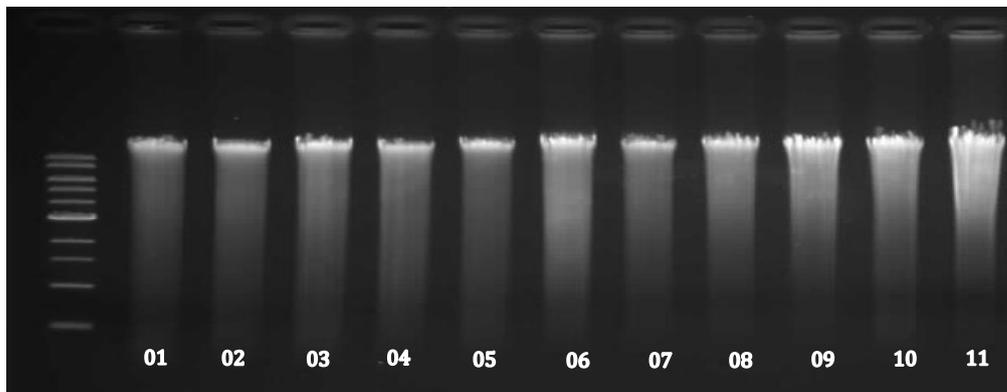


Abbildung 7. Gelelektrophorese der isolierten DNA aus der ersten Stufe; Lane 1: 1000 kb Standard

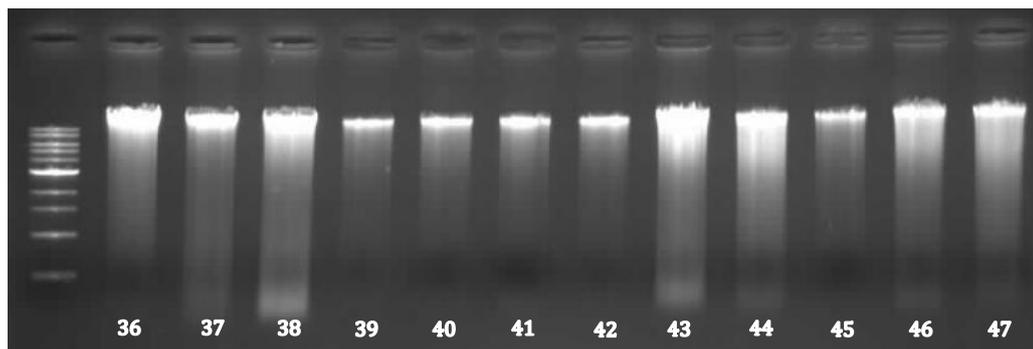


Abbildung 8. Gelelektrophorese der isolierten DNA aus der zweiten Stufe; Lane 1: 1000 kb Standard

Die AK geben Auskunft über die Reinheit der isolierten DNA (Tabelle 5). DNA guter Qualität hat einen AK $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ zwischen 1,7 und 2,0. Der AK $\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$ weist auf Salzverunreinigungen hin und sollte höher als 1,5 sein. Für Probe 43 lag dieser unter 1,0, was auf eine starke Verunreinigung hinwies. Die PCR funktionierte jedoch problemlos (Abbildung 8). Die Konzentration der isolierten DNA lag zwischen 60 und 102 ng/ μL und war somit hoch genug für die PCR.

Tabelle 5. Quantifizierung der isolierten DNA aus ausgewählten Proben beider Reaktorstufen

Probenname	Konzentration [ng/ μL]	AK $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$	AK $\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$
Erste-Stufe-Reaktor			
01	226,26	1,85	1,97
02	166,13	1,86	2,06
03	132,81	1,82	1,21
04	157,22	1,84	1,45
05	78,41	1,85	1,53
06	133,98	1,84	1,90
07	131,52	1,85	1,74
08	147,41	1,83	1,88
09	217,76	1,86	2,12
10	187,79	1,84	1,98
11	138,72	1,84	1,78
Zweite-Stufe-Reaktor			
37	99,66	1,83	1,66
38	86,02	1,77	1,50
39	100,45	1,79	1,53
40	92,37	1,87	1,37
41	102,47	1,85	1,88
42	72,13	1,84	1,66
43	60,53	1,94	0,92
44	67,68	1,85	1,60
45	83,53	1,93	1,64
46	104,97	1,87	1,74
47	72,66	1,89	1,95

5.2 PCR

Ob die PCR funktioniert hat, wurde mit einer Gelelektrophorese überprüft. Auf Abbildung 9 und 10 sind für die ausgewählten Proben jeweils Banden auf Höhe von 1000 bp (16S-Amplikon) und 500 bp (*mcrA*-Amplikon) zu sehen. Ist keine Bande zu erkennen (siehe Probe 42; 16S-Amplikon; Zweite-Stufe-Reaktor), wurde das Gen nicht amplifiziert, und die PCR musste wiederholt werden.

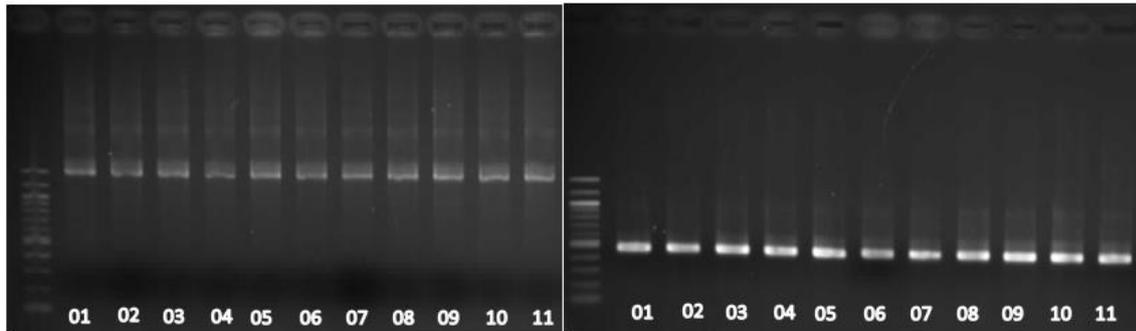


Abbildung 9. Gelbilder der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Proben 01-11 aus dem Erste-Stufe-Reaktor; links: 16S-Amplikon, rechts: *mcrA*-Amplikon). Lane 1 jeweils 100 bp Standard

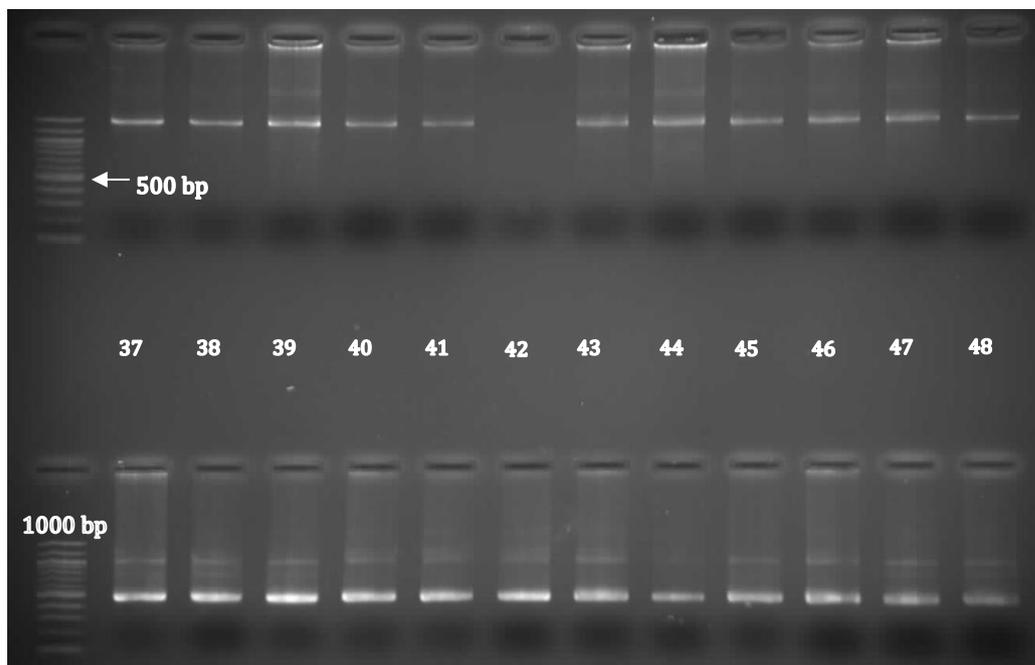


Abbildung 10. Gelbilder der nicht-aufgereinigten PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Proben 37-47 aus dem Zweite-Stufe-Reaktor; oben: 16S-Amplikon, unten: *mcrA*-Amplikon). Lane 1 jeweils 100 bp Standard

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte ebenfalls mit dem NanoDrop1000. Tabelle 6 zeigt dazu die gemessenen Werte. Wie auch von den Gelbildern (Abbildung 9 und 10) durch die stärkeren Banden zu vermuten war, war die

Konzentration der *mcrA*-Amplikons höher als die der 16S-Amplikons. Für die Restriktion wurden anschließend 40 ng (*mcrA*) bzw. 80 ng (16S) DNA verwendet.

Tabelle 6. Quantifizierung der PCR-Produkte aus beiden Reaktorstufen

Proben- bezeichnung	Konzentration [ng/μL]	Proben- bezeichnung	Konzentration [ng/μl]
Erste-Stufe-Reaktor			
16S_01	80,48	<i>mcrA</i> _01	297,31
16S_02	113,52	<i>mcrA</i> _02	231,49
16S_03	76,31	<i>mcrA</i> _03	121,97
16S_04	52,42	<i>mcrA</i> _04	30,80
16S_05	37,72	<i>mcrA</i> _05	109,74
16S_06	44,84	<i>mcrA</i> _06	126,56
16S_07	80,69	<i>mcrA</i> _07	251,51
16S_08	173,50	<i>mcrA</i> _08	296,81
16S_09	58,94	<i>mcrA</i> _09	99,34
16S_10	40,61	<i>mcrA</i> _10	129,69
16S_11	24,59	<i>mcrA</i> _11	88,94
Zweite-Stufe-Reaktor			
16S_37	31,10	<i>mcrA</i> _37	218,72
16S_38	26,23	<i>mcrA</i> _38	150,08
16S_39	20,01	<i>mcrA</i> _39	172,61
16S_40	19,80	<i>mcrA</i> _40	133,21
16S_41	58,68	<i>mcrA</i> _41	138,38
16S_42	33,75	<i>mcrA</i> _42	130,11
16S_43	24,22	<i>mcrA</i> _43	141,19
16S_44	49,19	<i>mcrA</i> _44	136,42
16S_45	159,49	<i>mcrA</i> _45	168,45
16S_46	129,68	<i>mcrA</i> _46	157,35
16S_47	152,12	<i>mcrA</i> _47	99,72

5.3 Methanausbeute und Essigsäurekonzentration

In Tabelle 7 sind die Durchschnittswerte der Methanproduktion in L/d und Essigsäurekonzentration in mg/l in den verschiedenen Prozessphasen aufgelistet. In der ersten Stufe zeigten alle Phasen mit einer SRT von 8 d (Phasen 3-5) eine deutlich höhere Methanproduktion (bis zu dreifache der ersten Phase). Die Essigsäurekonzentration war in der ersten Stufe in Prozessphase 1 am höchsten bei $2990 \pm 1748 \text{ mg/L}$ und wurde stetig geringer bis $721 \pm 425 \text{ mg/L}$ in Prozessphase 5. Dabei schwankt die Essigsäurekonzentration immens (siehe Standardabweichung). In der zweiten Stufe wurde eine wesentlich geringere Konzentration an Essigsäure gemessen. Sie war ebenfalls in der ersten Prozessphase mit $189,9 \pm 116,45 \text{ mg/L}$ am höchsten und wurde

ab Prozessphase 2 mit $18,5 \pm 8,78 \text{ mg/L}$ deutlich geringer. Außerdem wurden die Schwankungen der Essigsäurekonzentration in der zweiten Stufe ab Prozessphase 2 weniger (siehe Standardabweichung).

