



TUM School of Life Science

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Physiologische und genomsequenzbasierte Charakterisierung neuartiger saccharolytischer Organismen in Bezug auf die anaerobe Fermentation von nachwachsenden Rohstoffen

Regina Maria Rettenmaier

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung TUM School of Life Science der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Naturwissenschaften** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Wilfried Schwab

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Prof. Dr. Tillmann Lüders
3. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 24.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die promotionsführende Einrichtung TUM School of Life Science am 30.08.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	6
Abstract	8
Veröffentlichungen.....	10
Einleitung.....	12
1.1 Biogas, eine erneuerbare Energie	12
1.2 Metabolische Prozesse in der Biogasanlage	14
1.2.1 Aufbau und Struktur von Pflanzenbiomasse	14
1.2.2 Stoffwechselwege der anaeroben Fermentation.....	16
1.2.3 Mikrobielle Diversität in Biogasfermentern	17
1.3 Cellulolytische Organismen	19
1.3.1 Bedeutung cellulolytischer Organismen	19
1.3.2 Enzymsysteme anaerober cellulolytischer Bakterien	20
1.3.3 Biotechnologische Einsatzmöglichkeiten	23
1.4 Bakterielle Phylogenien.....	24
1.4.1 Phylogenie, basierend auf 16S rRNA Gensequenz-Homologien	25
1.4.2 Phylogenie, basierend auf Genomsequenzen	27
1.5 Charakterisierung neuer bakterieller Taxa	28
1.6 Zielsetzung der Dissertation	30
Material und Methoden	31
2.1 Verwendete Geräte, Kits, Chemikalien und Puffer	31
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.2 Kits, Enzyme, Plasmide und Längenstandards	32
2.1.3 Chemikalien und Kohlenhydrate	33
2.1.4 Puffer und Färbelösungen	35
2.2 Biogasfermenter	36
2.3 Verwendete Medien.....	37
2.4 Verwendete Mikroorganismen	39
2.5 Anreicherung und Isolierung von cellulolytischen Mikroorganismen aus Biogas Fermentern ..	39
2.5.1 Probennahme aus Biogas Fermentern	39
2.5.2 Anreicherung von cellulolytischen Mikroorganismen aus Biogasfermenterproben	40
2.5.3 Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen in Reinkultur	40

2.6 Mikrobiologische Arbeiten zur Charakterisierung ausgewählter Isolate.....	41
2.6.1 Optische Bestimmungen der Kolonie- und Zellmorphologie	41
2.6.2 Ermittlung des Gram-Verhaltens.....	41
2.6.3 Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen.....	42
2.6.4 Bestimmung der Verwertung von C-Quellen	43
2.6.5 Bestimmung flüchtiger Metabolite via Gaschromatographie.....	45
2.6.6 Bestimmung von zellulären Fettsäuren und der Peptidoglykanstruktur	46
2.7 Proteinbiochemische Arbeiten zur Charakterisierung ausgewählter Isolate.....	47
2.7.1 Fällung und Renaturierung von Überstand-Proteinen	47
2.7.2 SDS-PAGE.....	47
2.7.3 Analyse von sekretierten Proteinen via Massenspektroskopie	48
2.8 Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	48
2.8.1 Primer	48
2.8.2 Extraktion von Nukleinsäuren	50
2.8.3 Reverse Transkription von RNA zu cDNA	52
2.8.4 Amplifikation von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion	53
2.8.5 Agarosegelelektrophorese	54
2.8.6 Quantifizierung von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion	54
2.9 DNA Sequenzierung und Assemblierung.....	55
2.9.1 Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten	55
2.9.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung von PCR-Produkten	56
2.9.3 Hochdurchsatz-Sequenzierung von gDNA aus Reinkulturen	58
2.10 Bioinformatik.....	58
2.10.1 Verwendete Software	58
2.10.2 Verwendete Datenbanken	59
2.10.3 Funktionelle Auswertung bakterieller Genomsequenzen.....	60
2.10.4 Berechnung phylogenetischer Distanzen.....	60
Ergebnisse	62
3.1 Identifizierung, Anreicherung und Isolierung von (cellulolytischen) Leitorganismen aus Biogasfermentern.....	62
3.1.1 Analyse der bakteriellen Diversität zur Bewertung der Kultivierungsmethoden	62
3.1.2 Analyse der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit verschiedener Fermenterzustände	63
3.1.3 Isolierung von (cellulolytischen) Leitorganismen aus Biogasfermentern	72

3.2 Physiologische und genomsequenzbasierte Charakterisierung ausgewählter Isolate und deren Einordnung in den Biogasprozess	75
3.2.1 Mischkultur S4MN4	75
3.2.2 <i>Acetivibrio mesophilus</i> sp. nov., N2K1 ^T	81
3.2.3 MD1, ein neuer Vertreter innerhalb der Familie <i>Lachnospiraceae</i>	87
3.2.4 Zusammenspiel von <i>Defluviitalea raffinosedens</i> 249c-K6 mit <i>A. thermocellus</i> in einer cellulolytischen Mischkultur.....	93
3.2.5 <i>Ruminiclostridium herbifermentans</i> sp. nov., MA18 ^T	96
3.2.6 <i>Clostridium sartagoforme</i> (in Co-Kultur mit <i>Ruminiclostridium josui</i>)	102
3.3 Etablierung von GH48 als molekularer Marker zur Identifizierung cellulolytischer Organismen	106
3.3.1 GH48-Datenbank	106
3.3.2 Taxonomie über GH48 Gene	107
3.4 Quantifizierung und Identifizierung cellulolytischer Bakterien im Biogasprozess über kultivierungs-unabhängige Methoden.....	108
3.4.1 Quantifizierung GH48 und 16S rRNA Gene in DNA.....	108
3.4.2 GH48 Gene in DNA	110
3.4.3 GH48 Gene in RNA.....	113
Diskussion.....	116
4.1 Bakterielle Gemeinschaft in Biogasanlagen	116
4.1.1 Identifizierung bakterieller Taxa über kultivierungsunabhängige Methoden	116
4.1.2 Diversität (cellulolytischer) Bakterien, sowie deren Abundanz und Anpassung an Prozessbedingungen	118
4.1.3 Anreicherung, Identifizierung und Isolierung cellulolytischer Bakterien	123
4.2 Charakterisierung neuartiger Bakterien.....	124
4.2.1 Bedeutung vergleichender Charakterisierungen	124
4.2.2 Bedeutung genomsequenzbasierter Daten	125
4.2.3 Abgrenzung neuartiger Taxa auf Spezies oder Genus-Ebene	127
4.2.4 Reinkulturen, Co-Kulturen oder Mischisolate	129
4.3 Schlussfolgerung.....	130
Ausblick	131
Literaturverzeichnis.....	133
Anhang	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Co-Betreuung Studentischer Arbeiten	VI
Wissenschaftliche Kooperationen.....	VII
Datenspeicherung in öffentlichen Datenbanken	VIII
Hinterlegung neuartiger Isolate in internationalen Stammsammlungen	XI
Nukleinsäuresequenzen	XII
Anhängende Abbildungen und Tabellen	XVII
Danksagung	XXXVIII

Zusammenfassung

Die Erzeugung von Biogas, einem Gemisch aus hauptsächlich Methan und Kohlenstoffdioxid, aus organischer Biomasse erfolgt mikrobiell und ist eine nachhaltige Methode der Gewinnung eines wertvollen, CO₂-neutralen Energieträgers.

In dieser Arbeit wurden die mikrobiellen Gemeinschaften in mesophil und thermophil betriebenen Labor-Biogasfermentern mit dem Fokus auf hydrolytischen Bakterien, welche für den Abbau des Ausgangssubstrates verantwortlich sind, analysiert. 16S rRNA Amplikonsequenzierungen identifizierten im mesophilen Prozess die bakteriellen Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* als besonders abundant. Vertreter dieser Phyla konnten auch erfolgreich in cellulolytischen Anreicherungen kultiviert werden. Im thermophilen Prozess war die Dominanz von *Firmicutes* noch deutlicher. Thermophile cellulolytische Anreicherungen setzten sich zum Teil komplett aus Organismen dieses Phylums zusammen. Dabei resultierte die angewandte Strategie zur Kultivierung anaerober Bakterien mit drei verschiedenen Medien (GS2, GS2.5GR und GR20) und zwei verschiedenen Probenahmeverfahren [Gärrest (GR) und *in sacco* (IS) Anreicherung] in einem besonders hohen Anteil an bis dato nicht bekannten Bakterien. So konnten zum Beispiel in den Anreicherungen GR-GR20-II und IS-GR20-I (mesophil) bzw. GR-GS2.5GR-I und IS-GR20-I (thermophil) >80% der *zero-radius operational taxonomic units* nicht auf Genus-Ebene identifiziert werden. Auch in Folge dessen konnten neuartige hydrolytische Spezies isoliert, phänotypisch charakterisiert und deren Genomsequenz analysiert werden.

Insgesamt wurden sieben Reinkulturen aus dem mesophilen Prozess und fünf aus dem thermophilen Prozess isoliert. Cellulolyse durch Reinkulturen wurde bei insgesamt fünf dieser Isolate festgestellt, darunter die beiden Vertreter neuer mesophiler Bakterienarten N2K1^T und MA18^T. *Acetivibrio mesophilus* sp. nov., N2K1^T kann analog zu den nächst-verwandten thermophilen Organismen *A. thermocellus* und *A. straminisolvens* Cellulosomen bilden, wodurch eine effiziente Hydrolyse insbesondere von kristalliner Cellulose ermöglicht wird. *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., MA18^T ist ein mesophiler bis moderat thermophiler cellulolytischer Organismus und kann ähnlich zu anderen Vertretern innerhalb der Gattung *Ruminiclostridium* ebenfalls Cellulosomen bilden.

Zudem werden drei cellulolytische Mischisolate (S4MN4, 253c-K6 und MA7c) beschrieben. Die stabile Mischkultur S4MN4 aus vier dominierenden Spezies wurde hinsichtlich ihrer Eigenschaft zum Abbau organischer Biomasse charakterisiert. Die Vereinzelung einzelner Organismen aus S4MN4 führte zu einem cellulolytischen Isolat (N2K1^T), einem weiteren saccharolytischen Isolat (MD1) sowie weiteren möglicherweise asaccharolytischen Organismen. In Bezug auf den Celluloseabbau war Stamm N2K1^T der hier neu beschriebenen Art *A. mesophilus* entscheidend. Der saccharolytische Organismus MD1 repräsentiert möglicherweise eine neue Gattung innerhalb der Familie *Lachnospiraceae*. Verwandte

Organismen wie *Mobilitalea sibirica*, *Anaerotania torta* und *Herbinix* spp. sind bekannt für ihre Bedeutung hinsichtlich der Hydrolyse organischer Biomasse.

Das synergistische Zusammenwirken verschiedener Bakterien ist ein Treiber für den effizienten Abbau kristalliner Cellulose in Biogasanlagen. Dies wird in dieser Arbeit durch die Entdeckung der thermophilen Co-Kultur 253c-K6 aus *Defluviitalea raffinosedens* und *A. thermocellus*, sowie S4MN4 bestätigt. Beschrieben werden die positiven Effekte von 253c-K6 auf den maximalen Celluloseabbau und damit einhergehend die erhöhte Produktion flüchtiger Metaboliten. Zusätzlich erweitert die Genomsequenz von *D. raffinosedens* Stamm 249c-K6 die Erkenntnisse zur Bedeutung dieser Spezies im Biogasprozess und ermöglichte die eindeutige Identifizierung metagenomischer Sequenzen aus anderen Studien.

Cellulolytische Bakterien wurden gezielt über die Diversität und Quantität prozessiver Exoglucanase-Gene der Glykosidhydrolase (GH) Familie 48 analysiert, die Leitenzyme für den Abbau kristalliner Cellulose durch Bakterien sind. Cellulolytische Bakterien stellen im gesamten Biogas-Mikrobiom typischerweise nur einen kleinen Teil der Gesamtpopulation dar. Dennoch ist deren gezielte Analyse von größter Bedeutung, da diese für den ersten Schritt, der Hydrolyse von Pflanzenbiomasse, verantwortlichen Organismen auch entscheidend für den Methan-Ertrag des gesamten Prozesses sind. Die Quantifizierung von GH48 Genkopien im Verhältnis zu 16S rRNA Genkopien zeigte, dass mittels der *in sacco* Methode gezielt Organismen mit GH48-Gensequenzen angereichert werden konnten. Zudem deuten die Resultate dieser Arbeit unabhängig von der Prozessstabilität auf eine gleichbleibende Anzahl an GH48 Genkopien hin. Die Gesamtheit der mikrobiellen Population, quantifiziert anhand 16S rRNA Genkopien, schwankte jedoch abhängig von der Probe (GR oder IS) sowie der Fermenterzustände (stabil oder instabil). Zur taxonomischen Klassifizierung von GH48-Gensequenzen wurde zunächst eine Datenbank erstellt, welche bekannte GH48 Gensequenz-Informationen mit 16S rRNA Gensequenz-Informationen kombiniert. GH48 Amplikonsequenzierungen identifizierten eine cellulolytische Gemeinschaft, die abhängig von den analysierten Prozesszuständen und der Betriebstemperatur war. Dabei konnten neben Sequenzen unbekannter Organismen auch bekannte cellulolytische Vertreter wie *Acetivibrio* (früher *Clostridium*) oder *Herbinix* identifiziert werden, diese jedoch vermehrt im thermophilen Fermenterbetrieb. Insgesamt bestätigte sich auch durch die GH48 Amplikonsequenzierungen, dass insbesondere im mesophilen Biogasprozess die cellulolytische bakterielle Gemeinschaft sehr vielfältig und noch weitgehend unbekannt ist. Dies geht Hand in Hand damit einher, dass in dieser Arbeit alle neuartigen Isolate aus dem mesophilen Prozess isoliert wurden.

Abstract

Biogas, a mixture of mainly methane and carbon dioxide, is a sustainable, carbon neutral energy source produced via microbial fermentation of organic biomass.

In this work, the microbial communities of mesophilically and thermophilically operated lab-scale biogas fermenters was analysed focusing on the hydrolytic community responsible for the degradation of the raw substrate. For the mesophilic process, 16S rRNA gene amplicon sequencing identified the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* as particularly abundant phyla. These phyla were also successfully enriched in cellulolytic cultures. In the thermophilic process, the phylum *Firmicutes* dominated even more. Consequently, this was the only phylum detected in some of the thermophilic, cellulolytic cultures. Cultivation was performed using three different media (GS2, GS2.5GR and GR20) and two different sampling procedures [digestate (GR, german: *Gärrest*) or *in sacco* (IS) enrichment]. In general, this resulted in a very high proportion of hitherto unknown bacteria. For example, the relative abundance of *zero-radius operational taxonomic units* that were not identified at genus level in the enrichments GR-GR20-II and IS-GR20-I (mesophilic) or GR-GS2.5GR-I und IS-GR20-I (thermophilic) was >80%. As a result, novel hydrolytic organisms were successfully isolated, followed by characterization of their phenotypes and analysis of their genome sequences.

In total, seven and five clonal pure isolates were retrieved from the mesophilic and the thermophilic biogas processes, respectively. Of these, five cultures hydrolysed crystalline cellulose also including the two novel, mesophilic strains N2K1^T and MA18^T which are representatives of new species. *Acetivibrio mesophilus* sp. nov. strain N2K1^T is capable of cellulosome production, which is the most efficient enzyme system for the hydrolysis of crystalline cellulose, similar to its closest relatives *A. thermocellus* and *A. straminisolvens*. *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov. strain MA18^T is a mesophilic to moderately thermophilic, cellulolytic organism and also can produce cellulosomes, similar to other members of the genus *Ruminiclostridium*.

Further, three cellulolytic mixed cultures (S4MN4, 253c-K6 und MA7c) are described. The stable mixed culture S4MN4 is composed of four dominating species and was characterized regarding the degradation of organic biomass. Separation of single organisms from S4MN4 resulted in a cellulolytic isolate (N2K1^T), another saccharolytic isolate (MD1), and several possibly asaccharolytic isolates. For cellulose hydrolysis, the novel organism N2K1^T was crucial. Further, the saccharolytic isolate MD1 possibly represents a novel genus within the family *Lachnospiraceae*. Related organisms, *Mobilitalea sibirica*, *Anaerotaenia torta* und *Herbinix* spp., are well-known for their contribution to the hydrolysis of organic biomass.

Synergistic effects drive the interplay of organisms within the biogas microbiome. Microbial interaction was detected in S4MN4 and the co-culture 253c-K6 composed of *Defluviitalea raffinosedens* and *A. thermocellus*. This work describes the positive effects of 253c-K6 regarding the maximum biomass hydrolysis and subsequent production of volatile metabolites. Additionally, genome sequencing of *D. raffinosedens* strain 249c-K6 enabled the detailed genetic analysis of this species with regard to the biogas process and also with regard to the identification of metagenomic sequences from other studies.

Specifically the cellulolytic bacteria were analysed via targeting the diversity and quantity of genes encoding for processive exoglucanases of glycoside hydrolase (GH) family 48, which are key enzymes of the bacterial hydrolysis of crystalline cellulose. Cellulolytic bacteria are typically only a minor part within the total biogas-microbiome, but are essential for the first metabolic step, the hydrolysis of the raw substrate, and in consequence they are also essential for the overall methane yield of the process. Quantification of GH48 gene copies in relation to 16S rRNA gene copies showed the specific enrichment of GH48 genes via the *in sacco* method. Further, it was shown that the GH48 gene copy numbers did not vary between different process conditions. In contrast, the total microbial community, assessed via quantification of 16S rRNA genes, fluctuated dependent of the sample (GR or IS) or the process stability (stable or instable). For the taxonomic classification of GH48 gene sequences, a dedicated database combining GH48 gene sequence information along with 16S rRNA gene sequence information was established. GH48 amplicon sequencing revealed that the cellulolytic community was dependent on process conditions and process temperature. Beside unknown genera also well-known cellulolytic key players such as *Acetivibrio* (previously: *Clostridium*) or *Herbinix* were identified with high relative abundances mainly in the thermophilic process. GH48 amplicon sequencing also confirmed that cellulolytic bacteria are highly diverse and mostly unknown in particular within the mesophilic biogas process. In agreement, all novel organisms described in this work originated from the mesophilically operated biogas fermenter.

Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften

Thieme, N., **Rettenmaier, R.**, Liebl, W., Zverlov, V.V. Draft Genome Sequence of *Mobilitalea sibirica* Strain P3M-3T, Representing the First Genome Sequence within the Genus *Mobilitalea*. Microbial Resource Announcements (Submitted).

Rettenmaier, R., Kowollik, M.-L., Klingl, A., Liebl, W., Zverlov, V.V. *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., a mesophilic and moderately thermophilic cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a lab-scale biogas fermenter fed with maize silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (In press).

Koeck, D., **Rettenmaier, R.**, Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., Liebl, W. Genus Herbinix. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (In press).

Rettenmaier, R., Lo, Y.K., Schmidt L., Munk, B., Lagkouvardos, I., Neuhaus, K., Schwarz, W., Liebl, W., Zverlov, V.V. (2020) A novel primer mixture for GH48 genes: Quantification and identification of truly cellulolytic bacteria in biogas fermenters. Microorganisms 8: 1297.

Rettenmaier, R., Schneider, M., Munk, B., Lebuhn, M., Jünemann, S., Sczyba, A., Maus, I., Zverlov, V.V., Liebl, W. (2020) Importance of *Defluviitalea raffinosedens* for hydrolytic biomass degradation in co-culture with *Hungateiclostridium thermocellum*. Microorganisms 8: 915.

Rettenmaier, R., Liebl, W., Zverlov, V.V. (2020) *Anaerosphaera multitolerans* sp. nov., a salt-tolerant member of the family *Peptoniphilaceae* isolated from a mesophilically-operated biogas fermenter fed with maize silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70:1217-1223.

Rettenmaier, R., Gerbaulet, M., Liebl, W., Zverlov, V.V. (2019) *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, cellulolytic and spore-forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69:3567-3573.

Rettenmaier, R., Duerr, C., Neuhaus, K., Liebl, W., Zverlov, V.V. (2019) Comparison of sampling techniques and different media for the enrichment and isolation of cellulolytic organisms from biogas fermenters. Systematic and Applied Microbiology 42:481-487.

Rettenmaier, R., Neuhaus, K., Liebl, W., Zverlov, V.V. 2019. Draft genome sequence of *Anaerosphaera* sp. strain GS7-6-2, a coccal bacterium isolated from a biogas-related environment. Microbiol Resour Announc 8:e00205-19.

Konferenzbeiträge

Rettenmaier R., Scheitz K., Schneider M., Schmidt L., Liebl W., Zverlov V.V. Cellulolytic key players: Insights into biomass degrading systems. Gordon Research Conference, Carbohydrate-Active Enzymes for Glycan Conversions 2019 (Poster), Boston, MA, USA.

Rettenmaier R., Liebl W. and Zverlov V.V. Isolation and characterization of mesophilic, cellulolytic organisms. Biogas Science 2018 (Oral), Turin, Italy.

Rettenmaier R., Liebl W. and Zverlov V.V. Development of a molecular marker tool for the identification and quantification of true cellulolytic organisms. *Clostridia* Conference 2018 (Poster), Freising, Germany.

Rettenmaier R., Duerr C., Liebl W. and Zverlov V.V. The medium makes the difference: Next-Generation-Sequencing of bacterial 16S rRNA amplicons to compare different media and sampling techniques for the enrichment of cellulolytic key players in a thermophilically operated biogas plant fed with maize silage. *Clostridia* Conference 2018 (Poster), Freising, Germany.

Einleitung

1.1 Biogas, eine erneuerbare Energie

Die Richtlinie 2009/28/EG des europäischen Parlamentes und Rates vom 23. April 2009 fordert Maßnahmen zur Verringerung der Treibhausemission sowie eine Stärkung der Energieversorgungssicherheit (Absatz 1). Hierbei wird die Energieproduktion aus erneuerbaren Quellen explizit erwähnt (Absatz 3). Biogas ist nach Richtlinie 2003/54/EG (Artikel 2a) neben anderen (z.B. Wind, Sonne, Wasserkraft) eine der erneuerbaren nichtfossilen Energiequellen und bietet zudem „aufgrund des hohen Einsparpotentials bei Treibhausemissionen signifikante Umweltvorteile sowohl bei der Wärme- und Elektrizitätserzeugung als auch bei der Verwendung als Biokraftstoff“ (Absatz 12). (Europäisches Parlament und Rat 05.06.2009)

Deutschland hat als europäischer Mitgliedsstaat diese Richtlinie im Erneuerbare Energie Gesetz (EEG) auf nationaler Ebene umgesetzt. Ziel dieses Gesetzes ist es, den Anteil des aus erneuerbaren Energien erzeugten Stroms am Bruttostromverbrauch auf 65% bis 2030 zu steigern und zudem auf einen netzverträglichen Ausbau zu achten (§1 Absatz 2). (Bundesamt für Wirtschaft und Energie 2017)

Die Erzeugung erneuerbarer Energie aus Biomasse stieg zunächst nach Inkrafttreten des Gesetzes im Jahr 2000 sprunghaft an, stagnierte jedoch in den Jahren 2015-2019 (Bundesnetzagentur 2019). Allerdings könnte der Ausbau flexibler Biogasanlagen zu einer erneut steigenden Bedeutung führen. Diese Anlagen können den Strompreisen und der Residuallast folgen und bei Bedarf das Netz für Wind- und Solarenergie freimachen. Somit können Biogasrohstoffe zu „Batterien“ der Stromversorgungen in Engpasszeiten werden. (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. 09.11.2020)

Brennbares Biogas ist ein Gemisch aus mehrheitlich Methan (50-75%) und Kohlendioxid (25-45%), sowie geringen Mengen Wasser (2-7%) und Spurengasen wie Schwefelwasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Ammoniak und Wasserstoff. Biogas entsteht durch die anaerobe, mikrobielle Fermentation von organischer Biomasse mit Methan als der vorwiegende energietragende Bestandteil. Dieses wird entweder vom CO₂ getrennt und als Biomethan ins Erdgasnetz eingespeist oder zu Strom und Wärme umgewandelt. Nach der anaeroben Vergärung der Biomasse kann das im Fermenter zurückbleibende Substrat, auch Gärrest genannt, als Dünger auf landwirtschaftlichen Flächen ausgebracht werden. So entsteht ein geschlossener Stoffkreislauf (Abb. 1). (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) 27.12.2020)

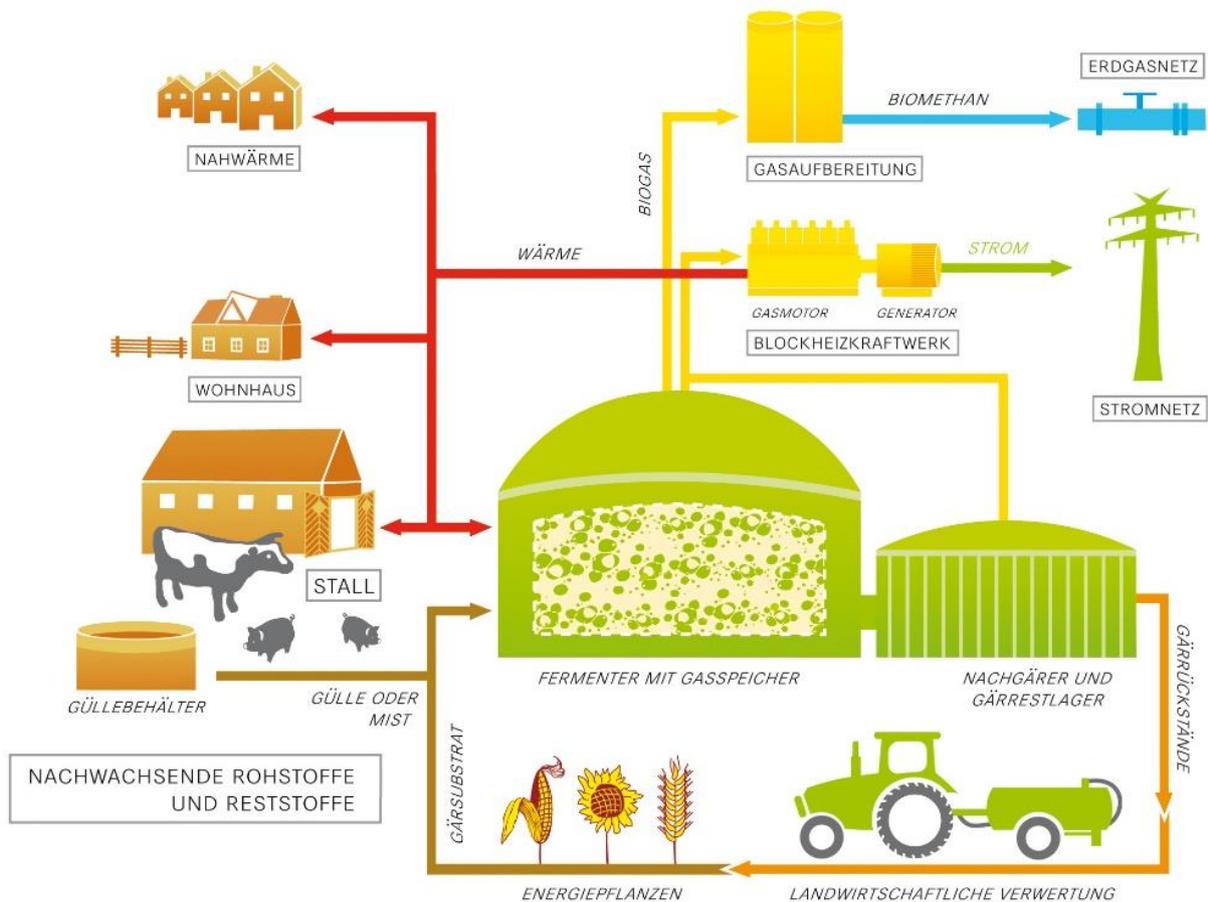


Abb. 1: Schema einer landwirtschaftlichen Biogasanlage. Pressegrafik der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2011, abb 172.