Tabelle 7. Durchschnittliche Methanproduktion und Essigsäurekonzentration in erster und zweiter Stufe innerhalb der fünf Prozessphasen. Die Mittelwerte wurden aus mindestens drei und höchstens sechzehn Werte (vom Ende jeder Phase) berechnet.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
Methanproduktion [L/d] 1. Stufe	$1,93 \pm 1,18$	$4,08 \pm 1,37$	$5,80 \pm 1,75$	$5,30 \pm 1,15$	$5,89 \pm 1,39$
Methanproduktion [L/d] 2. Stufe	$1,33 \pm 0,69$	$0,79 \pm 0,5$	$1,41 \pm 0,14$	$0,9 \pm 0,08$	$0,97 \pm 0,16$
Methanproduktion [L/d] gesamt	3,26	4,87	7,21	6,20	6,86
Essigsäurekonz. 1. Stufe [mg/L]	2990 ± 1748	1550	$\pm 1350 \pm 511$	893 ± 108	721 ± 425
Essigsäurekonz. 2. Stufe [mg/L]	189,9	$\pm 18,5 \pm 8,78$	$30,6 \pm 3,00$	$19,0 \pm 1,89$	$23,4 \pm 1,31$
	116,45				

5.4 Erste-Stufe-Reaktor

5.4.1 Struktur und Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft

Dynamik und Struktur der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels T-RFLP-Analyse der 16S-rRNA-Gene unter Verwendung der Restriktionsenzyme *RsaI* und *MspI* untersucht. In Abbildung 11 sind die mit dem Enzym *RsaI* erzeugten T-RF-Profile für 48 Probenahmezeitpunkte dargestellt. Im Anhang sind die entsprechenden Ergebnisse für die *MspI*-Profile zu finden.

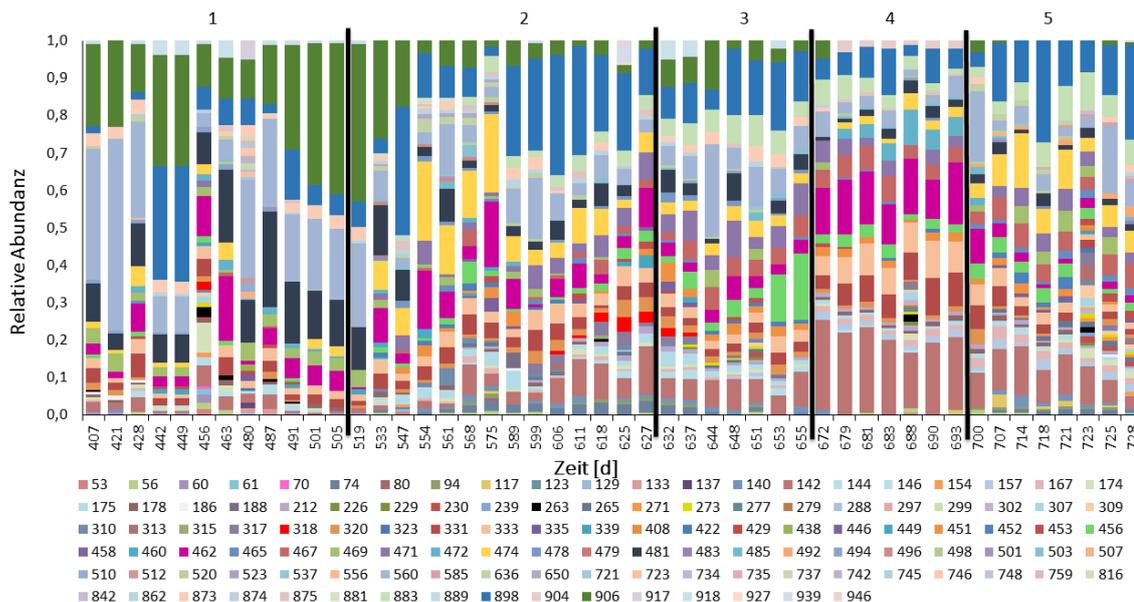


Abbildung 11. T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *RsaI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

Die Zusammensetzung bakterielle Gemeinschaft war in den fünf Prozessphasen sehr schwankend. In der ersten Phase, in der unbehandeltes Stroh gefüttert wurde bei einer SRT von 18 d, waren die T-RF 906 (dunkelgrün), 560 (blaugrau), 481 (schwarz) abundant. In der zweiten Prozessphase (alkalisch vorbehandeltes Stroh) war T-RF 898 (dunkelblau) abundant. Die Gemeinschaft schien allgemein diverser als in der ersten Phase zu sein. T-RF 906 (dunkelgrün) war weniger abundant, ebenso nahm die Abundanz von T-RF 560 (graublau) ab. Die Abundanzen der T-RF 142 (ziegelrot), 462 (magenta), 474 (orange) nahmen dagegen zu. In der dritten Prozessphase, in der die SRT verkürzt wurde, zeigte die bakterielle Gemeinschaft weniger Schwankungen. Insgesamt war hier die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft sehr ähnlich zu der der zweiten Phase. In der vierten Prozessphase (unbehandeltes Stroh und SRT von 8 d) waren die T-RF 462 (magenta) und 142 (ziegelrot) abundant. Die Abundanz von T-RF 906 (grün) nahm jedoch nicht, wie in Phase 1, wieder zu. In Prozessphase 5, in der Bioaugmentation etabliert worden war, nahmen T-RF 142 (ziegelrot) und besonders 462 (magenta) wieder ab, wobei 898 (dunkelblau) zunahm. Aus der eingesetzten 37°C Kultur wurde ab Beginn der Prozessphase T-RF 116 (Abbildung 22 weiß) detektiert. Das abundante T-RF 85 der 37°C Kultur wurde in der Gemeinschaft schon in allen Prozessphasen festgestellt (Abbildung 22 olivgrün). Die deutlichsten Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft waren zwischen Prozessphase 1 und allen anderen Phasen zu erkennen.

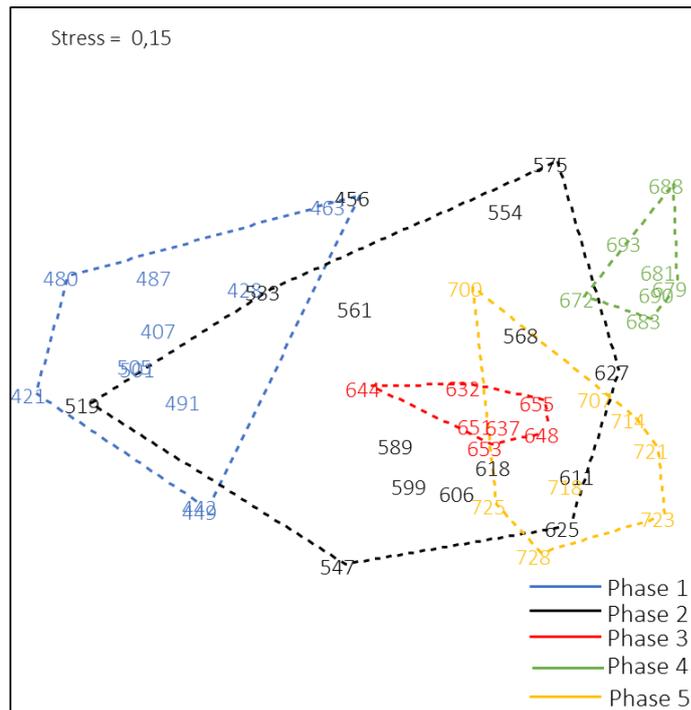


Abbildung 12. NMDS-Plot der mit *RsaI* erzeugten T-RFLP-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Erste-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte an den entsprechenden Probenahmetagen.

Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Prozessphasen 2, 3 ähnelt sich stark. Diese Ähnlichkeit war im NMDS Plot (Abbildung 12), in dem die unterschiedlichen Maßnahmen im Erste-Stufe-Reaktor markiert sind, zu erkennen. In Prozessphase 1 und 2 schwankten die bakteriellen Gemeinschaften in ihrer Zusammensetzung. Sie bildeten große Cluster, die die Unähnlichkeiten zwischen den T-RFLP-Profilen verdeutlichen. Die Zusammensetzung der Gemeinschaften in den Prozessphasen 3 und 4 waren dagegen wesentlich stabiler (kleinere Cluster).

5.4.2 Struktur und Dynamik der methanogenen Gemeinschaft

Die methanogene Gemeinschaft wurde mittels T-RFLP-Analyse untersucht. Diese wurde auf Grundlage des *mcrA*-Gens und der Restriktionsenzyme *Bst*NI und *Mwo*I durchgeführt. In Abbildung 13 sind die mit dem Enzym *Bst*NI erzeugten T-RF-Profile für 64 Probenahmezeitpunkte dargestellt. Für das Restriktionsenzym *Bst*NI konnten die Fragmentlängen der Methanogene eindeutiger und häufiger als mit *Mwo*I zugeordnet werden, weshalb die Ergebnisse hier dargestellt werden. Im Anhang befinden sich die Ergebnisse, die mit *Mwo*I erzielt wurden.

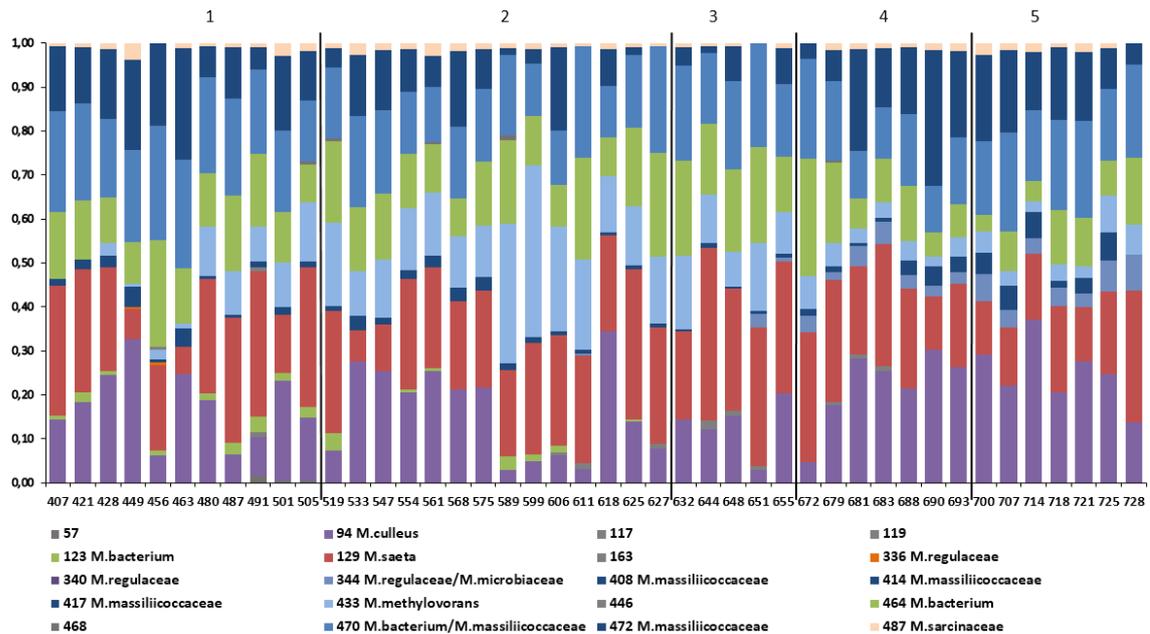


Abbildung 13. T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 64 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *Bst*NI. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

In der ersten Prozessphase, in der unbehandeltes Stroh bei einer SRT von 18 d gefüttert wurde, waren *Methanoculleus* mit bis zu 30 % (T-RF 94; lila), *Methanosaeta* mit bis zu 35 % (T-RF 129; rot), *Methanobacterium* mit bis zu 20 % (T-RFs 123 und 464; grün), *Methanomassiliococcaceae* mit bis zu 25 % (T-RFs 408, 414, 417 und 472; dunkelblau) und T-RF 470 mit bis zu 25 % (*Methanobacterium* oder *Methanomassiliococcaceae*; mittelblau) abundant. Beim Wechsel auf vorbehandeltes Stroh, nahm die Abundanz von *Methanomethylovorans* (T-RF 433, hellblau) auf bis zu 35 % zu, wobei alle anderen genannten, besonders *Methanomassiliococcaceae*, anteilig abnahmen. In der dritten Phase, in der die SRT 8 d verkürzt wurde, war *Methanomassiliococcaceae* nur noch bis 5 % und *Methanoculleus* noch bis 20 % abundant. Die Abundanz von *Methanosaeta* stieg leicht. In der vierten Phase, in der wieder unbehandeltes Stroh bei einer SRT von 8 d gefüttert wurde, gab es einen leichten Anstieg der Abundanz von *Methanoculleus* und *Methanomassiliococcaceae*, wobei *Methanobacterium* anteilig abnahm und *Methanomethylovorans* nur noch bei circa 5 % lag. Keine eindeutige Zuordnung konnte für die Fragmentlängen 344 (*Methanospirillum*/*Methanocorpusculum*/*Methanomicrobiaceae*/*Methanoregulaceae*) und 470 (*Methanobacterium*/*Methanomassiliococcaceae*) getroffen werden. Außerdem konnten die Fragmentlängen 57, 117, 119, 168, 446 und 468 nicht zugeordnet werden. Die Zusammensetzung der

methanogenen Gemeinschaft in der letzten Prozessphase zeigt große Ähnlichkeit mit der in der vierten Phase. Der NMDS-Plot (Abbildung 14) verdeutlicht die Ähnlichkeit der methanogenen Gemeinschaften in den unterschiedlichen Phasen.

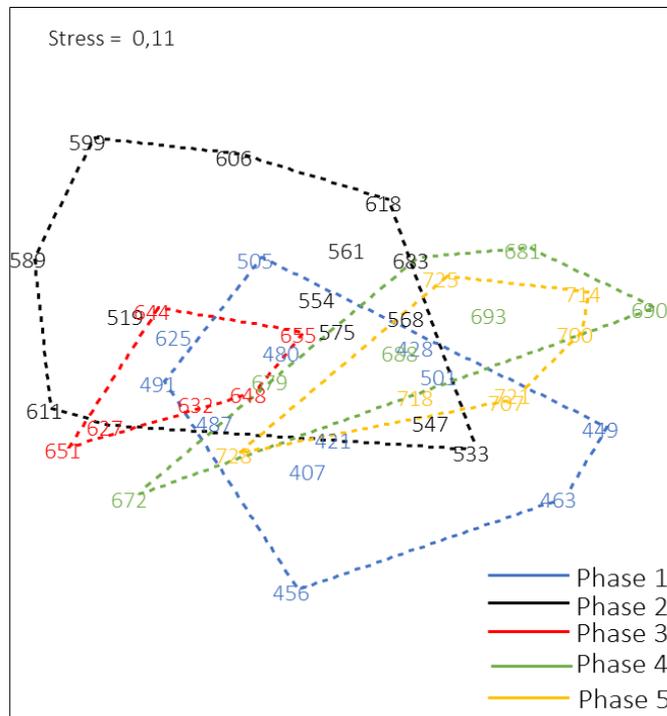


Abbildung 14. NMDS-Plot der mit *Bst*MI erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaft des Erste-Stufe-Reaktors unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte an den entsprechenden Probenahmetagen.

5.5 Zweite-Stufe-Reaktor

5.5.1 Struktur und Dynamik der bakteriellen Gemeinschaft

Die Dynamik und Struktur der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels T-RFLP-Analyse der 16S-rRNA-Gene unter Verwendung von den Restriktionsenzymen *Msp*I und *Rsa*I untersucht. In Abbildung 15 sind die mit dem Enzym *Rsa*I erzeugten T-RF-Profile für 48 Probenahmezeitpunkte dargestellt. Im Anhang sind die Ergebnisse zu *Msp*I zu sehen.

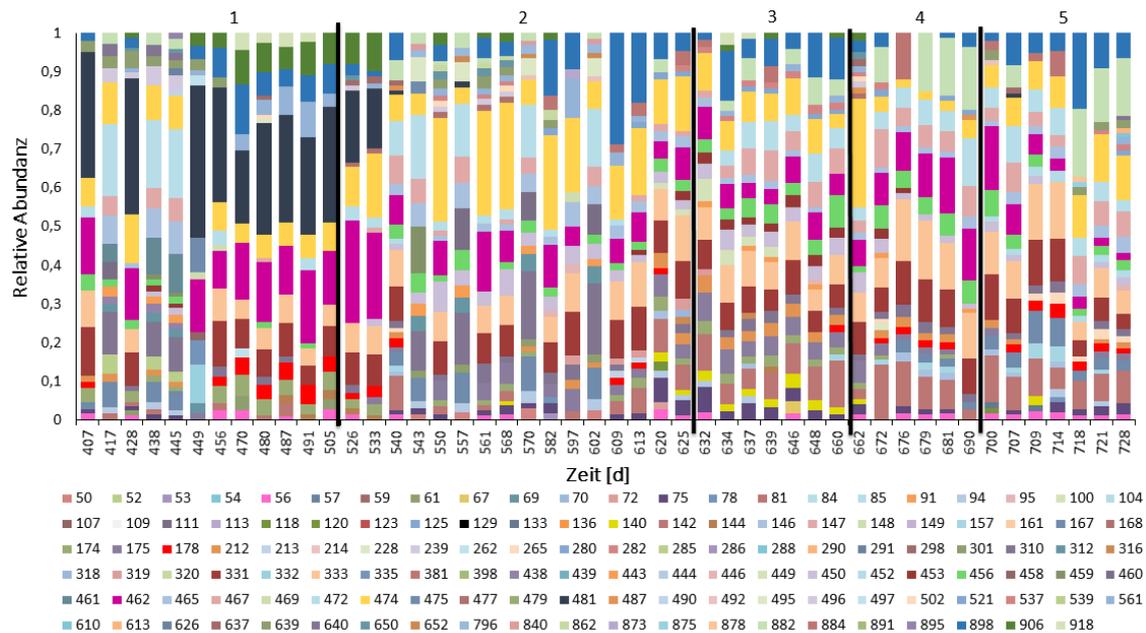


Abbildung 15. T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *RsaI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

Deutliche Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft sind zwischen Phase 1 und Phase 2 zu erkennen. Die alkalische Substratvorbehandlung im Erste-Stufe-Reaktor beeinflusste demnach die bakterielle Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor. Das Bakterium mit einer T-RF-Länge von 481 bp (schwarz) dominierte die bakterielle Gemeinschaft in der 1. Phase (relative Abundanz 30 %). T-RF 462 (magenta) kommt besonders in den Prozessphasen 1 (bis zu 15%) und 4 vor. Die T-RFs 333 (ocker), 331 (dunkelrot) und 474 (gelb) sind in allen Prozessphasen abundant. In der 2. Phase sank dessen Abundanz, wobei die relative Abundanz von T-RF 474 (gelb) auf bis zu 25 % anstieg. Die Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaft in den Phasen 2, 3, 4 und 5 ähnelten sich. Sie werden dominiert von den T-RFs 333 (hautfarben), 882 (hellgrün), 142 (ziegelrot), 331 (dunkelrot), 898 (dunkelblau) und 462 (magenta). Diese Ähnlichkeit ist auch im NMDS Plot (Abbildung 16), in dem die unterschiedlichen Maßnahmen im Erste-Stufe-Reaktor markiert sind, zu erkennen. Innerhalb der Phasen 1 und 2 schwankten die bakteriellen Gemeinschaften in ihrer Zusammensetzung. Sie bildeten große Cluster, die die Unähnlichkeiten zwischen den T-RFLP-Profilen verdeutlicht. Die Zusammensetzungen der Gemeinschaften in den Prozessphasen 3, 4 und 5 waren dagegen wesentlich stabiler, jedoch nicht anders als in den Phasen 1 und 2. In der Prozessphase der Bioaugmentation wurden keine der Bakterien aus der