Aus Maissilage kann knapp $200 \text{ Nm}^3/\text{t}_{\text{FM}}$ Biogas (Normkubikmeter pro Tonne Frischmasse) mit einem Methangehalt von 52% erzeugt werden. Maissilage ist damit neben Getreide-Ganzpflanzensilage und Grassilage besonders gut zur Biogaserzeugung geeignet. Deutschlandweit wurde im Anbaujahr 2019 hierfür auf knapp 1 Mio. Hektar Ackerfläche (entspricht 37% der gesamten Maisfläche) Energiemais angepflanzt. Insgesamt nahm der massenbezogene Substrateinsatz nachwachsender Rohstoffe in deutschen Biogasanlagen 2018 47% ein, knapp hinter tierischen Exkrementen wie Gülle oder Mist (48%). (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) 27.12.2020)

Hinsichtlich sozioökonomischen und Nachhaltigkeits-Aspekten ist der Einsatz von Energiepflanzen wie Mais fraglich. Leuhn et al. (2014b) beschreiben bereits die Notwendigkeit der gesellschaftlichen Akzeptanz für erneuerbare Energien. Unter diesem Aspekt bekommt die Vergärung von Abfällen zu einem Energieträger (hier Methan) besondere gesellschaftliche und umweltpolitische Bedeutung. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die Vergärung von Maissilage im Vergleich zu z.B. tierischen Exkrementen zu höheren Erträgen führt. Trotzdem wird die Entwicklung hin zu einer effizienten Nutzung vermehrt Lignocellulose-haltiger Biomasse und biologischer Abfälle für die

anaerobe Fermentation zu Biogas, und hier auch der Abbau der schwer zugänglichen Cellulose, zukunfts-entscheidend sein.

1.2 Metabolische Prozesse in der Biogasanlage

Die Biomasse wird im Biogasprozess durch Mikroorganismen zu Biogas fermentiert. Ausschlaggebend für die metabolischen Prozesse ist zunächst das Ausgangssubstrat, die organische Biomasse.

1.2.1 Aufbau und Struktur von Pflanzenbiomasse

Ausgehend von der organischen Biomasse produzieren anaerobe Mikroorganismen Methan und Kohlenstoffdioxid. Hierbei sind die Bestandteile des Substrates ausschlaggebend für Prozessstabilität und Biogasertrag. In dieser Arbeit wurden Experimente mit dem am meisten verbreitenden Substrat, der Maissilage, durchgeführt. Diese besteht nach Tab. 1, entnommen aus Lebuhn et al. 2014b, Table 2, zu großen Anteilen aus Hemicellulose (26,1%), Cellulose (23,5%) und Fasern (31,3%). (Lebuhn et al. 2014b)

Tab. 1: Bestandteile von Maissilage in Bayern, Deutschland, entnommen aus Lebuhn et al. (2014b), Table 2.

	Proteine [%]	Fasern [%]	Lipide [%]	Cellulose [%]	Hemicellu- lose [%]	Lignin [%]	C [%]	N [%]	C/N
Maissilage (Mittelwert aus n = 98)	7,4	21,3	2,4	23,5	26,1	3,6	46,2	1,2	38,7
Minimum - Maximum	5,7 - 10,4	16,4 - 39,0	1,1 - 3,7	19,0 - 39,9	14,5 - 35,6	1,6 - 7,0	41,3 - 47,1	0,1 - 1,7	26,5 - 51,5

C, Kohlenstoff; N, Stickstoff; C/N; Verhältnis Kohlenstoff zu Stickstoff

Gezeigt wird der Auszug zu Maissilage entnommen aus Lebuhn et al. (2014b), Table 2.

Cellulose ist das häufigste natürlich vorkommende Biomolekül und setzt sich aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen mit Cellobiose als kleinste Struktureinheit zusammen (Klemm et al. 2005; Schwarz 2001). Cellulosepolymere können in der pflanzlichen Zellwand eine Länge aus bis zu 8.000 (primäre Zellwände) oder 15.000 (sekundäre Zellwände) aufeinanderfolgenden Glukosemolekülen erreichen (Brown 2004). Die parallelen Cellulosemoleküle lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen sukzessive zu Elementar- und Mikrofibrillen bis zu einer Länge von einigen 100 nm zusammen. Dabei wechseln sich zumeist kristalline mit wenigen amorphen Regionen ab (Chinga-Carrasco 2011). Aufgrund der hohen Kristallinität ist Cellulose mikrobiell ein schwer abbaubares Ausgangssubstrat (Koeck et al. 2014a).

Verschiedene lineare und verzweigte Polysaccharide werden unter dem Begriff **Hemicellulose**, dem zweithäufigsten natürlichen Biopolymer, zusammengefasst. Dieses setzt sich aus Pentosen (Xylose und Arabinose), Hexosen (Glucose, Galactose, Mannose), sowie Zuckersäuren ((Methyl-)Glucuronsäure und Galacturonsäure) zusammen und kann, basierend auf dem häufigsten Monosaccharid im Rückgrat, in vier strukturell verschiedene Klassen unterteilt werden: i) Xylane, ii) Mannane, iii) β -

Glucane mit gemischten Bindungen und iv) Xyloglucane, mit Xylan als häufigstem Vertreter (Gírio et al. 2010; Scheller und Ulvskov 2010). Wegen seiner zumindest partiellen Löslichkeit ist Hemicellulose trotz der strukturellen Vielfalt und der dadurch notwendigen verschiedenen Hemicellulasen mikrobiell leichter abbaubar als kristalline Cellulose (Himmel et al. 2007; Pérez et al. 2002), und bietet eine metabolische Quelle für C₅ und C₆ Zucker.

Lignin ist ein wasser-unlösliches, aromatisches Polymer, das der Pflanze unter anderem mechanische Stabilität verleiht (Pérez et al. 2002). Obwohl Lignin zusammen mit Hemicellulose nach Cellulose das häufigste Biopolymer in der Natur ist, ist der relative Anteil in Energiepflanzen wie Mais gering (Tab. 1; Tab. 2, entnommen aus Bröker 2019, Tabelle 1.1).

Tab. 2: Ungefähre Zusammensetzung von Maisstroh und Maiskolben in % Trockenmasse, entnommen aus Bröker (2019), Tabelle 1.1.

	Cellulose [%]	Hemicellulose [%]	Lignin [%]	Referenz
Maistroh	33–42	14–33	15–20	Álvarez et al. (2016); Otieno und Ahring (2012); Pauly und Keegstra (2008); Saha (2003); van Dyk und Pletschke (2012)
Maiskolben	35–45	35–42	5–15	Saha (2003); van Dyk und Pletschke (2012)

Gezeigt wird ein Ausschnitt zu Mais aus Bröker (2019), Tabelle 1.1.

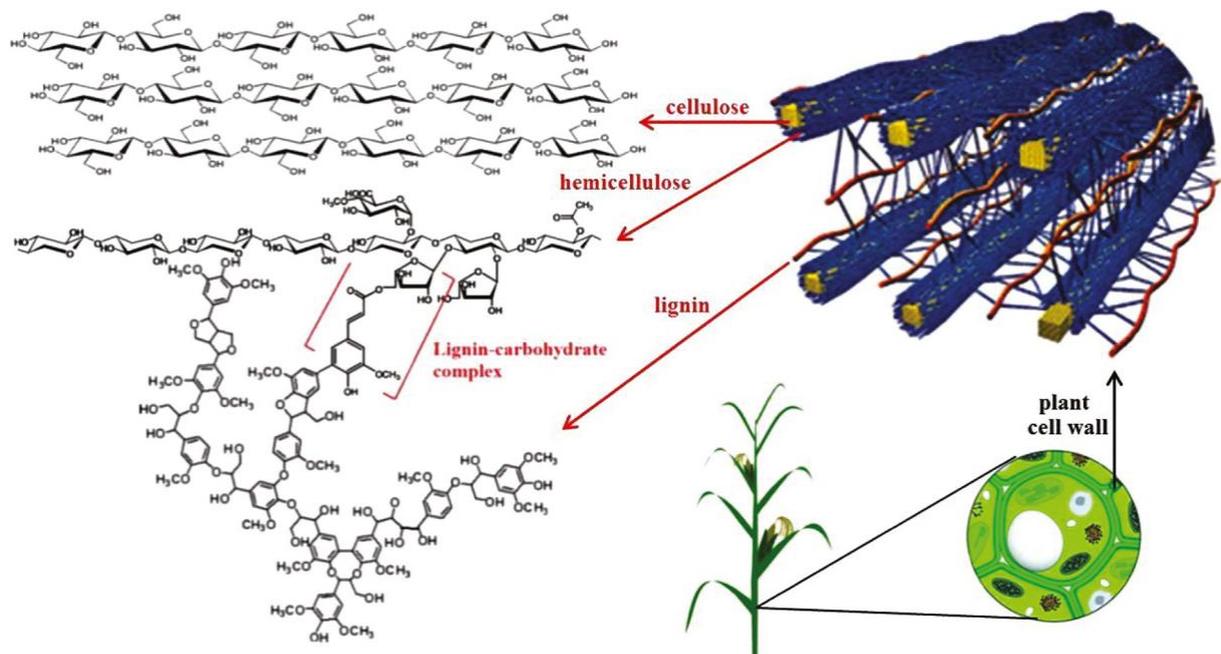


Abb. 2: Struktur von Lignocellulose Yousuf et al. (2020), Figure 1. Reproduziert mit Genehmigung von Elsevier Lizenz Nummer 5021331271719.

Strukturell lagern sich die Grundbestandteile pflanzlicher Biomassen, Cellulose (33-55%), Hemicellulose (13-33%) und Lignin (13-32%) wie in Abb. 2 beschrieben zusammen. Cellulose Mikrofibrillen sind hierbei von Hemicellulose-Polymeren verknüpft mit Lignin umgeben, wobei vor allem die Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe eine besondere Rolle in der Unzugänglichkeit dieser

pflanzlichen Biomasse für den Abbau durch mikrobielle Enzyme spielen. (Yousuf et al. 2020; Volynets et al. 2017)

Aufgrund der kritischen Bewertung der Anzucht von Energiepflanzen wie Mais wird vor allem in Deutschland pflanzliche Biomasse aus verschiedensten Quellen (Ganzpflanzen-Silage, biologische Abfälle etc.) mit Lignocellulose als Hauptbestandteil (~50%) als Ausgangssubstrat zur Energieerzeugung weiter an Bedeutung gewinnen (Antoni et al. 2007; Claassen et al. 1999; Pérez et al. 2002).

1.2.2 Stoffwechselwege der anaeroben Fermentation

Die anaerobe Fermentation von Hexosen wie z.B. Glucose-Einheiten aus Cellulose zu Methan resultiert in einem Energiegewinn von $\Delta G^{\circ} = - 390 \text{ kJ/mol}$. Dies ist im Vergleich zur aeroben Verstoffwechslung von Hexosen zu Kohlenstoffdioxid und Wasser nur 15% der Gibbs-Energie. Folglich ist bei der Methanogenese ein großer Teil der Energie aus Glucose in Methan gespeichert und bietet somit auch die Grundlage für die biotechnologische Nutzung dieses Gases. Aufgrund dieser energetisch ungünstigen Rahmenbedingungen ist die anaerobe Fermentation von organischer Biomasse zu Biogas ein enges Zusammenspiel aus einer Vielzahl von Mikroorganismen, welche syntroph miteinander interagieren. (Schink 1997)

Organische Biomasse (Polymer)

→ Oligo- und Monosaccharide,
Organische Fettsäuren, Alkohole,
Succinat, Laktat, H_2 und CO_2

→ Acetat, H_2 und CO_2

→ CH_4 und CO_2

1. Hydrolyse

Saccharolytische / hydrolytische
Bakterien oder Pilze

2. / 3. Acidogenese und Acetogenese

Acidogene und acetogene Bakterien

4. Methanogenese

Methanogene Archaeen

Abb. 3: Biologische und metabolische Prozesse der anaeroben Fermentation von organischer Biomasse, modifiziert nach Zverlov et al. (2015), Figure 2.

Die metabolischen Prozesse in der anaeroben Fermentation können in folgende vier Schritte unterteilt werden: i) Hydrolyse, ii) Acidogenese, iii) Acetogenese und iv) Methanogenese (Abb. 3). Diese einzelnen Schritte werden durch drei verschiedene Gruppen von Mikroorganismen geleistet. Zunächst vergären im ersten Schritt (Hydrolyse) saccharolytische und hydrolytische Bakterien oder anaerobe Pilze (primäre Gärer) die organische Biomasse zu Oligo- und Monosacchariden, organischen Säuren, Alkoholen, H_2 und CO_2 . Der finale Methanertrag korreliert hierbei direkt mit dem abbaubaren Anteil

des vorhandenen Biomassesubstrats, insbesondere der Hydrolyse vorhandener Polysaccharide in die einzelnen Zuckerbestandteile. Dadurch kann dieser erste Schritt der anaeroben Fermentation limitierend für den weiteren Biogasprozess sein (Zverlov et al. 2015; Angelidaki et al. 2011). Im Anschluss folgt über acidogene und acetogene Bakterien (sekundäre syntrophe Fermentation) die Bereitstellung von Acetat, H₂ und CO₂ für die abschließende Methanogenese über methanogene Archaeen. Diese erfolgt nach aktuellen Erkenntnissen von Evans et al. (2019) über ein diverses Spektrum an Stoffwechselwegen wie z.B. acetiklastisch, hydrogenothroph oder methylotroph. Vor allem die acetiklastische Methanogenese kann neben der Hydrolyse ein limitierender Faktor für die Methanerzeugung sein (Angelidaki et al. 2011). (Zverlov et al. 2015; Schnürer 2016)

1.2.3 Mikrobielle Diversität in Biogasfermentern

Der Abbau der Biomasse und die anaerobe Fermentation werden von einer Vielzahl an Mikroorganismen bewerkstelligt. Basierend auf dem Inokulum und dem zugeführten Substrat etabliert sich im Biogasfermenter eine Mikrobiota (Liu et al. 2017), welche selbst-optimiert anhand der angelegten Prozessbedingungen syntroph agiert (Lebuhn et al. 2014b; Angelidaki et al. 2011). Ihre Zusammensetzung und Anpassungsfähigkeit ist entscheidend für die Stabilität und den Ertrag dieses Prozesses (Lebuhn et al. 2014b). Deshalb wurden bereits zahlreiche Studien zur Analyse der mikrobiellen Flora in Biogasfermentern durchgeführt.