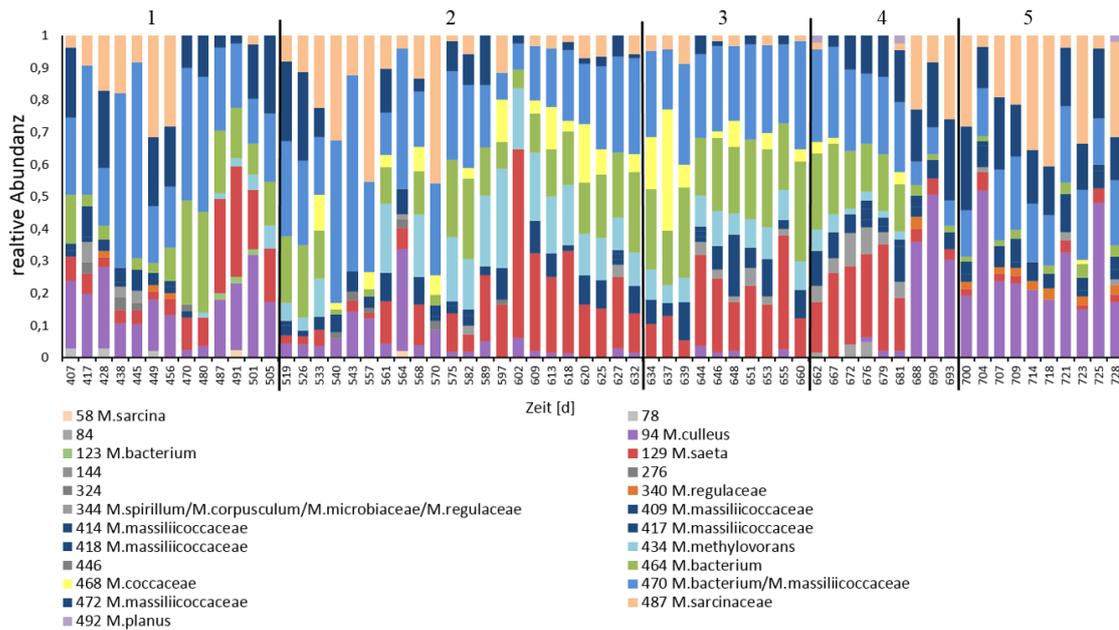


Abbildung 17. T-RF-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 64 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *Bst*NI. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

Die methanogene Gemeinschaft veränderte sich im Prozessverlauf in ihrer Zusammensetzung. Es traten besonders hydrogenotrophe (z.B. *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanomassiliococcaceae*) aber auch acetoklastische Methanogene (*Methanosaeta*) auf. Besonders auffällig waren die Änderungen der Abundanz von *Methanoculleus*, *Methanosarcinaceae* und *Methanosaeta* durch die alkalische Substratvorbehandlung. In der ersten Phase (Tag 400 – 511) wurde unbehandeltes Stroh bei einer SRT von 18 d im Erste-Stufe-Reaktor gefüttert. *Methanoculleus* (T-RF 94), *Methanobacterium* (T-RFs 123, 464) und *Methanomassiliococcaceae* (T-RFs 409, 414, 417, 418, 472) zeigten während dieser Phase die größte Abundanz. Innerhalb der ersten Phase gab es aber auch Schwankungen bezüglich der abundanten Organismen. Während der ersten 50 Tage war *Methanosarcinaceae* (T-RF 487) mit ungefähr 20 % abundant. In den folgenden 60 Tagen jedoch nahm dessen Anteil stark ab. Dafür stieg der Anteil an *Methanobacterium* und *Methanosarcinaceae*. In der zweiten Prozessphase (alkalisch vorbehandeltes Stroh) waren *Methanosaeta* (T-RF 129), *Methanomethylovorans* (T-RF 343), *Methanobacterium*, *Methanococcaceae* (T-RF 468) und *Methanomassiliococcaceae* abundant. Nach dem Wechsel auf vorbehandeltes Stroh dauerte es ungefähr 90 Tage bis die relative Abundanz von *Methanoculleus* auf 1 % gesunken ist. Die gleiche Dynamik war auch für *Methanosarcinaceae* zu verzeichnen,

die aber zwischenzeitlich eine relative Abundanz von 40 % aufwiesen. Besonders auffällig war der Einfluss der alkalischen Substratvorbehandlung auf die Präsenz von *Methanosaeta* und *Methanosarcinaceae*. In der dritten Prozessphase, in der die SRT auf 9 d reduziert wurde, waren wie in Phase 2 *Methanosaeta*, *Methanomethylovorans*, *Methanobacterium*, *Methanococcaceae* und *Methanomassiliococcaceae* abundant. Die Verkürzung der SRT führte zu keiner Änderung der methanogenen Zusammensetzung im Zweite-Stufe-Reaktor. Als zur vierten Prozessphase auf unbehandeltes Substrat gewechselt wurde, dauerte es ungefähr 30 Tage bis sich die mikrobielle Gemeinschaft stark veränderte. Der Anteil an *Methanobacterium*, *Methanomethylovorans* und *Methanosaeta* ist stark zurückgegangen. Dafür stieg der Anteil an *Methanoculleus* und *Methanosarcinaceae* wie es auch in Phase 1 (auch unbehandeltes Stroh) zu verzeichnen war. In der letzten Phase sind durch den Einsatz von Bioaugmentation und alkalisch vorbehandeltem Stroh keine Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft zu erkennen. Sie ähnelt also vor allem der 1. und der 4. Phase, obwohl dort unbehandeltes Stroh gefüttert wurde. Keine eindeutige Zuordnung konnte für die Fragmentlängen 344 (*Methanospirillum/Methanocorpusculum/Methanomicrobiaceae/Methanoregulaceae*), 470 (*Methanobacterium/Methanomassiliococcaceae*) und 468 (*Methanococcaceae/Methanobacteriaceae*) getroffen werden. Außerdem konnten die Fragmentlängen 78, 84, 144, 276, 324 und 446 nicht zugeordnet werden.

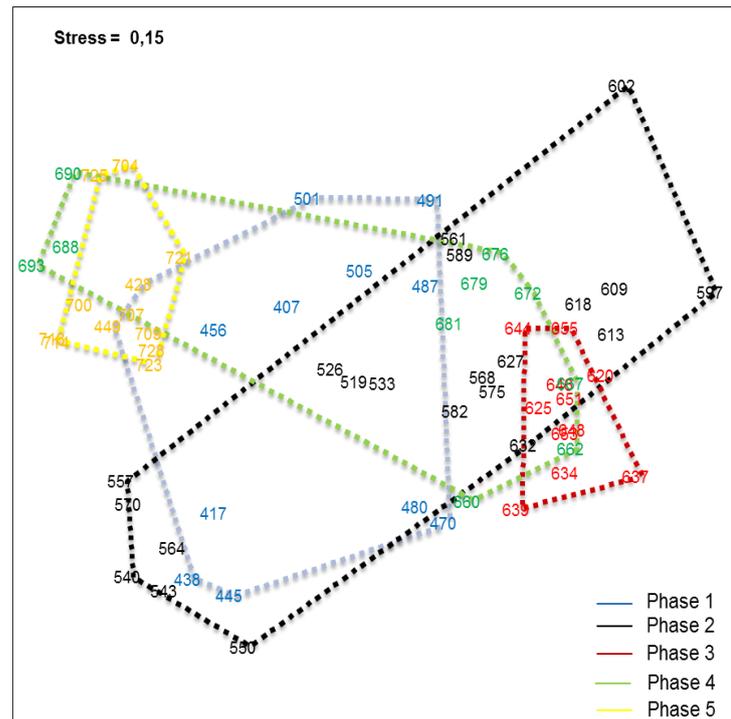


Abbildung 18. NMDS-Plot der mit *Bst*NI erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.

Für die T-RFLP-Profile, basierend auf der Restriktion mit *Bst*NI, wurden drei NMDS-Plots angefertigt. In Abbildung 18 wurde jede eingesetzte Maßnahme (Phase) als Cluster dargestellt. Dementsprechend sind fünf farbige Cluster zu sehen. Zu erkennen sind Überlagerungen zwischen allen Phasen außer Phasen 1 und 3 sowie 3 und 5. Das erscheint logisch, da die sich die Mikroorganismen im Reaktor an eine Prozessveränderung anpassen müssen und somit Ähnlichkeiten der mikrobiellen Gemeinschaften in den Übergängen vorherrschen. In den Phasen 3 und 5 wurde jedoch in beiden mit vorbehandeltem Stroh gefüttert und sollten demnach Ähnlichkeiten aufweisen. Interessant ist die deutlich sichtbare Unähnlichkeit der methanogenen Gemeinschaften der Phasen 1 und 3, was zeigt, dass die alkalische Substratvorbehandlung die methanogene Gemeinschaft beeinflusst.

5.6 Gesamtsystem

Es wurde außerdem die *Richness*, also die Anzahl der T-RFs in einer Reaktorprobe, bestimmt (Tabelle 7). Die berechneten Mittelwerte ergaben sich aus 48 (erste Stufe) bzw. 68 Werte (zweite Stufe). Im Erste-Stufe-Reaktor beträgt die *Richness* im Durchschnitt für *RsaI* 29 und ist wesentlich höher als die der Methanogenen (*BstNI* 9) und im Zweite-Stufe-Reaktor 21 für Bakterien und für Methanogene 8. Dies deutet darauf hin, dass, wie zu erwarten, die bakterielle Gemeinschaft wesentlich diverser ist als die der Methanogenen. Die *Richness* der Methanogenen bleibt besonders im Erste-Stufe-Reaktor relativ stabil während des Gesamtverlaufes bei einer Standardabweichung von 0,3. Die *Richness* der Bakterien schwankte dagegen deutlich mehr bei einer Standardabweichung von 4,4 bzw. 4,1. In Phase 1 ist die *Richness* in beiden Reaktoren sowohl bei den Bakterien als auch bei den Methanogenen am geringsten.

Tabelle 8. Anzahl der T-RFs (*Richness*) mit Standardabweichung der bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften aus beiden Reaktorstufen im Mittelwert nach Restriktion mit Enzymen *BstNI* und *RsaI*.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5	Insgesamt
Erste-Stufe-Reaktor						
<i>RsaI</i>	22,3	30,4	31,5	27,2	35,5	29,4 ± 4,4
<i>BstNI</i>	9,4	9,4	8,6	9,4	9,4	9,2 ± 0,3
Zweite-Stufe-Reaktor						
<i>RsaI</i>	17,4	21,5	24,2	21,7	23,3	21,1 ± 4,1
<i>BstNI</i>	7,9	8,1	8,1	9,0	8,4	8,3 ± 1,3

5.6.1 Bakterielle Gemeinschaften

Die T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaften aus Erste-Stufe- und Zweite-Stufe-Reaktor sind in Abbildung 19 als NMDS-Plot dargestellt. Deutlich wird, dass die Gemeinschaft in der ersten Stufe stabiler und beide Stufen zum Großteil sehr ähnlich waren. Zwischen beiden bakteriellen Gemeinschaften gibt es strukturelle Gemeinsamkeiten wie zum Beispiel die abundanten Fragmentlängen 142, 333, 481, 462 und 474.

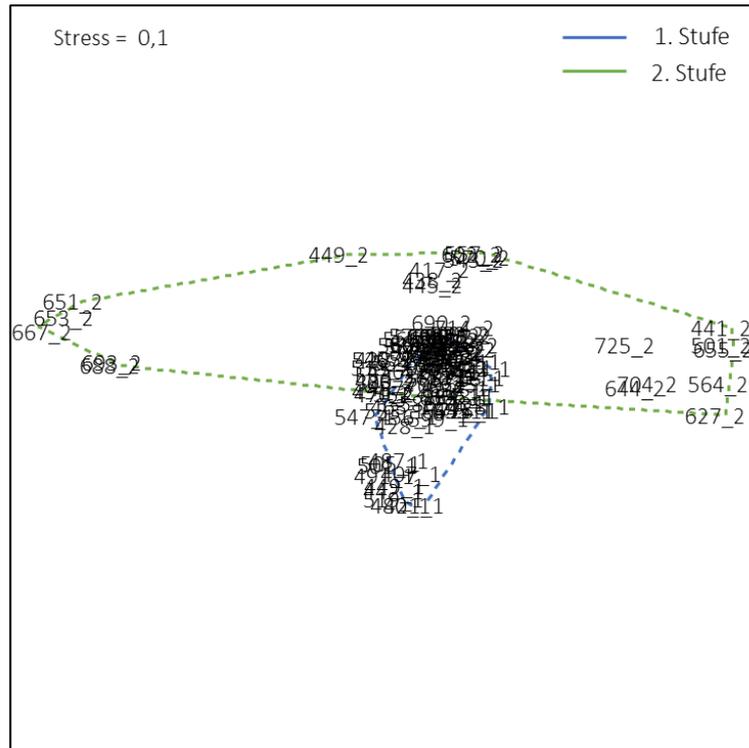


Abbildung 19. NMDS-Plot der mit *RsaI* erzeugten T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaften aus Erste- und Zweite-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen. Die farbigen Cluster markieren den entsprechenden Reaktor.

5.6.2 Methanogene Gemeinschaften

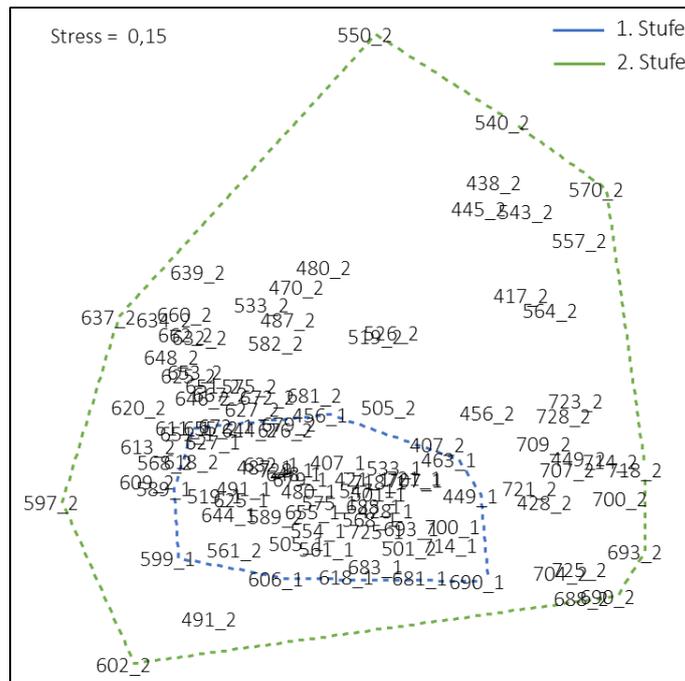


Abbildung 20. NMDS-Plot der mit *BstNI* erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften aus Erste- und Zweite-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-

Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen. Die farbigen Cluster markieren den entsprechenden Reaktor.

Zwischen beiden methanogenen Gemeinschaften gibt es strukturelle Gemeinsamkeiten. In beiden Reaktortypen sind die gleichen Methanogenen wie *Methanoculleus*, *Methanomassiliicoccaceae* und *Methanobacterium* abundant. Eine Besonderheit waren *Methanosarcina* bzw. *Methanosaeta*. Im Erste-Stufen-Reaktor war im gesamten Prozessverlauf *Methanosaeta* und nicht *Methanosarcina* abundant. Vergleichsweise dazu gab es ein Wechsel zwischen den beiden Vertretern im Zweite-Stufe-Reaktor. Abbildung 20 zeigt außerdem, dass die methanogene Gemeinschaft der ersten Stufe wesentlich stabiler war als die der zweiten Stufe (kleineres Cluster).

6 Diskussion

Alle Hauptvertreter der methanogenen Gemeinschaft in der ersten und zweiten Stufe konnten durch die T-RFLP-Analyse des *mcrA*-Gens eindeutig zugeordnet werden, ausgenommen T-RF 470 (*Bst*NI), wobei es sich um *Methanobacterium* oder *Methanomassiliicoccaceae* handelte. Die T-RFLP-Analyse mit *Mwo*I deutete dabei auf *Methanobacterium* hin. Trotz dieser Unsicherheit wird die Nutzung des Restriktionsenzym *Bst*NI für *mcrA*-Gen basierende T-RFLP-Analysen empfohlen, da es sehr genaue Zuordnungen ermöglicht. Alle fünf Prozessphasen zeigten in beiden Stufen, dass hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogene gleichzeitig vorkamen wie auch Lucas et al. (2015) im *full-scale* Bioreaktor zur Vergärung von Mais zeigten. Hydrogenotrophe Methanogene wie *Methanobacterium*, *Methanoculleus* und *Methanomassiliicoccaceae* zeigten summiert in allen Phasen beider Stufen eine relative Abundanz von 50-80%. Der hydrogenotrophe Stoffwechselweg dominierte demzufolge, was auch schon beim Einsatz von Energiepflanzen wie Mais beobachtet wurde (Demirel, 2014; Lucas et al., 2015).

6. 1 Einfluss der alkalischen Substratvorbehandlung auf die mikrobiellen Gemeinschaften in der anaeroben Vergärung von Weizenstroh

Viele Studien verwendeten *NaOH* für die Vergärung von alkalisch vorbehandeltem Substrat. In diesem Versuch wurde $Ca(OH)_2$ vor allem wegen des geringeren Kilopreises verwendet. Außerdem besteht die Möglichkeit das $Ca(OH)_2$ aus dem Prozess wieder zu gewinnen [Kumar et al., 2009].

Die alkalische Vorbehandlung von lignocellulosehaltigen Material zielt darauf ab Bestandteile des Lignins und die Hemicellulose zu entfernen und dadurch die Cellulose besser zugänglich für cellulolytische Enzyme zu machen [Hendriks, 2009 & Taherzadeh 2008]. In dieser Studie wurde deutlich, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften auf Grund der Vorbehandlung sowohl in der ersten als auch in der zweiten Stufe veränderten. Dabei senkte sich auch die Essigsäurekonzentration, was zu einer höheren Abundanz von

Methanomethylovorans in der methanogenen Gemeinschaft führte und eine deutlich höhere Methanproduktion in der ersten Stufe mit sich brachte. Auch Sträuber et al. (2015) konnten in Batchversuchen einen positiven Effekt der alkalischen Substratvorbehandlung auf die Methanproduktion nachweisen. Sowohl in erster als auch in der zweiten Reaktorstufe wichen die bakteriellen Gemeinschaften der ersten Prozessphase (unbehandeltes Stroh und SRT 18 d) von den anderen vier Phasen ab. Besonders auffällig für die erste Prozessphase war die deutlich höhere Essigsäurekonzentration beider Reaktorstufen im Vergleich zum weiteren Prozessverlauf. In der ersten Prozessphase der zweiten Stufe wurden große Instabilitäten der methanogenen Gemeinschaft beobachtet. *Methanosarcina* und *Methanosaeta* verdrängten sich gegenseitig. Der Grund dafür könnte die stark schwankende Essigsäurekonzentration sein, da *Methanosaeta* auf niedrige und *Methanosarcina* auf hohe Essigsäurekonzentrationen spezialisiert ist [Conklin et al., 2006]. Darüber hinaus kann *Methanosarcinaceae* acetoklastisch und hydrogenotroph Methan erzeugen [Rada, 2016]. Der NMDS-Plot des Gesamtsystems zeigt jedoch auch, dass sich die Gemeinschaften beider Stufen anfänglich (erste Phase) unterschieden und sich später aneinander angleichen (Abbildung 19). Die hohe Essigsäurekonzentration während der ersten Prozessphase schien besonders in der ersten Stufe auf die empfindlichen Methanogenen Einfluss zu nehmen und sie zu inhibieren, da die Methanproduktion deutlich geringer ausfiel. In einem einstufigen System zur Vergärung von Mais könnte der Prozess bei solch hohen Essigsäurekonzentrationen zusammenbrechen, wenn den Mikroorganismen keine Zeit zur Anpassung gegeben wird.

6. 2 Einfluss der kürzeren SRT auf die anaerobe Vergärung von Weizenstroh und die mikrobiellen Gemeinschaften

Sowohl die bakteriellen als auch die methanogenen Gemeinschaften der beiden Reaktorstufen zeigten eine höhere Stabilität in Folge der kürzeren SRT. In beiden Reaktorstufen wurde außerdem mehr Methan produziert, als in den Phasen der längeren SRT.

6. 3 Einfluss der Bioaugmentation auf die anaerobe Vergärung von alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh und die mikrobiellen Gemeinschaften

Das Einbringen von alkali-toleranten Mikroorganismen führte zu keinem Einfluss auf die Methanproduktion. Weiß et al. (2010) nutzte angereicherte Mikroorganismen aus dem Gärrest einer Biogasanlage, die mit Xylan (Hauptbestandteil von Hemicellulose) betrieben wurde, und immobilisierte sie auf Zeolith für eine Bioaugmentation. Dabei hat Weiß et al. (2010) höhere Methanproduktion festgestellt. Sie verwendeten, im Gegensatz zu diesem Versuch, keine Mikroorganismen aus einem Umwelthabitat.