Amplikonsequenzierungen

Die Entwicklung hin zu *next-generation-sequencing*, sowie die Etablierung von molekularen Markern machte die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Hochdurchsatz möglich und löste zum Teil die Arbeiten zur Isolierung und Kultivierung der anaeroben Organismen ab. Angewandt wurden i.d.R. 16S rDNA Sequenzierungen zur Identifizierung von Bakterien (siehe dazu auch 1.4.1) und Archaeen (Zverlov et al. 2015; Wirth et al. 2012; Schnürer 2016; Maus et al. 2016), oder auch die gezielte Analyse funktioneller Gruppen über spezifische Markergene. So können die in relativen Zahlen nur sehr gering vertretenen methanogenen Archaeen gezielt über die Amplifizierung von Methyl-Koenzym M Reduktase Genen (*mcrA*) über quantitative PCR (qPCR) quantifiziert oder über Amplikonsequenzierungen identifiziert werden (Lebuhn et al. 2014b; Lebuhn et al. 2014a; Ozbayram et al. 2017). Gezielt analysiert wurde auch die cellulolytische Bakterien-Gemeinschaft, welche aufgrund der strukturellen Abbauresistenz der kristallinen Cellulose eine bedeutende Rolle für die Hydrolyse des Ausgangssubstrates einnimmt (Zverlov et al. 2015). Sun et al. (2016) analysierte hierzu neben 16S rRNA gezielt Gene der Glykosidhydrolasefamilien 5 und 48 (siehe dazu auch 1.3.2), welche für entscheidende Enzyme der bakteriellen Cellulose-Hydrolyse kodieren (Koeck et al. 2014a).

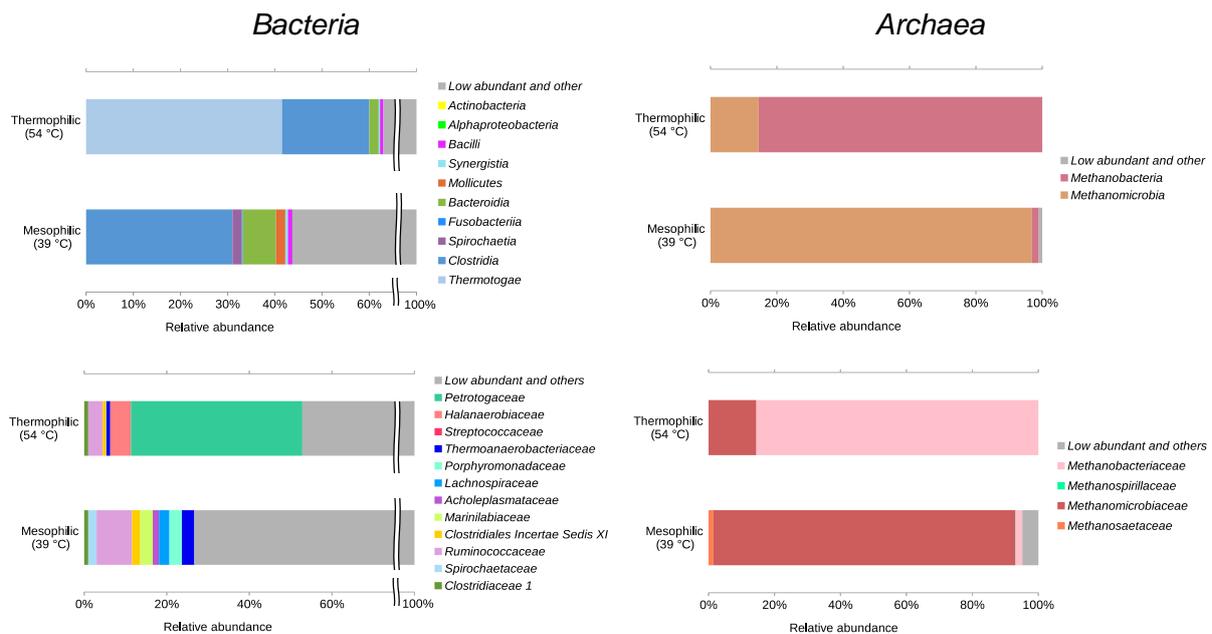


Abb. 4: Mikrobielle Gemeinschaften exemplarischer Biogasanlagen (thermophil und mesophil) nach Hassa et al. (2018), Figure 2. Die 16S rRNA Amplikonsequenzierungen wurden zunächst von Maus et al. (2016) beschrieben. Gezeigt wird sowohl die taxonomische Zusammensetzung der Bakterien (links) und Archaeen (rechts) jeweils auf Klasse- bzw. Familien-Ebene.

Hassa et al. fassten 2018 die Erkenntnisse aus einer Vielzahl von metagenomischen, metatranskriptomische und metaproteomischen Studien zur mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen zusammen. Demnach sind die Prozessparameter wie Temperatur, pH und Art der Fermentation entscheidend für die mikrobielle Gemeinschaft. Dabei ist der Hauptteil der Mikroben (80-100%) dem Reich der Bakterien zuzuordnen, während methanogene Archaeen den Rest der Gemeinschaft ausmachen. 16S rRNA Amplikon-Analysen nach Maus et al. (2016) identifizierten die Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes*, sowie zusätzlich *Thermotogae* ausschließlich bei thermophilen Prozessen, als dominierend. In mesophilen Anlagen wurde insgesamt eine höhere bakterielle Diversität, und damit einhergehend ein geringerer Anteil abundanter Taxa, beobachtet (Abb. 4; Hassa et al. 2018). In mesophil sowie thermophil betriebenen Anlagen, gefüttert mit Maissilage oder Gülle, wurde innerhalb des Phylum *Firmicutes* die Klasse *Clostridia* als dominierend beschrieben. Dazu gehören für den thermophilen Prozess auch bekannte cellulolytische Vertreter des Genus *Clostridium* (*Clostridium thermocellum* nach Koeck et al. 2014b; Akinosho et al. 2014) oder *Herbinix* (*Herbinix hemicellulosilytica* nach Koeck et al. 2015b), die für den Abbau des Ausgangssubstrates relevant sind.

Shotgun Metagenomsequenzierungen

Neben der in Hassa et al. (2018) angesprochenen Mikrobiom-Analysen über 16S rRNA Amplikon-Analysen haben aufgrund des laufenden Fortschrittes des Sequenzierungstechnologien auch *shotgun* Metagenomanalysen eine wachsende Rolle. Diese Sequenzierungs-Technologien ermöglichen neben der zielgerichteten Amplikon-basierten Analyse bestimmter Gene eine Alternative zur Analyse der

taxonomischen Zusammensetzung sowie der funktionellen Potentiale einer mikrobiellen Gemeinschaft (Quince et al. 2017).

Campanaro et al. fassten 2020 im Kontext des Biogas-Mikrobioms Daten aus 134 öffentlich zugänglichen Metagenomsequenzierungen zusammen und konnten daraus 1.635 *metagenome-assembled genomes* (MAGs) assemblieren. Die Daten inkludieren Illumina Sequenzierungen aus Biogasreaktoren im Labormaßstab, Batch-Fermentationen und industriellen Anlagen gefüttert mit verschiedenen Substraten. Aus den taxonomischen Analysen ergab sich, wie aus früheren Analysen erwartet (Lebuhn et al. 2014b; Liu et al. 2017; Angelidaki et al. 2011), eine hochflexible Mikrobiota angepasst an die verschiedenen Prozessbedingungen. Die taxonomische Klassifizierung deutete auf einen hohen Anteil unbekannter Taxa hin, so dass die funktionelle Analyse weitreichende Erkenntnisse hinsichtlich des mikrobiellen Zusammenspiels der anaeroben Fermentation von organischer Biomasse ermöglichte. So konnten z.B. 92,1% der MAGs nicht auf Genus-Ebene identifiziert werden, jedoch trotzdem aufgrund der vorhandenen Genom-Annotationen deren funktionelle Rolle im Biogasprozess analysiert werden. Hinsichtlich der Hydrolyse des Ausgangssubstrates durch saccharolytische Bakterien wurde eine erhöhte relative Abundanz von MAGs mit *carbohydrate-active enzymes* (CAZymes) in mit Cellulose gefütterten Biogasreaktoren beobachtet (siehe dazu auch 1.3.2). Im Durchschnitt machte diese für den gesamten Prozess relevante funktionelle Gruppe an Bakterien i.d.R. einen Anteil von >2% aus, wobei diese Zahl jedoch nichts über deren transkriptionelle Aktivität aussagt. Die assemblierten MAGs wurden als Referenzdatenbank öffentlich unter <http://microbial-genomes.org/projects/biogasmicrobiome> zugänglich gemacht und ermöglichen so eine Grundlage für weiterführende Analysen. (Campanaro et al. 2020)

1.3 Cellulolytische Organismen

1.3.1 Bedeutung cellulolytischer Organismen

Biomasseabbau ist ein natürlicher und notwendiger Prozess innerhalb des Kohlenstoff-Kreislauf; somit haben sich evolutionär sowohl Vertreter der Eukaryoten als auch der Prokaryoten auf den Abbau von Cellulose spezialisiert (Lynd et al. 2002). Der Celluloseabbau ist aus den vorangegangenen Beschreibungen relevant für den Ertrag eines biotechnologischen Prozesses aus organischer Biomasse. Mikroorganismen, welche diese Kohlenstoffquelle effizient abbauen, spielen daher in vielen biotechnologischen Anwendungen und somit auch im Biogasprozess eine tragende Rolle. Innerhalb der Eukaryoten sind viele effiziente Pflanzenbiomasseabbauer dem Reich der Pilze zuzuordnen (Mäkelä et al. 2014). Zunächst wurde eine Dominanz von aeroben Pilzen beschrieben (Lynd et al. 2002). Jedoch spielen nach neueren Erkenntnissen anaerobe Pilze in der Hydrolyse von Pflanzenbiomasse im Verdauungstrakt von Herbivoren eine Rolle (Gruninger et al. 2014). Obwohl Pilze die Hauptakteure im natürlichen Biomasseabbau sind, aerob wie anaerob, wird angenommen, dass die anaerobe Cellulose-

Hydrolyse im Biogasreaktor zumeist von hydrolytischen Bakterien bewerkstelligt wird (Zverlov et al. 2015). In den letzten Jahren wurden aber auch vermehrt Studien zur biotechnologischen Nutzung anaerober Pilze hinsichtlich der Biogas-Erzeugung durchgeführt (Cheng et al. 2018). Diese könnten unter Umständen die Bedeutung cellulolytischer Bakterien für den anaeroben Biogasprozess redefinieren.

Über cellulolytische Spezies aus dem Reich der Archaeen ist unter anderem in Bezug auf den Biogasprozess trotz intensiver Suche bislang wenig bekannt (Lynd et al. 2002; Koeck et al. 2014a). Stattdessen wird von einer spezialisierten syntrophen Interaktion cellulolytischer anaerober Bakterien oder Pilze mit methanogenen Archaeen ausgegangen (siehe 1.2.2). Diese Bakterien und Pilze haben spezialisierte Systeme zum Abbau von Pflanzenbiomasse. Pilze nutzen neben extrazellulären Enzymen auch mechanische Herangehensweisen zur Zersetzung von Pflanzen-Biomasse (Gruninger et al. 2014). Die spezifischen Enzyme, welche die Pflanzenbiomasse anhand der zuvor beschriebenen Zusammensetzung und Struktur zersetzen, werden jedoch von allen cellulolytischen Organismen sekretiert.

1.3.2 Enzymsysteme anaerober cellulolytischer Bakterien

Innerhalb der Bakterien beobachteten Lynd et al. (2002) eine Differenz in den Celluloseabbau-Systemen aerober oder anaerober Bakterien. Während aerobe Bakterien zumeist freie Enzyme in den extrazellulären Raum sekretieren, haben anaerobe Bakterien mit nur wenigen Ausnahmen membranständige Enzymkomplexe auf der Zelloberfläche, mit denen sie direkt an das Substrat anheften. Diese Notwendigkeit der physischen Interaktion mit dem Substrat kann aufgrund der geringen Energieausbeute der anaeroben Glykolyse herrühren, womit im Vergleich zur Atmung nur 2 ATP anstatt 30-32 ATP erzeugt werden (Kollmann 2021). Durch die direkte Interaktion kann verhindert werden, dass Diffusion oder benachbarte Mikroorganismen die Ausbeute aus dem Substrat reduzieren.

CAZymes

Aufgrund der Bedeutung der Enzymsysteme zum Abbau pflanzlicher Biomasse wurde bereits 1998 eine spezialisierte Datenbank für Kohlenhydrat-abbauende Enzyme (sog. CAZymes), <http://www.cazy.org/Welcome-to-the-Carbohydrate-Active.html>, ins Leben gerufen. CAZy.org gibt Auskunft über fünf verschiedene Enzymklassen und assoziierte Module basierend auf der Aminosäure-Sequenz, der 3D-Struktur und der Enzymspezifität. Die Datenbank beinhaltet i) Glykosidhydrolasen (GH), welche glykosidische Bindungen hydrolytisch spalten; ii) Glykosyl-Transferasen (GT), welche Kohlenhydrat-Komponenten übertragen; iii) Polysaccharid-Lyasen (PL), welche Uronsäure-derivatisierte Kohlenhydrate spalten; vi) Kohlenhydrat-Esterasen, welche die de-O- oder de-N-Acetylierung substituierter Zucker katalysieren; v) andere Aktivitäten, d.h. Redox-Enzyme, welche mit

anderen CAZymes interagieren, und vi) *carbohydrate-binding-modules* (CBMs), Module, welche i.d.R. innerhalb eines CAZymes mit einer abgegrenzten Faltung auftreten. (Lombard et al. 2014)

Relevant für die Cellulose-Hydrolyse sind vor allem GHs und assoziierte CBMs. Die Sequenz-basierte Klassifizierung nach Henrissat und Davies (1997) beinhaltet aktuell (Stand 02.01.2021) 168 verschiedene GH-Familien (GHF) und mehrere Subfamilien für einige GHF (GH5, GH13, GH16, GH30 und GH43). Koeck et al. (2014a) fassten basierend auf den Genomsequenzen cellulolytischer Bakterien die Erkenntnisse zu bakteriellen Cellulasen zusammen. Cellulasen sind GHs, welche β -1,4-glykosidische Bindungen in Cellulose hydrolytisch spalten. In Bakterien wurden Cellulasen aus sechs verschiedenen GHF identifiziert (GH5, GH6, GH8, GH9, GH48 und GH124). Hierbei kann nach Schwarz (2001) und Zverlov et al. (2005b) wiederum in drei verschiedene Mechanismen unterschieden werden: i) Endoglucanasen, welche zufällig entlang des β -1,4-Glukans spalten; ii) prozessive Exoglucanasen, welche entweder am reduzierenden oder nicht-reduzierenden Ende des β -1,4-Glukans agieren, oder iii) prozessive Endoglucanasen, welche Cellobiose oder Cellotetraose Einheiten prozessiv vom neu entstehenden Ende des β -1,4-Glukans abspalten.

Prozessive Exoglucanasen sind essentiell für die Spaltung von Cellulose-Molekülen und wurden nur in den bakteriellen GHF 5, 6, 9 und 48 identifiziert (Koeck et al. 2014a). Dabei sind GHs der Familie 5 mit 56 Subfamilien und insgesamt 18.074 identifizierten Proteinen (Stand 02.01.2021) die am weitest verbreitete GHF mit potentieller Exoglucanase-Aktivität. Enzyme der GHF 5 agieren in einem Mechanismus, der die Konformation des anomeren C-Atoms im Glucose-Polymer beibehält (*retaining*), während alle anderen erwähnten GHFs die Konformation invertieren (*inverting*). Insgesamt sind GHs der Familien 5, 6, 9 und 48 vor allem in Bakterien vertreten, können jedoch zum Teil auch in Archaeen oder Eukaryoten detektiert werden (Tab. 3).

Extrazelluläre Enzyme sind häufig multimodulare Enzyme aus katalytischen und nicht-katalytischen Modulen, von denen die CBMs für die Adhäsion der katalytischen GH-Module an das Substrat relevant sind. Dabei sind hier CBMs des Typ A (z.B. CBM1, 3, 5 und 10), welche an kristallin-strukturierte Oberflächen von unlöslichen Polysacchariden wie Cellulose oder Chitin binden (Boraston et al. 2004; Armenta et al. 2017; Gilbert et al. 2013), von besonderer Relevanz, da sie einerseits das Enzym in der Nähe ihres Substrats halten und andererseits die Oberfläche des kristallinen Substrats modifizieren können.

Bakterien mit mindestens einem Vertreter der GHF 48 sind cellulolytisch. Zudem werden i.d.R. nur ein bis maximal zwei Gene für GH48 in Bakteriengenomen identifiziert (Koeck et al. 2014a; Tab. 2), so dass diese Gene auch in anderen Arbeiten als molekulare Marker für cellulolytische Bakterien genutzt wurden (Pereyra et al. 2010; Sun et al. 2016; Liu et al. 2017).

Tab. 3: Übersicht aller GHF mit potentieller Exoglukanase-Aktivität nach CAZy.org, Stand 02.01.2021 (Lombard et al. 2014).

	Aktivitäten	Mechanismus	3D-Struktur	N(Archaea)	N(Bacteria)	N(Eukaryota)
GH5	- Endo- β -1,4-glucanase / cellulase	<i>Retaining</i>	$(\beta/\alpha)_8$ Barrel	118	14.908	2.907
	- Endo- β -1,4-xylanase					
	- β -Glucosidase					
	- β -Mannosidase					
	- β -Glucosylceramidase und weitere					
GH6	- Endoglucanase	<i>Inverting</i>	-	-	2.057	213
	- Cellobiohydrolase					
	- Lichenase / endo- β -1,3-1,4-glucanase					
GH9	- Endoglucanase	<i>Inverting</i>	$(\alpha/\alpha)_6$ Barrel	13	2.196	1.340
	- Endo- β -1,3(4)-glucanase / Lichenase-laminarinase					
	- β -Glucosidase					
	- Lichenase / Endo- β -1,3-1,4-glucanase					
	- Exo- β -1,4-glucanase / cellodextrinase und weitere					
GH48	- reducing end-acting Cellobiohydrolase	<i>Inverting</i>	$(\alpha/\alpha)_6$ Barrel	-	1.179	34
	- Endo- β -1,4-glucanase					
	- Chitinase					

Cellulosomen

Cellulasen können als freie Enzyme, multifunktionale Enzyme oder organisiert in Enzymkomplexen, den sogenannten Cellulosomen, membranständig oder frei im extrazellulären Raum auftreten (Himmel et al. 2007). Hierbei ist die Organisation von Cellulasen in Cellulosomen hinsichtlich des Substratabbaus am effizientesten. Das Cellulosom des cellulolytischen Bakteriums *Clostridium thermocellum* (auch *Acetivibrio thermocellus*) wurde bis dato am eingehendsten studiert (Lamed und Bayer 1988; Zverlov et al. 2005a; Hirano et al. 2016).

Das zentrale Strukturprotein des Cellulosoms, auch *scaffoldin* CipA genannt, von *C. thermocellum* bindet über eine Cohesin-Dockerin Protein-Protein-Interaktion des Typs II an ein membranständiges Protein und ist damit mit der Zelle verankert. Neun Cohesin Typ 1 Module ermöglichen die Assemblierung von bis zu neun katalytischen Einheiten über eine Cohesin-Dockerin Protein-Protein-Interaktion des Typ I. Eine CBM 2 (früher *cellulose binding domain*) ermöglicht die direkte Interaktion mit dem Substrat Cellulose. (Abb. 5; Raman et al. 2009)

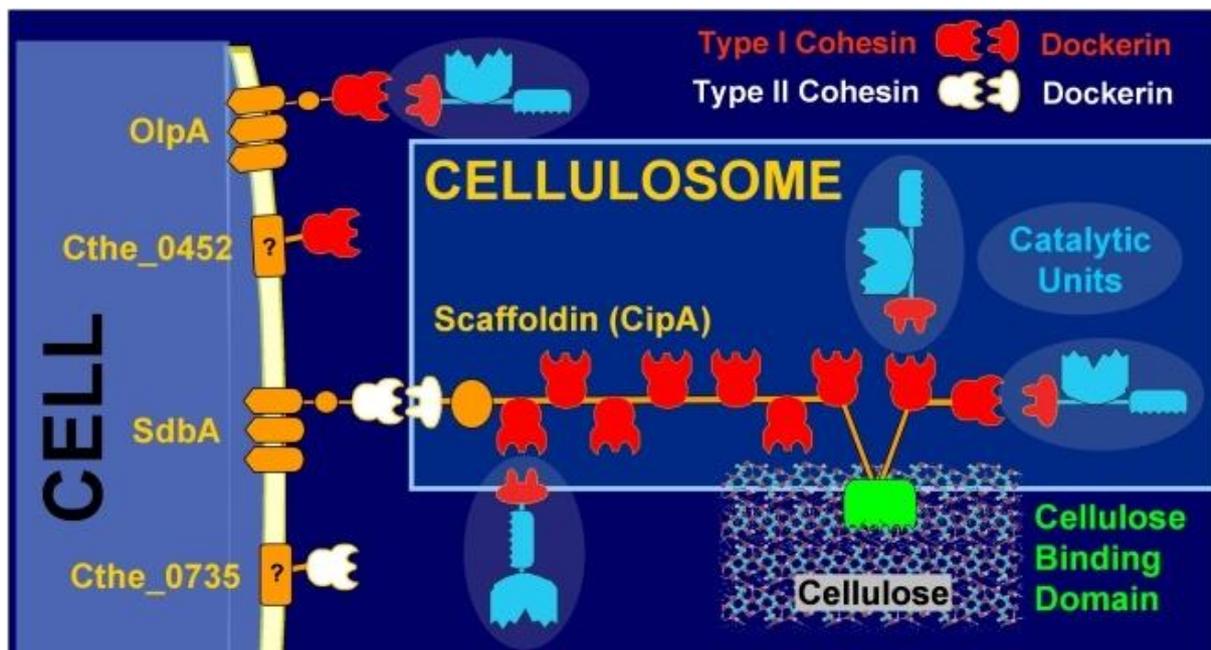


Abb. 5: Ausschnitt der vereinfachten schematische Darstellung des Cellulosoms von *C. thermocellum*, modifiziert nach Raman et al. (2009), Figure 1. Gezeigt werden vier aus sechs membranständigen Proteinen. Darunter auch SdbA, welches mit CipA als Strukturprotein des Cellulosoms interagiert.

Genomsequenz-Analysen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T identifizierten 70 Proteine mit Dockerin-Modulen, welche dadurch putativ cellulosomal organisiert sein können (Zverlov et al. 2005a). Die quantitative Proteom-Analysen von Raman et al. (2009) zur Identifizierung der cellulosomal katalytischen Module in Abhängigkeit verschiedener Substrate wiesen die Expression von 80% der Proteine mit Dockerin- sowie aller Proteine mit Cohesin-Modulen nach. Ähnliche Studien von Gold und Martin (2007) zeigten eine Substrat-spezifische Expression einzelner katalytischer Module. Im Verhältnis der CAZymes pro Strukturprotein CipA wurden bei Wachstum auf Cellulose Cellulasen der GHF 9 sowie unter anderem das Protein CelS stärker exprimiert als bei Wachstum auf Cellobiose. Bzgl. CelS, das der GHF 48 angehört, zeigten auch Studien auf mRNA-Level die erhöhte Transkription in Abhängigkeit des Substrates und der Generationszeit, wobei langsames Wachstum mit Cellulose als schwer zugänglichem Substrat die Transkription von Cellulase-Genen wie *celS* begünstigte (Stevenson und Weimer 2005; Dror et al. 2003).

1.3.3 Biotechnologische Einsatzmöglichkeiten

Die biotechnologische Nutzung von Cellulasen, gewonnen aus dem Zellüberstand aerober Bakterien oder Pilze, hat lange Tradition (Lynd et al. 2002), und entsprechende Enzympräparaten sind kommerziell erhältlich (z.B. Celluclast[®] aus *Trichoderma reesei* von Novozymes). Aufgrund der hohen Effizienz cellulosomal Komponenten anaerober Mikroorganismen hinsichtlich des Celluloseabbaus wurden zunächst basierend auf *C. thermocellum* als Modellorganismus diverse Studien zur biotechnologischen Anwendung durchgeführt. Leis et al. (2017) charakterisierten z.B. alle

cellulosomalen Cellulasen von *C. thermocellum* und vertieften dadurch das Verständnis der synergistischen Effekte im Enzymkomplex. Darauffolgend wurde basierend auf dem *C. thermocellum* Cellulosom ein synthetischer Enzymkomplex aus bis zu 47 einzelnen Komponenten mit Aktivität auf Weichholz-Pulpe zusammengesetzt, der in der Aktivität vergleichbar mit natürlichen Enzym-Cocktails aus Pilzen war (Leis et al. 2018). Leis et al. (2018) schlussfolgerten daher, dass bakterielle Multi-Enzymkomplexe auf Basis des *C. thermocellum* Cellulosoms eine vielseitig einsetzbare Plattform zur enzymatischen Hydrolyse komplexer Substrate bieten. Allerdings sind nicht alle Versuche zur gezielten Entwicklung von „Designer-Cellulosomen“ bis dato erfolgreich im Vergleich zu natürlichen Enzymsystemen gewesen (Gilmore et al. 2015). Im Gegensatz zu bakteriellen Cellulosomen ist, auch aufgrund der hohen Diversität, wenig zu Cellulosomen anaerober Pilze bekannt. Diese bieten daher noch Potential hinsichtlich der biotechnologischen Nutzung (Gilmore et al. 2015).