Die Bioaugmentation mit der 37°C Kultur führte zu einem leichten Shift der bakteriellen Gemeinschaft in beiden Stufen. In der ersten Stufe wurden dabei T-RFs (82, 85, 116, 122 und 278) detektiert, die auch in der Anreicherungskultur vorkamen. Die Bakterien aus dem Reaktor waren also in der Lage, sich an die alkalischen Bedingungen des vorbehandelten Substrates anzupassen. Lediglich der T-RF 82 (nicht abundant) wurde direkt mit dem Einsatz der Bioaugmentation (Tag 695) in der Gemeinschaft nachgewiesen. Der Effekt einer Zugabe spezialisierter Bakterien in Form der Anreicherungskultur bewirkte also nur eine geringe Änderung in der Zusammensetzung der Gemeinschaften. Der T-RF 82 direkt mit dem Einsatz der Bioaugmentation (Tag 695) aufkam, kamen die anderen T-RFs jedoch schon in vorherigen Prozessphasen vor. Außerdem ist das Überleben im Konkurrenzkampf der eingesetzten alkali-toleranten und der bereits präsenten Mikroorganismen unabdingbar für eine erfolgreiche Bioaugmentation. Es wird demnach vermutet, dass die eingesetzten Mikroben keinen Vorteil gegenüber der bereits präsenten Gemeinschaft hatten.

7 Ausblick

Die T-RFLP Analyse stellte sich wie erwartet als sehr gute Strukturanalyse-Methode für mikrobielle Gemeinschaften dar.

Neben der T-RFLP Analyse von DNA-Proben aus dem Reaktorsystem, mit der die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft erfasst werden kann, können auch RNA-Analysen durchgeführt werden, mit der man die Aktivität der Mikroorganismen bestimmen kann. Vorteil der DNA-Analyse ist besonders der Kosten Faktor, da RNA-Analysen wesentlich teuer sind.

Die Ergebnisse aus den Prozessphasen mit der kurzen SRT (stabilere Gemeinschaften, höhere Methanproduktion) sollten mit einer längeren Laufzeit nochmal bestätigt werden, da es bei Methanproduktion starke Schwankungen gegeben hat. Außerdem zeigten die mikrobiellen Gemeinschaften der Prozessphasen mit langer SRT Veränderungen zum Ende der jeweiligen Phase.

Da sich herausstellte, dass die Bioaugmentation mit einer Anreicherungskultur aus alkali-toleranten Umwelthabitat nicht die beste Variante ist um die Methanproduktion zu verbessern, müssen Alternativen wie Anreicherungskulturen aus Strohgärresten getestet werden.

8 Zusammenfassung

In einem zweistufigen Reaktorsystem wurde Stroh und Schlempe unter verschiedenen Maßnahmen (unbehandeltes Stroh, alkalisch vorbehandeltes Stroh, Verkürzung der SRT, Bioaugmentation) anaerob vergoren. In beiden Stufen wurde dabei Methan gebildet.

Während sich die Struktur der methanogenen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor kaum veränderte, führte die alkalische Strohvorbereitung zu einer Veränderung der Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor. Der obligat acetotrophe Methanbildner *Methanosaeta* wurde dominant und verdrängte den hydrogenotrophen und acetoklastischen *Methanosarcinacaea* und den hydrogenotrophen *Methanoculleus*.

Auch die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in erster und zweiter Stufe änderte sich bei alkalischer Substratvorbereitung. Außerdem wurde durch die Vorbereitung ein Anstieg der Methanproduktion festgestellt.

Die Verkürzung der SRT im Erste-Stufe-Reaktor erhöhte die Stabilität der methanogenen und bakteriellen Gemeinschaft beider Reaktorstufen.

Der Einsatz von Bioaugmentation hatte keine Auswirkung auf die methanogenen Gemeinschaften. In der ersten Stufe konnte die eingesetzte 37°C Kultur teilweise in der bakteriellen Gemeinschaft etabliert werden, besonders deswegen, weil sich die bakterielle Gemeinschaft schon an die alkalischen Bedingungen angepasst haben. Demnach scheint die Bioaugmentation mit einer Anreicherungskultur aus einem Umwelthabitat nicht die beste Variante um die Methanproduktion unter diesen Prozessbedingungen zu verbessern.

9 Summary

In this study, microbial community structures and dynamics of a lab-scale two-stage process for the anaerobic digestion treating wheat straw was analyzed. The first-stage reactor was operated under different operating conditions (feeding untreated or pretreated wheat straw, SRT 18 d or 8 d, application of bioaugmentation).

Methane production was observed in both reactor stages. There was no significant effect of the implementation strategies on the methanogenic community of the first stage reactor. However, the alkaline pretreatment of the wheat straw caused a significant effect on the methanogenic community of the second stage reactor. As a result of pretreating the feeding wheat straw the obligate acetotrophic methanogen *Methanosaeta* was abundant and replaced the hydrogenotrophic and acetoclastic *Methanosarcinaceae* and the hydrogenotrophic *Methanoculleus*. Additionally, there was a shift in the bacterial communities of both reactors due to the alkaline pretreatment. Also the methane production was higher in both reactor stages.

The reduction of the SRT lead in more stable methanogenic and bacterial communities in both reactor stages. In this phase also, the highest methane production was measured.

There was no clear effect noticed on the methanogenic communities due to the bioaugmentation. For the bacterial communities there was found a T-RF in the first stage reactor immediate after the application of bioaugmentation. More T-RFs were found in the bacterial community, but surprisingly, before bioaugmentation was implemented, what means that the bacterial community was able to adapt to the alkaline environment before.

Literaturverzeichnis

Borg I., Groenen P.: *Modern Multidimensional Scaling: theory and applications*. (2005), Auflage 2: pp. 207–212 New York: Springer-Verlag

Bühligen F., Lucas R., Nikolausz M., Kleinstaub S.: *A T-RFLP database for the rapid profiling of methanogenic communities in anaerobic digesters*. (2016), *Anaerobe* Auflage 39: pp. 114-116

Chen H.: *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. (2014), Auflage 1 Springer Netherlands: Dordrecht

Conklin A., Stensel H.D., Ferguson J.: *Growth Kinetics and Competition between Methanosarcina and Methanosaeta in Mesophilic Anaerobic Digestion*. (2006), Auflage 78 (5): pp. 486-496

Clarke K.R., Warwick R.M.: *Change in marine communities: An Approach to statistical Analysis and Interpretation*. (2001), Auflage 2. PRIMER-E Plymouth

Demirel B., Scherer P.: *The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review*. (2008), *Reviews in Environmental Science Biotechnology*, (7): pp. 173–90.

Flickinger M. C.: *Upstream Industrial Biotechnology*. (2013), Auflage 2 Wiley Verlag

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.V. (FNR), Abteilung Öffentlichkeitsarbeit: *Leitfaden Biogas. Von der Gewinnung und Nutzung*. (2013), pp. 106

Hendriks A.T.W.M, Zeeman G.: *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. (2008), *Bioresource Technology* Auflage 100 (1): pp. 10-18

Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P.: *Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*. (2009), *Industrial & Engineering Chemistry Research*, (48): pp. 3713–3729

Lehtomäki A., Huttunen S., Lehtinen T.M., Rintala J.A.: *Anaerobic digestion of grass silage in Batch leach bed processes for methane production*. (2008), *Bioresource Technology* Auflage 99 (8): pp. 3207-3278

Dieckmann C., Edelmann W., Kaltschmitt M., Liebetrau J., Oldenburg S., Ritzkowski M., Scholwin F., Sträuber S., Weinrich S.: *Energie aus Biomasse, Grundlagen*. (2016), pp. 1610-1620 Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Liesack W., Dumfield P. F.: *T-RFLP Analysis a Rapid Fingerprinting Method for Studying Diversity, Structure and Dynamics of Microbial Communities*. (2004), *Environmental Microbiology Methods in Biotechnology* Auflage 16 pp. 23-37

Lucas R., Kuchenbuch A., Fetzer I., Harms H.: *Kleinstеuber S.: Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops*. (2015), *FEMS Microbiology Ecology* Auflage 91

Osborn A.M., Moore E.R., Timmis K.N.: *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. (2000), *Environmental Microbiology* Auflage 21 pp. 39-50

Popp D., Schrader S., Kleinstеuber S., Harms H., Sträuber H.: *Biogas production from coumarin-rich plants—inhibition by coumarin and recovery by adaptation of the bacterial community*. (2015), *FEMS Microbiology Ecology* Auflage 91 (9)

Porsch K., Wirth B., Tóth E.M., Schattenberg F., Nikolausz M.: *Characterization of wheat strawdegrading anaerobic alkali-tolerant mixed cultures from soda lake sediments by molecular and cultivation techniques*. (2015), *Microbial biotechnology* Auflage 8 (1):801-814

Rada E.C.: *Biological Treatment of Solid Waste. Enhancing Sustainability.* (2016), Apple Academic Press pp. 40

Rosenwinkel K., Kroiss H., Dichtl N., Seyfried C.H., Weiland P.: *Anaerobtechnik: Abwasser-, Schlamm- und Reststoffbehandlung, Biogasgewinnung.* (2015), Auflage 3 Springer Verlag

Sanderson K.: *Lignocellulose: A chewy problem.* (2011), Nature Auflage 474 pp. 12-14

Souidi K.: *Mikrobielle Diversität in Biogasreaktoren.* (2008): Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin

Sträuber H., Lucas R., Kleinsteuber S.: *Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-phase process.* (2015), Applied Microbiology and Biotechnology Auflage 100 (1):479-491

Taherzadeh M.J., Karimi K.: *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review.* (2008), International Journal of Molecular Science, (9): pp. 1621–1651

Vidali M.: *Bioremediation an overview.* (2001), Pure Appli.Chem. 73 (7):1163-1172

Weiß S., Tauber M., Somitsch W., Meincke R., Müller H., Berg G., Guebitz G.M.: *Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite.* (2010), Water Research, Auflage 44, (6): pp. 1970–1980.