Neben der Anwendung einzelner Organismen oder einzelner Protein(komplex)e ist auch die gezielte Co-Kultivierung mehrere Organismen eine Möglichkeit. Du et al. (2020) fassten die vielfältigen Anwendungen von Co-Kulturen mit Organismen der Klasse *Clostridia* zusammen und gingen dabei auch auf die Vorteile des Cellulosoms von *C. thermocellum* am Beispiel einer Co-Kultur mit *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* nach Liu et al. (2008) oder Pang et al. (2018) ein. Co-Kulturen zeigten demnach eine erhöhte Substratverwertung und produzierten zudem vermehrt metabolische Produkte wie H₂, organische Säuren und Ethanol. Neben vielen weiteren Vorteilen erhöht die Co-Kultivierung aus anaeroben mit fakultativ anaeroben oder aeroben Organismen die Robustheit dieser Kultivierung, da das für anaerobe Bakterien potentiell schädliche O₂ durch die aerobe Atmung eliminiert wird. (Du et al. 2020)

1.4 Bakterielle Phylogenien

Gensequenz-Ähnlichkeiten ermöglichten die Analyse evolutionärer Distanzen zweier Organismen unabhängig von deren Kultivierung (Rappé und Giovannoni 2003). rRNA Gene stellten hierzu aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften (hoch konservierte Funktionalität, ubiquitär vorhanden) eine geeignete Grundlage zur molekularen Klassifizierung von Bakterien dar (Woese 1987). Der Fortschritt in den Sequenzierungstechnologien ermöglicht heutzutage zusätzlich die Klassifizierung auf kompletten Genomsequenzen (Parks et al. 2018). Beides ermöglicht die Kombination der früheren Klassifizierung basierend auf phänotypischen Eigenschaften mit dieser sequenzbasierten Phylogenie.

1.4.1 Phylogenie, basierend auf 16S rRNA Gensequenz-Homologien

Ribosome sind essentiell für die bakterielle Proteinbiosynthese und werden aus mehreren Proteinen und ribosomalen RNAs (rRNA) assembliert. Die entsprechenden bakteriellen rRNA Gene 16S, 23S und 5S sind dabei in einem Operon organisiert (Abb. 6; Fukuda et al. 2016). Das 16S rRNA Gen kodiert für die RNA-Komponente der *small subunit* (SSU), auch 30S genannt, des bakteriellen Ribosoms, und ist mit 1,500 bp kurz genug, um über Sequenzierungen analysiert zu werden, und lang genug, um ausreichend evolutionäre Informationen zu geben (Woese et al. 1990; Woese 1987).

Basierend auf den konservierten Bereichen des 16S rRNA Gens konnten Primer zur Amplifikation verschiedener Genabschnitte unter Abdeckung einer Vielzahl an Taxa entwickelt werden (Abb. 6; Fukuda et al. 2016). Unter anderem aufgrund dieser Vorteile sind für 16S rRNA Gensequenzen neben etablierten Primersequenzen zur Amplifikation einzelner variabler Regionen oder des gesamten Gens auch eine Vielzahl an Referenzdaten in verschiedenen Datenbanken frei zugänglich und ermöglichen so eine valide Identifizierung eines bakteriellen Taxons (Pace 2009). Stand 05.01.2021 enthält die NCBI 16S RefSeq Datenbank 20.801 16S rRNA Gensequenzen von Bakterien (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=33175%5BBioProject%5D; BioProject 33175>; abgerufen am 05.01.2021). Die manuell validierte Datenbank SILVA nach Quast et al. (2012) enthält aktuell 1.983.0212 Sequenzen in SSU Ref (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-1381/>; abgerufen am 05.01.2021). Daneben wird auch das *Ribosomal Database Project* (RDP) nach Cole et al. (2014) und Wang et al. (2007) regelmäßig aktualisiert (RDP *Classifier* 2.13 veröffentlicht im Juli 2020). Allgemein anerkannt sind Grenzwerte von $\geq 97\%$ bzw. $\geq 99\%$ 16S rRNA Gensequenz-Übereinstimmung zur Abgrenzung bakterieller Taxa auf Genus bzw. Spezies-Ebene (Petti 2007). Allerdings sollte hierzu nach Möglichkeit das komplette 16S rRNA Gen berücksichtigt werden (Edgar 2018; Johnson et al. 2019).

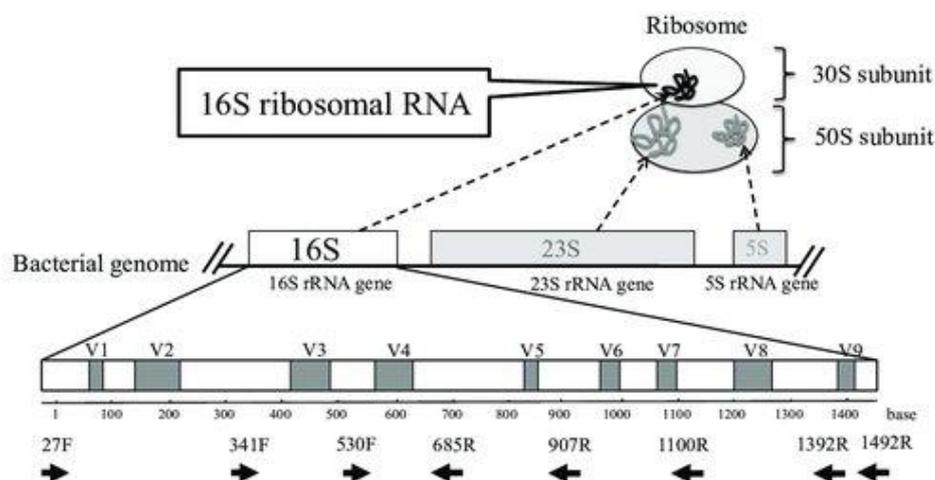


Abb. 6: Schema bakterieller Ribosomen und des 16S rRNA Gens mit verschiedenen Primerbindestellen nach Fukuda et al. (2016), Figure 1.

Nach erfolgreicher Isolierung, DNA Extraktion und Amplifikation des 16S rRNA Gens eines potentiell neuartigen bakteriellen Taxons ist die Rekonstruktion der evolutionären Zusammenhänge vergleichsweise einfach. Die molekulare Phylogenie ist eine graphische Darstellung der Verwandtschaftsbeziehung von Organismen bzw. Molekülen und beinhaltet i) die Auswahl von Vergleichs-Sequenzen, ii) ein multiples Alignment dieser Sequenzen, und iii) die Berechnung und graphische Darstellung der Sequenzunterschiede z.B. nach der *Maximum Likelihood*-Methode nach Felsenstein (1981) zusammen mit *bootstrapping* zur Kalkulation der statistischen Signifikanz (Felsenstein 1985). (Pace 2009)

Aufgrund der wachsenden technologischen Möglichkeiten zur Sequenzierung von DNA werden vermehrt bakterielle Gemeinschaften und nicht nur Reinisolate über 16S rRNA Gensequenzanalysen beschrieben (siehe dazu auch 1.2.3) und detektierten dabei eine Vielzahl neuartiger Bakterien unabhängig von deren Kultivierung (Lloyd et al. 2018). Roche 454, die Illumina Technologie (HiSeq und MiSeq), sowie Pacific Bioscience (PacBio) ermöglichen die Sequenzierung einzelner Regionen bzw. der kompletten 16S rRNA Gensequenz im Hochdurchsatz (Abb. 7). Die Auswahl der Primer, und damit unter anderem auch der variablen Region, kann allerdings zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Interpretation der taxonomische Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft führen (Fischer et al. 2016; Fouhy et al. 2016). Zudem kann auch die Sequenzvariation verschiedener 16S rRNA Genkopien im Genom eines einzelnen Organismus zu Problemen in der Hochdurchsatzanalyse führen. Sie sollte demnach immer kritisch im Hinblick auf ihre Vergleichbarkeit bewertet werden. (Winand et al. 2019)

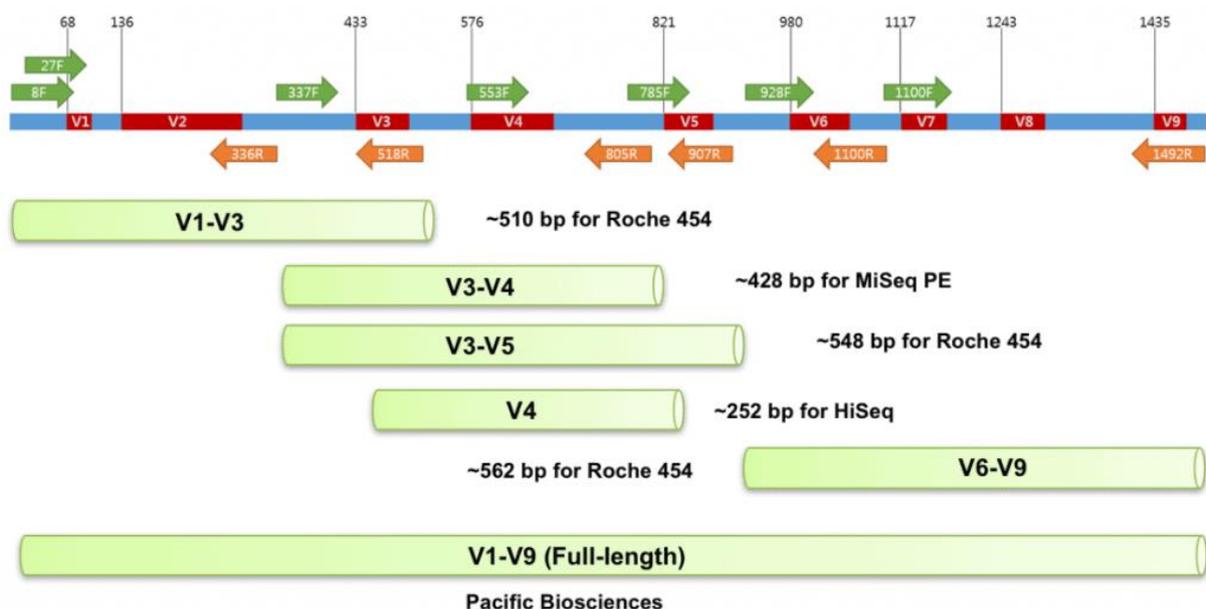


Abb. 7: Bakteriell 16S rRNA Gen mit variablen Regionen, V1 bis V9, Primerbindestellen und mögliche Sequenziermethoden. Abbildung von https://help.ezbiocloud.net/wp-content/uploads/2017/05/16s_var_pcr-1024x521.png, zuletzt modifiziert am 06.08.2020, abgerufen am 03.03.2021, nach ChunLab Inc. (2017).

1.4.2 Phylogenie, basierend auf Genomsequenzen

Bereits Wolf et al. (2002) erkannten die Vorteile der Rekonstruktion evolutionärer Zusammenhänge basierend auf kompletten Genomsequenzen im Vergleich zur Analyse einzelner Gensequenzen. Einzelne Gene können auch horizontal oder lateral übertragen werden und erschweren so die Kalkulation von Verwandtschaftsbeziehungen (Pace 2009). Im Fall der bakteriellen 16S rRNA ist auch die Analyse der kompletten Sequenz, die ausschließlich aus Genomsequenzen ohne einen PCR-Schritt gewonnen werden kann, von Vorteil (Edgar 2018).

Zur Klassifizierung einer neuen prokaryotischen Spezies oder eines neuen Genus werden verschiedene Grenzwerte basierend auf der Genomsequenz vorgeschlagen. Einerseits kann die *average nucleotide identity* (ANI) nach Konstantinidis und Tiedje (2005) über zwei verschiedene Algorithmen, MUMmer (Kurtz et al. 2004; ANIm) oder BLAST+ (Camacho et al. 2009; ANIb), berechnet werden. Diese *in situ* Berechnungen ersetzen nach und nach die DNA-DNA Hybridisierungs-Technologie und ermöglichen eine Abgrenzung von Spezies auf Nukleotidsequenzebene mit 95% Sequenzübereinstimmung als Grenzwert (Goris et al. 2007). Zur Abgrenzung von Genera wird die Kalkulation konservierter Proteine (POCP, *percentage of conserved proteins*) nach Qin et al. (2014) mit 50% Übereinstimmung als Grenzwert vorgeschlagen. Diese Richtwerte sind etabliert zur Einordnung neuer Bakterien-Isolate basierend auf deren Genomsequenz. Zur graphischen Darstellung von Verwandtschaftsbeziehungen kann auf Grundlage der kompletten Genomsequenz ein phylogenetischer Baum mit höherer Redundanz kalkuliert werden. Na et al. (2018) postulierten, dass die genomsequenzbasierte Phylogenie die 16S rRNA Phylogenie ablösen wird und stellten auf <https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg> eine Möglichkeit zur Kalkulation der bakteriellen Phylogenie basierend auf 92 *up-to-date bacterial core genes* (UBCG) ausgehend von Genomsequenzen auf Nukleinsäure-Ebene zur Verfügung. Der abschließende Baum ist der Konsensus-Baum aus 92 einzelnen Phylogenien und ermöglicht so evolutionäre Prozesse gemittelt über essentielle Gene darzustellen. Allerdings ist auch hier die Auswahl der analysierten Gene entscheidend für das Ergebnis. Die Plattform EDGAR - "*Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios*" von Blom et al. (2009) nutzt hierzu eine andere Herangehensweise und bestimmt das Kerngenom jeweils ausgehend von den zu analysierenden Genomen. Damit kann die Phylogenie innerhalb nah verwandter Taxa basierend auf einem größeren Anteil der kodierenden Gene berechnet werden und ist nicht limitiert auf eine zuvor bestimmte Anzahl an Genen.

Durch die wachsende Anzahl von MAGs (siehe dazu auch 1.2.3) oder *single-cell-genomes* (Gawad et al. 2016) wird eine taxonomische Einordnung von Genomen, ohne zusätzliche phänotypische Daten gewonnen aus der Kultivierung des Organismus, immer bedeutender. Hierzu sind neben Referenzdaten auch die zugrundeliegenden bioinformatischen Methoden entscheidend. Chaumeil et

al. (2019) entwickelten hierzu das *Genome Taxonomy Database Toolkit* (GTDB-Toolkit) zur taxonomischen Klassifizierung bakterieller und archaealer Genome basierend auf der GTDB nach Parks et al. (2020). Demnach sind allerdings knapp 40% aller Genomsequenzen nicht valide beschrieben und können somit nicht valide benannt werden. Zur validen Benennung und Beschreibung eines neuen prokaryotischen Taxons ist, Stand heute, die Charakterisierung des Organismus noch immer Voraussetzung.

1.5 Charakterisierung neuer bakterieller Taxa

Obwohl neue bakterielle Taxa auch über molekulare Marker wie die 16S rRNA Gensequenzanalyse innerhalb mikrobieller Gemeinschaften definiert werden können, ist die phänotypische Charakterisierung neuartiger Organismen von Bedeutung. Einzig die Kombination aus Genotyp und Phänotyp ermöglicht eine valide Beschreibung eines neuen Taxons. Die *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) wurde von Euzéby 1997 begründet und ist unter <http://www.bacterio.net> zugänglich (Parte 2014). Seit Februar 2020 inkludiert diese Datenbank unter DSMZ auch Genomsequenz-Informationen von Typstämmen zusammen mit allen Informationen zur prokaryotischen Nomenklatur (Parte et al. 2020; Parte 2018).

Zur validen Beschreibung eines neuen prokaryotischen Taxons ist die Veröffentlichung im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) essentiell. Zudem muss die Benennung dem International Code of Nomenclature of Prokaryotes 2019 folgen. Zur Publikation eines neuen Taxons schreibt IJSEM unter anderem folgende Kriterien vor: i) Zusammenfassung aller Stämme innerhalb des neuen Taxons; ii) Zusammenfassung aller Charakteristika eines jeden Stammes innerhalb des Taxons ; iii) Beschreibung der Unterschiede zur Abgrenzung des neuen Taxons; iv) Benennung des neuen Taxons; v) Die Genomsequenz; vi) die 16S rRNA Gensequenz separat von der Genomsequenz, und vii) das Depot des Organismus in internationalen Stammsammlungen (<https://www.microbiologyresearch.org/journal/ijsem/scope>; „Publication of new taxa“; abgerufen am 05.01.2021). Weiterführend sind Leitfäden zur Charakterisierung neuartiger Spezies (Tindall et al. 2010) oder der Interpretation der Genomsequenz-Informationen (Chun et al. 2018) beschrieben.

Hinsichtlich der phänotypischen Charakterisierung neuartiger, bakterieller Spezies oder Genera ist vor allem die vergleichende Charakterisierung unter den gleichen Laborbedingungen entscheidend. Charakteristika wie die optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, pH, C-Quellen etc.) sind zum Teil abhängig vom verwendeten Medium. Auch die Morphologie, die Motilität und das Gram-Verhalten eines Bakteriums können abhängig von der Kultivierung und der analysierten Wachstumsphase der entsprechenden Stämme variieren. Zudem ist, vor allem für die anaerobe Kultivierung, die Herstellung der Medien, das verwendete Gasgemisch sowie die reduzierenden Agenten entscheidend (Narihira und Kamagata 2016). Auch chemische Analysen der Zellen, wie z.B. die Bestimmung des

Peptidoglykan-Typs oder zellulärer Fettsäuren zur Identifizierung von Bakterien nach dem Sherlock MIS system (MIDI Inc.), sind Bestandteil einer validen Beschreibung eines neuartigen Bakteriums. (Tindall et al. 2010)

Eine problematische Voraussetzung für die phänotypische Charakterisierung ist jedoch die Kultivierbarkeit. Nach den Erkenntnissen aus 16S rRNA Gensequenzierung und Metagenom-Analysen ist ein Großteil der bakteriellen Gemeinschaft unbekannt und kann potentiell nicht unter Laborbedingungen angezogen werden (Lloyd et al. 2018). Auch ein großer Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasreaktoren ist, auch aufgrund der herausfordernden anaeroben Kultivierung, bis heute unbekannt (siehe 1.2.3). Die Charakterisierung neuartiger Taxa sollte zudem nach Möglichkeit aus Reinkulturen erfolgen. Allerdings ist dafür die Kultivierbarkeit in Reinkultur eine Voraussetzung. Die Tatsache, dass nach Lloyd et al. (2018) bis dato der Großteil der Mikroorganismen unter Laborbedingungen in Reinkultur nicht proliferiert, legt nahe, dass Charakterisierungen gegebenenfalls auch in Co-Kultur erfolgen müssen. Hierzu kann die Genomsequenz-Information eine Grundlage zur Zuordnung phänotypischer Eigenschaften einer Co-Kultur zu einzelnen Organismen bieten. Des Weiteren ist denkbar, dass wie zum Beispiel in den Arbeiten von Romano et al. (2013), Sheng et al. (2016) oder Kanokratana et al. (2018) auch die Analyse von Anreicherungskulturen mit einer Vielzahl an Mikroorganismen biotechnologische Anwendung finden können.

Die genomsequenzbasierte Charakterisierung kann nicht nur zur Abgrenzung eines neuen Taxons dienen (siehe 1.4.2 oder Chun et al. 2018). Die Annotation der assemblierten Genomsequenz bietet die Möglichkeit, funktionelle Eigenschaften des neuen Organismus *in silico* zu beschreiben und kann zusammen mit den phänotypischen Charakteristika ein umfassendes Bild über die potentiellen Eigenschaften des neuen Taxons geben. Die Vorhersagen von Stoffwechselwegen mittels *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; Ogata et al. 1999) ist hierzu eine Möglichkeit. Die Vorhersage möglicher CAZymes, welche neuartige Taxa relevant für Abbauprozesse organischer Biomasse machen (siehe dazu 1.3.2), kann z.B. ausgehend von annotierten Genomsequenzen über dbCAN2 erfolgen (Zhang et al. 2018a). Basierend auf diesen genotypischen Informationen können weiterführend gezielt phänotypische Charakterisierungen geplant und durchgeführt werden. Eine Kombination der genannten Methoden ermöglicht es, neben standardisierten Analysen zur Bestimmung des Phänotyps auch taxonspezifische oder prozessspezifische (hier Substrathydrolyse im Biogasprozess) Charakterisierungen durchzuführen.

1.6 Zielsetzung der Dissertation

In dieser Arbeit wurden gezielt Analysen zu hydrolytischen Bakterien in Biogasfermentern durchgeführt. Dazu wurden Arbeiten der klassischen Mikrobiologie zur Isolierung und phänotypischen Charakterisierung von Bakterien mit molekularbiologischen und bioinformatischen Methoden kombiniert. Die analysierten Laborfermenter wurden mit Maissilage gefüttert und thermophil (50-55 °C) bzw. mesophil (38 °C) praxisnah am Institut für Landesamt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT), Freising, Deutschland betrieben.

Zunächst wurde die mikrobielle Gemeinschaft mittels 16S rRNA und gezielter Analyse eines molekularen Markers für cellulolytische Bakterien (GH48), welcher in dieser Arbeit etabliert wurde, über qPCR und Amplikonsequenzierungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation analysiert. Parallel dazu erfolgten Anreicherungen cellulolytischer Organismen unter Laborbedingungen, die unter anderem gezielt die natürlichen Bedingungen im Biogasfermenter imitieren sollten. Zudem erfolgte die Selektion auf echt-cellulolytische mikrobielle Gemeinschaften über das Substrat, kristalline Cellulose in Form von Filterpapier. Neben der Isolierung von Rein- und Mischisolaten wurden die Anreicherungen erneut über 16S rRNA Amplikonsequenzierung analysiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die mikrobiologischen Prozesse zur Hydrolyse des Ausgangssubstrates im Biogasprozess weiter aufzuklären. Hierzu wurden die gewonnenen Isolate hinsichtlich ihrer Bedeutung innerhalb dieses Prozesses eingeordnet. Ähnlich zu den synergistischen Effekten im Biogas-Mikrobiom spielten auch unter Laborbedingungen Mischisolate insbesondere hinsichtlich einer effizienten Cellulose-Hydrolyse eine entscheidende Rolle. Neuartige Isolate wurden dazu zunächst phänotypisch, genotypisch und biochemisch beschrieben. Der Fokus lag neben der sequenzbasierten phylogenetischen Einordnung auch auf der Kombination aus Genotyp und Phänotyp. Hierzu wurde neben der Analyse der hydrolytischen Eigenschaften von Rein- oder Mischisolaten in Bezug auf den Abbau pflanzlicher Biomasse, mit Fokus auf Cellulose, auch die Genomsequenz hinsichtlich des Auftretens spezifischer Stoffwechselwege oder CAZymes analysiert. Zudem ermöglichte die Sequenzierung, Assemblierung, Analyse und öffentliche Beschreibung von Genomsequenzen von bis dato nicht beschriebenen Spezies eine Verbesserung von Referenzdaten. Die valide Beschreibung und Benennung der gewonnenen Organismen war dabei ein essentieller Bestandteil dieser Arbeit.

Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Kits, Chemikalien und Puffer

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie spezielle Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 4 zusammen mit deren Herstellern aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Geräte oder Verbrauchsmittel und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise™	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Alphamager MINI	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Aluminium-Bördelkappe	Diagonal, Münster, Deutschland
Anaerobierzelt Type A Anaerobic Chamber	COY Laboratory Product, Grass Lake, MI, USA
Autoklav VX-150	Systec, Linden, Deutschland
BioSpektrometer® fluorescence	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschränke:	
- New Brunswick™ Innova® 42/42R Shaker	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Venticell	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg, Deutschland
Biolog Universal Anaerobe (BUA)-Agar	Biolog, Hayward, CA, USA
Butyl-Gummistopfen	Glasgerätebau Ochs, Bovenden, Deutschland
Elektrophoreseapparatur EPS 600	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Elektronenmikroskope:	
- EM912	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Auriga	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Faltenfilter 597 ½	Whatman™, GE Healthcare Life Science, UK
FastPrep24 Bead Beater	MP Biomedicals, Eschewege, Deutschland
Gaschromatograph Nexis GC-2030 und GC-2010	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Gefriertrocknungsanlage	Labconco Corporation, Kansas City, USA
Heizplatte Accublock™	Labnet International, Edison, USA
Kieselgelplatten TLC Silica gel 60	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Lichtmikroskop: Axio Scope.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lyse-Matrix E	MP Biomedicals, Eschewege, Deutschland
Magnetrührer Stuart® US152	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Mikrowelle privileg 8018E	Bauknecht Hausgeräte, Stuttgart, Deutschland
NanoDrop	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
PCR Thermo-Cycler Biometra T _{ADVANCED}	Analytik Jena, Göttingen, Deutschland
qPCR-Cycler MxPro	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
pH-Meter 902	Berrytec, Harthausen, Deutschland
Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Reinstwasseranlage Purlab®	ELGA LabWater, High Wycombe, UK
Reagenzsprühgerät ChromaJet DS 20	Desaga Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schüttelheizplatte MHR23	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Deutschland

Gerät	Hersteller
Vortexer:	
- Vortex Genie 2™	Bender&Hobein, München, Deutschland
- ZX3 Advanced Vortex Mixer	VELP Scientifica Srl, Usmate, Italien
Waagen:	
- 1204 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Feinwaage Precisa 125 A SCS	Precisa Gravimetrics, Dietikon, Schweiz
Zentrifugen:	
- Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mini-Zentrifuge SU1550	Labdiscount, Mannheim, Deutschland
- Mikroliterzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
- Mikroliterzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
- Rotina 420R	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Superspeed-Zentrifuge Sorvall™ LYNX™ 6000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Kits, Enzyme, Plasmide und Längenstandards

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits, Enzyme und Längenstandards und deren Hersteller sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Verwendete Kits, Enzyme, Plasmide und Längenstandards und deren Hersteller.

Kit	Hersteller
Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
AMPure XP PCR-Aufreinigungssystem	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
AN Micro Plate	Biolog (Hayward, CA, USA)
DNA-free Turbo Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
DNA Soil	Roboklon (Berlin, Deutschland)
EURx GeneMATRIX DNA+RNA+Protein	Roboklon (Berlin, Deutschland)
Gel Loading Dye Purple	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Genomic DNA Purification	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
MagAttract HMW DNA Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Mini-Elute	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Längenstandard DNA GeneRuler 1kb	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Längenstandard DNA GeneRuler 1kb plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Längenstandard Protein Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lysozym	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
OneStep PCR Inhibitor Removal Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)
pET24c:cel48S	TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie (Freising, Deutschland)
Proteinase K	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Platinum Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
RNase A	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TruSeq DNA PCR-free sample preparation kit	Illumina Inc. (San Diego, CA, USA)

2.1.3 Chemikalien und Kohlenhydrate

In dieser Arbeit wurden folgende Chemikalien (Tab. 6) und Kohlenhydrate (Tab. 7) in Arbeiten am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München, verwendet.

Tab. 6: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Anthron	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Casamino acids (CAA)	BD Bacto™, Franklin Lakes, NJ, USA
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EvaGreen®	Jena Bioscience (Jena, Deutschland)
Ethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kristallviolett	Merck (Darmstadt, Deutschland)
L-Cysteinhydrochlorid-1-hydrat	Alfa Aesar von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lugol'sche Lösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
γ-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat Trihydrat	VWR International (Radnor, PA, USA)
PEG-6000	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Resazurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Roti®-C/I	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ROTI-Phenol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RNAlater	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Safraninlösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Trizol (Invitrogen™ TRIzol™ Reagent)	Ambion von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tab. 7: Verwendete Kohlenhydrate und deren Hersteller.