Wunsch C.: *Einfluss der alkalischen Vorbehandlung von lignozellulosereichem Substrat auf dessen Vergärung im ein- und zweistufigen Biogasprozess.* (2014), Diplomarbeit, Technische Universität Bergakademie Freiberg

Zaldivar J., Nielson J., Olsson L.: *Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration*. (2001). MINI-Review, Applied Microbial Biotechnology Auflage 56 pp. 17-34

URL 1: Rak M. J., Friščić T., Moores A.: *Mechanochemical synthesis of Au, Pd, Ru and Re nanoparticles with lignin as a bio-based reducing agent and stabilizing matrix*. (12.12.2015). URL: https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/gd17/03.gif

URL 2: Unbekannt. (12.12.2015). URL: http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2014/FD/c4fd00053f/c4fd00053f-s2_hi-res.gif

URL 3: Meine N., Hilgert J., Kaldstrom M., Rinaldi R., Schüth F.: *Katalytisches Vermahlen: Ein neuer Zugang für Lignocellulose-Bioraffinerien*. (20.12.2015). URL: https://www.mpg.de/6698004/JB_20132?c=7291695&force_lang=de

URL 4: Unbekannt: *Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems*. (07.01.2015). URL: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042272.pdf

URL 5: top agrar: *Biogasanlagen werden effizienter*. (07.07.16). URL: <http://www.topagrar.com/archiv/Biogasanlagen-werden-effizienter-555502.html>

Anhang

Tabelle 9. Probenübersicht erste Stufe

Phase 1			Phase 3		
Datum	Tag	Probenname	Datum	Tag	Probenname
16.10.2012	407	1	29.05.2013	632	27
30.10.2012	421	2	03.06.2013	637	28
06.11.2012	428	3	10.06.2013	644	29
20.11.2012	442	4	14.06.2013	648	30
27.11.2012	449	5	17.06.2013	651	47
04.12.2012	456	6	19.06.2013	653	48
11.12.2012	463	7	21.06.2013	655	31
28.12.2012	480	8	Phase 4		
04.01.2013	487	9	Datum	Tag	Probenname
08.01.2013	491	10	08.07.2013	672	32
18.01.2013	501	11	15.07.2013	679	33
22.01.2013	505	12	17.07.2013	681	44
Phase 2			19.07.2013	683	45
Datum	Tag	Probenname	24.07.2013	688	34
05.02.2013	519	13	26.07.2013	690	46
19.02.2013	533	14	29.07.2013	693	35
05.03.2013	547	15	Phase 5		
12.03.2013	554	16	Datum	Tag	Probenname
19.03.2013	561	17	05.08.2013	700	36
26.03.2013	568	18	12.08.2013	707	37
02.04.2013	575	19	19.08.2013	714	38
16.04.2013	589	20	23.08.2013	718	39
26.04.2013	599	21	28.08.2013	723	40
03.05.2013	606	22	26.08.2013	721	41
08.05.2013	611	23	30.08.2013	725	42
15.05.2013	618	24	02.09.2013	728	43
22.05.2013	625	25			
24.05.2013	627	26			

Tabelle 10. Probenübersicht zweite Stufe

Phase 1			Phase 3		
Datum	Tag	Probenname	Datum	Tag	Probenname
16.10.2012	407	13	29.05.2013	632	44
26.10.2012	417	14	31.05.2013	634	45
06.11.2012	428	15	03.06.2013	637	46
16.11.2012	438	16	05.06.2013	639	47
23.11.2012	445	1,1	10.06.2013	644	7,1
27.11.2012	449	18	12.06.2013	646	48
04.12.2012	456	19	14.06.2013	648	49

18.12.2012	470	20	17.06.2013	651	50
28.12.2012	480	2,1	19.06.2013	653	51
04.01.2013	487	22	21.06.2013	655	8,1
08.01.2013	491	23	26.06.2013	660	52
18.01.2013	501	3,1	Phase 4		
22.01.2013	505	24	Datum	Tag	Probenname
Phase 2			28.06.2013	662	53
Datum	Tag	Probenname	03.07.2013	667	54
05.02.2013	519	25	08.07.2013	672	55
12.02.2013	526	26	12.07.2013	676	56
19.02.2013	533	27	15.07.2013	679	9,1
26.02.2013	540	28	17.07.2013	681	58
01.03.2013	543	29	24.07.2013	688	59
08.03.2013	550	30	26.07.2013	690	10,1
15.03.2013	557	31	29.07.2013	693	60
19.03.2013	561	32	Phase 5		
22.03.2013	564	4,1	Datum	Tag	Probenname
26.03.2013	568	33	05.08.2013	700	61
28.03.2013	570	34	09.08.2013	704	11,1
02.04.2013	575	35	12.08.2013	707	62
09.04.2013	582	36	14.08.2013	709	63
16.04.2013	589	5,1	19.08.2013	714	64
24.04.2013	597	37	23.08.2013	718	65
29.04.2013	602	38	26.08.2013	721	66
06.05.2013	609	39	28.08.2013	723	67
10.05.2013	613	40	30.08.2013	725	12,1
15.05.2013	618	41	02.09.2013	728	68
17.05.2013	620	42			
22.05.2013	625	43			
24.05.2013	627	6,1			

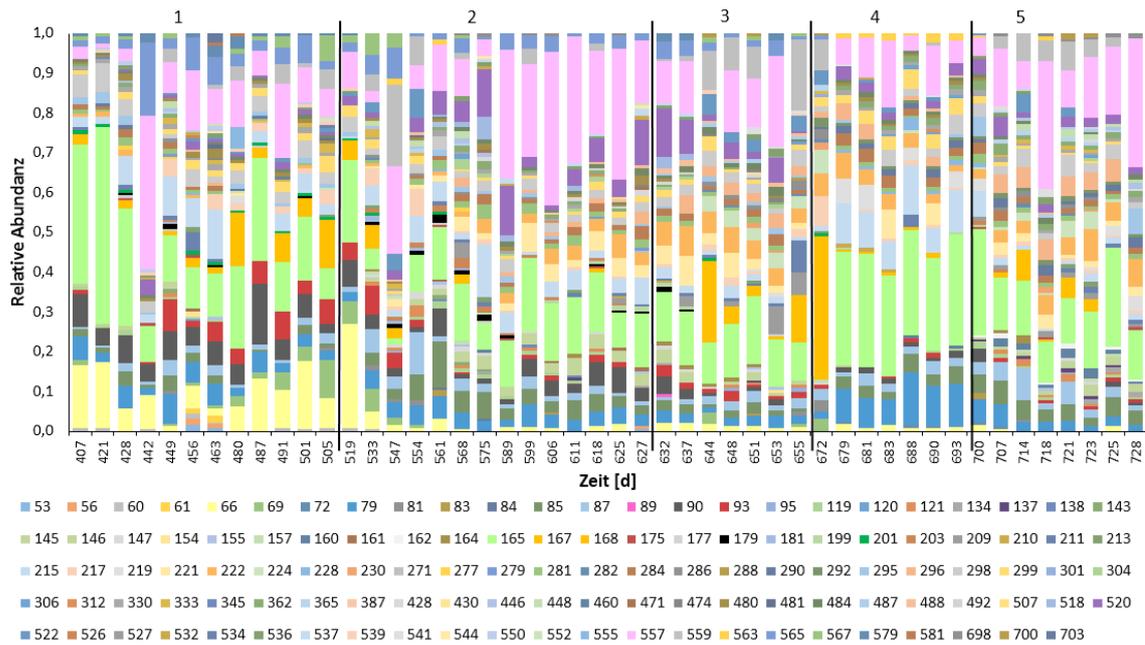


Abbildung 21. T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 48 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *MspI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

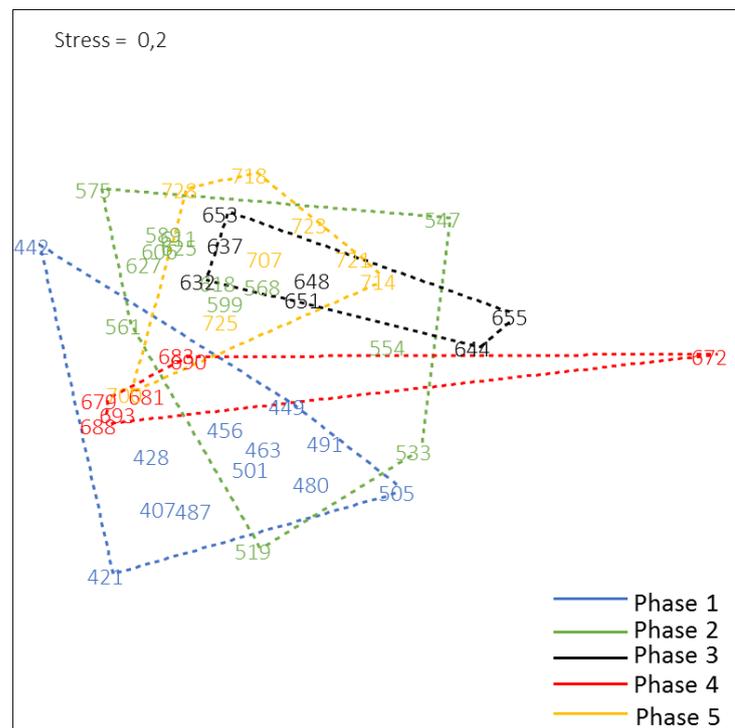


Abbildung 22. NMDS-Plot der mit *MspI* erzeugten T-RF-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Erste-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.

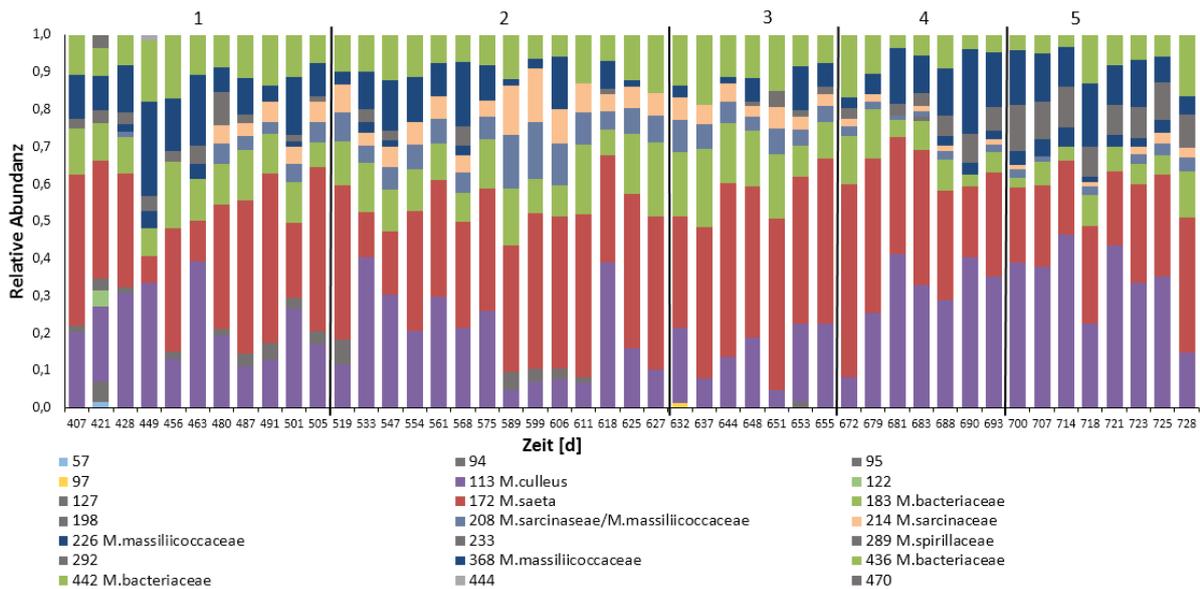


Abbildung 23. T-RF-Profile der methanogenen Gemeinschaft im Erste-Stufe-Reaktor aus 47 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *MwoI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

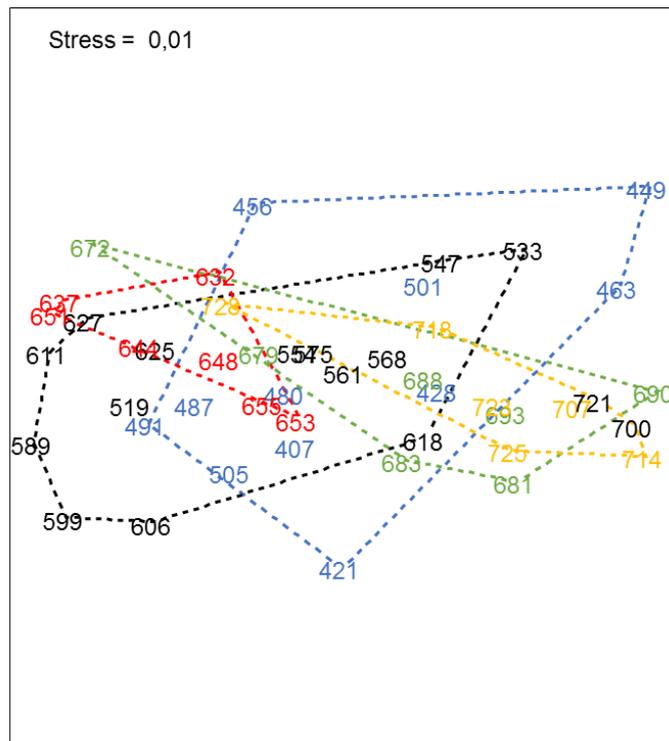


Abbildung 24. NMDS-Plot der mit *MwoI* erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften des Erste-Stufe-Reaktors unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.

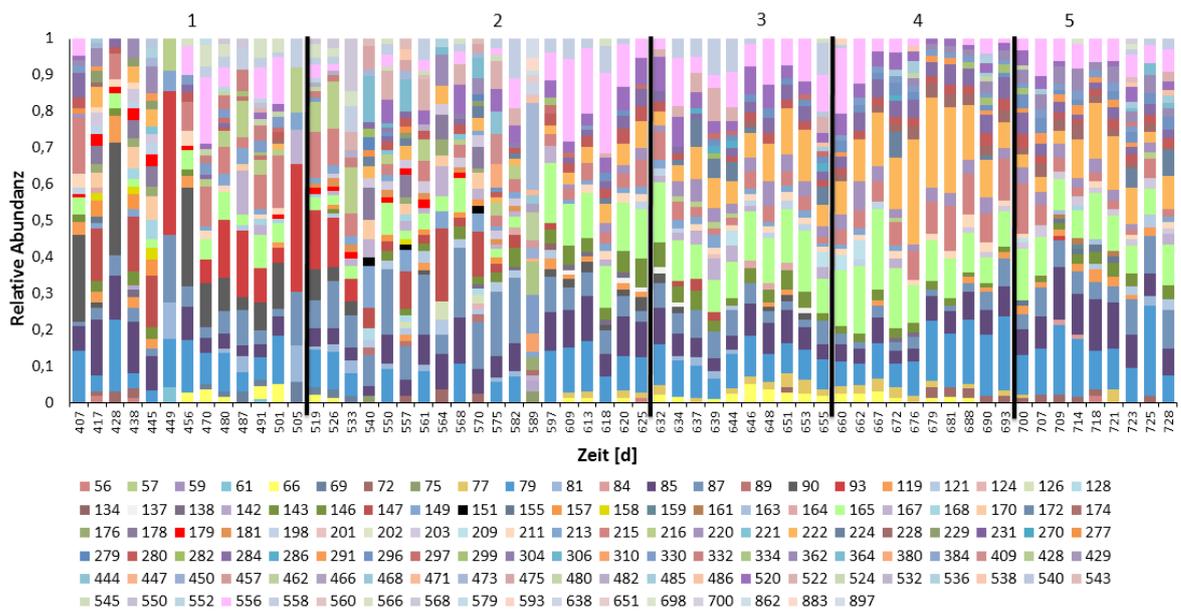


Abbildung 25. T-RF-Profile der bakteriellen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 61 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *MspI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

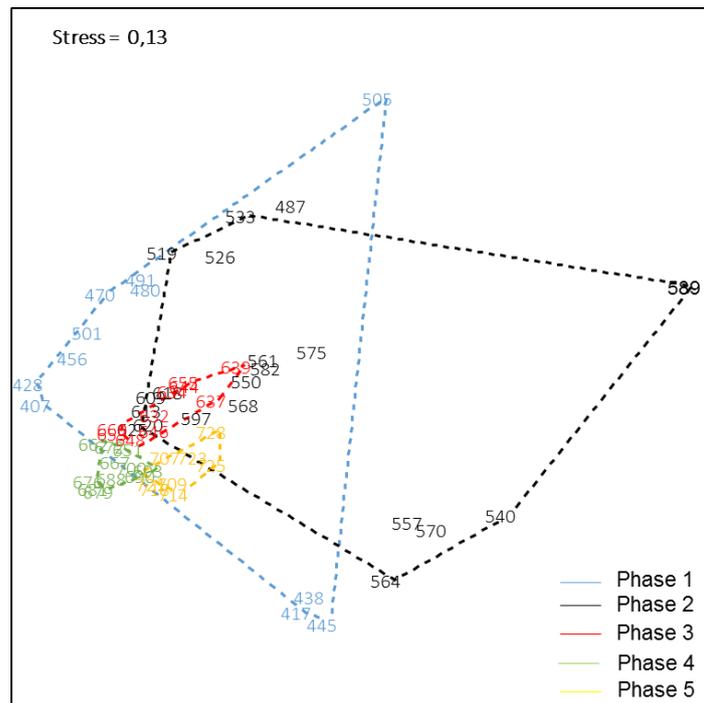


Abbildung 26. NMDS-Plot der mit *MspI* erzeugten T-RF-Profile der bakteriellen 16S-rRNA-Gene aus dem Zweiten-Stufe-Reaktor unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.

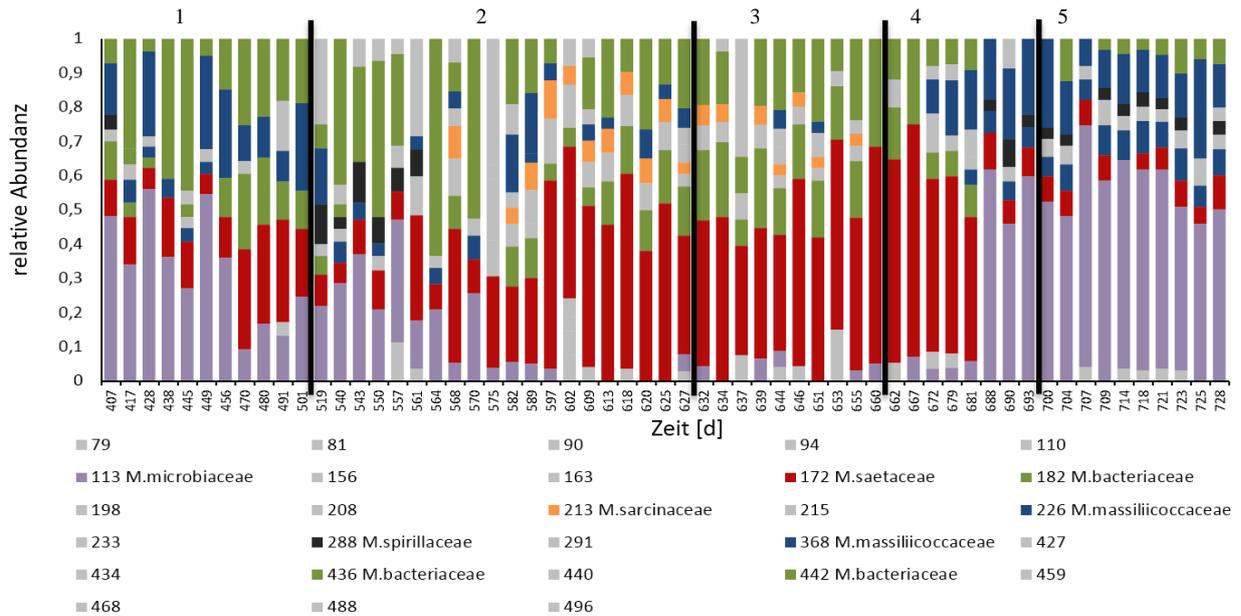


Abbildung 27. T-RF-Profil der methanogenen Gemeinschaft im Zweite-Stufe-Reaktor aus 60 Reaktorproben unter Verwendung des Restriktionsenzym *MwoI*. Die fünf Prozessphasen sind durch die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet und durch schwarze Linien voneinander getrennt.

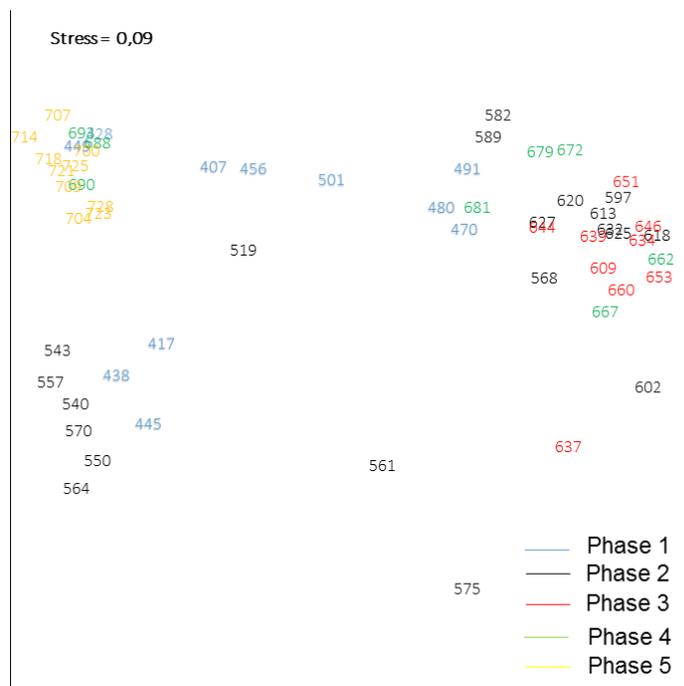


Abbildung 28. NMDS-Plot der mit *MwoI* erzeugten T-RFLP-Profile der methanogenen Gemeinschaften unter Verwendung der Bray-Curtis-Distanzmatrix. Die Zahlen repräsentieren die Position der Datenpunkte mit den entsprechenden Probenahmetagen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 22.August.2016

Malte Stadtmann