Kohlenhydrat	Hersteller
Arabinose	Bio Chemika Int (Lahore, Pakistan)
Cellobiose	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Cellulose:	
- Whatman™ Filterpapier Nr.1	GE Healthcare GmbH (Solingen, Deutschland)
- MN301 fibrous cellulose	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
- Cellulose microcrystallin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- PASC (engl.: <i>phosphoric acid swollen cellulose</i>)	Eigene Herstellung nach Wood (1988)
Maltodextrin10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Fructose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Galactose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Glucose	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Lactose- Monohydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
LM-Pektin	Carbosynth Ltd von Biosynth AG (Staad, Schweiz)
Maltose	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Mannitol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Mannose	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ribose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Saccharose	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Stärke (löslich)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Trehalose-Dihydrat	Bio Chemika Int (Lahore, Pakistan)
Xylan aus Buchenholz	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Herstellung von PASC nach Wood (1988)

10 g Avicel wurden in 50 ml ddH₂O eingeweicht und anschließend mit 85%-iger Phosphorsäure unter Rühren auf 1 l aufgefüllt und 1 h auf Eis bei 4 °C gerührt. Im Anschluss wurden 4 l kaltes ddH₂O zugegeben, kurz aufgerührt, 30 min auf Eis inkubiert, erneut kurz aufgerührt und durch einen Faltenfilter bei 4 °C filtriert. Das im Filter gesammelte PASC wurde in 2 l kaltem ddH₂O gewaschen, erneut filtriert und mit 2 l kaltem ddH₂O nachgewaschen. Nachfolgend wurde in 2 l NaHCO₃ (1%, w/v) gewaschen, erneut filtriert und so lange mit ddH₂O nachgewaschen, bis der pH-Wert des Durchflusses neutral war. Das PASC wurde in ddH₂O suspendiert und es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Suspension durch Trocknung von 1 ml bei 60 °C auf einem Uhrglas und anschließender Rückwaage.

2.1.4 Puffer und Färbelösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen sind im Folgenden aufgelistet.

Tab. 8: Zusammensetzung 10x PBS-Puffer.

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	26,8 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l

Tab. 9: Zusammensetzung 50x TAE-Puffer.

TRIS	2 M
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	0,05 M
Essigsäure	1 M

Tab. 10: Zusammensetzung Zell-Lysepuffer.

Tris/HCl pH 7,5	20 mM
EDTA	25 mM
NaCl	75 mM
Lysozym	1 mg/ml

Tab. 11: Zusammensetzung 10x MOPS Puffer.

MOPS	1 M
NaCl	0,5 M
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 M

Tab. 12: Zusammensetzung DNSA-Lösung.

3,5-Dinitrosalicylsäure	10 g/l
NaOH	10 g/l
Kalium-Natrium-Tartrat	200 g/l
Phenol	2 g/l
Natriumsulfat	0,5 g/l

Tab. 13: Zusammensetzung der DC-Färbelösung.

Diphenylamin	1,0 g
Anilin	1,0 ml
Aceton	100 ml

Tab. 14: Zusammensetzung des 4x Auftragspuffers für die SDS-PAGE.

TRIS	0,25 M
Glycerol	40% (w/v)
SDS	8,4% (w/v)
β-Mercaptoethanol	0,57 M
Bromphenolblau	0,02% (w/v)

Tab. 15: Pipettierschema der Gele für die SDS-PAGE.

Sammelgel 4%	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	330 µl
Sammelgelpuffer	625 µl
MQ	1,55 ml
APS	37,5 µl
TEMED	4,5 µl
Trenngel 12%	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	2 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml
MQ	1,75 ml
APS	52,5 µl
TEMED	7,5 µl

Tab. 16: Zusammensetzung des Lauf-, Sammel- und Trenngelpuffers der SDS-PAGE.

Laufpuffer	
TRIS	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)
Sammelgelpuffer	
TRIS-HCl	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)
Trenngelpuffer	
TRIS-HCl	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Der Extraktionspuffer zur Extraktion hochmolekularer DNA aus Fermenterproben setzt sich aus Kaliumphosphatpuffer (Tab. 17) und CTAB/NaCl 1:1 (v/v) zusammen. Die CTAB/NaCl-Lösung setzt sich aus 0,7 M NaCl und 10% (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in H₂O zusammen. Der Präzipitationspuffer enthält PEG-6000 (30% w/v; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 1,6 M NaCl in H₂O.

Tab. 17: Kaliumphosphatpuffer, 240 mM, pH 8

K ₂ HPO ₄	39,3 g
KH ₂ PO ₄	1,96 g

2.2 Biogasfermenter

Die Biogasfermenter wurden am Landesamt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT), Freising, Deutschland unter der wissenschaftlichen Betreuung von Bernhard Munk, LfL, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (AQU) betrieben. Die Fermenter mit einem 50 l Gesamtvolumen liefen bei einem Füllstand von ca. 40 l mesophil (38 °C) bzw. thermophil (50-55 °C). Als Inokulum für den mesophilen Fermenterbetrieb diente Gärrest aus der industriellen

Biogasanlage Pellmeyer in Pulling (Landkreis Freising), welche mit Gras- und Maissilage betrieben wird. Für den thermophilen Betrieb wurde als Inokulum Gärrest aus der industriellen Biogasanlage Höckmeier in Wolnzach (Landkreis Pfaffenhofen an der Ilm), welche zu 70% mit Maissilage, zu 20% mit Getreide-Ganzpflanzensilage und mit 10% Hühnermist betrieben wird, verwendet. Die Fermenter wurden täglich mit zerkleinerter Maissilage gefüttert. Alle Prozessparameter wurden am LfL dokumentiert.

2.3 Verwendete Medien

Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte, je nach Organismus, aerob oder anaerob in verschiedenen Medien, welche vor Erstgebrauch bei 121 °C für 15 min bei 2 atm autoklaviert wurden. Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,8% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

Anaerobe Organismen wurden in Sauerstoff-freien Medien in einer N₂/H₂-Atmosphäre (98:2%, v/v) in Rollrandflaschen aus Glas, welche mit einem Butyl-Gummistopfen und einem Aluminium-Crimp verschlossen wurden, angezogen. Als Standard-Medium für anaerobe Organismen wurde GS2-Medium nach Johnson et al. (1981) in Modifikation nach Koeck et al. (2015b) verwendet (Tab. 18). Hierbei diente L-Cystein als Sauerstoff-reduzierendes Agens und gewährleistete zusammen mit Resazurin als Farbindikator die anaeroben Bedingungen. Die Salzlösung (Tab. 19) wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Weitere lösliche, nicht autoklavierbare Zusätze, wie z.B. Mono- oder Disaccharide als Kohlenstoff-Quelle (C-Quelle), wurden separat steril-filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben. Agarplatten wurden aerob gegossen und anaerob im Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA mit einer N₂/H₂-Atmosphäre (98:2%, v/v)) mindestens 48 h vor Erstgebrauch zur Entfernung von Restsauerstoff gelagert. Zusätzlich wurde Top-Agar (GS2 Medium, 0,5% (w/v) Cellulosepulver MN301, 0,02% (w/v) Cellobiose, 0,8% (w/v) Agar) zur Überschichtung von Agarplatten im Zuge der Isolierung cellulolytischer Organismen verwendet (2.5.3 Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen in Reinkultur).

Tab. 18: Zusammensetzung GS2 Medium.

KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
K ₂ HPO ₄	2,9 g/l
Harnstoff	2,1 g/l
L-Cystein	1 g/l
MOPS	10 g/l
Hefeextrakt	6 g/l
Natriumcitrat	2,9 g/l
Resazurin	0,002 g/l

Der pH-Wert wurde i.d.R. mit 10 M NaOH-Lösung auf 7.2 justiert.

Tab. 19: Zusammensetzung der 100x GS2-Salzlösung.

MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,0 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,5 g
FeSO ₄ (1,25%; w/v)	1 ml
MQ	100 ml

Tab. 20: Zusammensetzung GS2_CAA Medium.

KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
K ₂ HPO ₄	2,9 g/l
Harnstoff	2,1 g/l
L-Cystein	1 g/l
MOPS	10 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
CAA	6 g/l
Natriumcitrat	2,9 g/l
Resazurin	0,002 g/l

CAA, Casamino Acids

Des Weiteren wurde zur Nachahmung des natürlichen Habitats der zu analysierenden Mikroorganismen, dem Biogasfermenter, Gärrest (GR) dem Kultivierungsmedium zugesetzt. Hierzu wurde, wie in Rettenmaier et al. (2019a) beschrieben, der GR direkt aus dem beprobten Biogasfermenter, mesophil bzw. thermophil, entnommen. Zur Entfernung fester Bestandteile, welche in der Kultivierung auf spezifischen Substraten keine Energie-Quelle darstellen sollten, wurde der GR vor der Verwendung durch Nylongewebe (40 Denier) gepresst und im Anschluss 30 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden zweimal 20 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung von feinen Partikeln wurde der Überstand auf 20% (v/v) verdünnt mit Leitungswasser, nochmals 20 min bei 6.000 rpm abzentrifugiert und anschließend durch einen Faltenfilter (Whatman™ 597 1/2) gefiltert. Dieser 20%-ige GR in Leitungswasser diente direkt als Medium (GR20-Medium; Tab. 21) oder wurde mit 1-2,5% (v/v) zu GS2-Medium zugegeben (GS2.5GR Medium).

Tab. 21: Zusammensetzung GR20-Medium.

Gärrest gefiltert	20% (v/v)
Cystein	1 g/l
Leitungswasser	80% (v/v)

Zur langfristigen Aufbewahrung von aktiven Kulturen wurde 1 ml Glycerin-Lösung (Tab. 22) mit 1 ml Bakterienkultur anaerob gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Tab. 22: Zusammensetzung Glycerin-Lösung.

Glycerin	50% (w/v)
Cystein	1 g/l
Resazurin	2 g/l

Die Kultivierung der aeroben Organismen *E. coli* und *B. subtilis* erfolgte in LB-Medium (Tab. 23) mit pH7.0.

Tab. 23: Zusammensetzung LB-Medium.

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l

2.4 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten, aber nicht im Zuge dieser Arbeit isolierten Mikroorganismen und deren Bezugsquellen, sind in Tab. 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Verwendete Mikroorganismen und deren Bezugsquelle.

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405 ^T	TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Freising, Deutschland
<i>Bacillus subtilis</i> W23	TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Freising, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> DSM 30083 ^T	TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Freising, Deutschland
<i>E.coli</i> K13	Landesamt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Freising, Deutschland

2.5 Anreicherung und Isolierung von cellulolytischen Mikroorganismen aus Biogas Fermentern

2.5.1 Probennahme aus Biogas Fermentern

Zur Probennahme von mikrobiologischen Proben aus den Fermentern wurde eine kleine Menge frischer Fermenterinhalt, hier genannt Gärrest (GR), entnommen und diese zur Anreicherung cellulolytischer Organismen im Labor weiterverwendet. Zudem erfolgte eine Anreicherung cellulolytischer Organismen direkt im Fermenter. Hierzu wurde analog der *in sacco* (IS) Methode nach Mohamed und Chaudhry (2008) die Modifikation nach Koeck et al. (2016b) angewandt: Es wurden jeweils zwei Nylon-Säckchen (5×10 cm und einer Porengröße von 50 µm) als biologische Replikate mit 2-3 g Filterpapierschnipsel (Whatman No.1) gefüllt und diese für eine Inkubationszeit von 5 Tagen in den Fermenter über den Keimträger eingehängt. Die Säckchen wurden nach der Entnahme aus dem Fermenter umgehend anaerob eingeschweißt und entweder zur Inokulation von Anreicherungskulturen (siehe 2.5.2) oder zur Extraktion von Nukleinsäuren (siehe 2.8.2) verwendet. Dazu erfolgte zur Eliminierung von GR ein zweimaliger anaerober Waschschrift mit 0,9% NaCl (w/v), um so mit den direkt an das Papier-anhaftenden Mikroorganismen weiter zu arbeiten.

2.5.2 Anreicherung von cellulolytischen Mikroorganismen aus Biogasfermenterproben

Zur Anreicherung von cellulolytischen Mikroorganismen aus Biogasfermenterproben wurden jeweils biologische Triplikate anaerob mit einer Spatelspitze frischem GR oder 100-300 mg gewaschenem Papier aus der IS Voranreicherung (siehe „2.5.1 Probennahme aus Biogas Fermentern“) in 10 ml Medium inokuliert. Danach erfolgte eine serielle 1/10-Verdünnung in der mit dem GR angeimpften Flaschen bis die Verdünnungsstufe 10^{-6} erreicht wurde. Die Anreicherungen mit der IS-Methoden wurden zunächst nicht weiter verdünnt. Verwendet wurden jeweils drei verschiedene Medien, GS2, GS2.5GR und GR20 (siehe „2.3 Verwendete Medien“). Die Inkubation erfolgte, entweder mesophil (37 °C) oder thermophil (50-55 °C), abhängig von der Betriebstemperatur des Fermenters. Wachstum von Mikroorganismen wurde einerseits durch Trübung der Medienlösung (anwendbar nur bei GS2 und GS2.5GR Medium) sowie durch die Gasbildung beobachtet. Zudem deutete Filterpapierabbau auf die Aktivität cellulolytischer Organismen hin.

2.5.3 Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen in Reinkultur

Bakterien wurden aus Anreicherungen (siehe 2.5.2) mit deutlichem Papierabbau isoliert. Hierzu wurde die höchste Verdünnung mit cellulolytischer Aktivität überimpft und erneut seriell in Schritten von 1/10 verdünnt, und zudem auf entsprechendem Festmedium, je nach Wachstumsdichte in Verdünnungen von 10^{-4} - 10^{-7} , ausgestrichen. Die Agarplatten wurden mit temperiertem (42 °C, mesophil, bzw. 60 °C, thermophil) Top-Agar überschichtet. Durch Bildung von Klärhöfen im Top Agar konnten einzelne cellulolytische Kolonien mit Hilfe einer sterilen Kanüle von der Platte gepickt und in frisches Flüssigmedium überführt werden. Nach erneuter Inkubation wurde die cellulolytische Eigenschaft der Kultur überprüft.

Die Identifizierung cellulolytischer Kulturen erfolgte molekularbiologisch über die Amplifizierung der bakteriellen 16S rRNA (siehe „2.8.4 Amplifikation von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion“) aus genomischer DNA (gDNA) (siehe „2.8.2 Extraktion von Nukleinsäuren“) und anschließender Sanger- (siehe „2.9.1 Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten“) oder Hochdurchsatz-Sequenzierung (siehe „2.9.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung von PCR-Produkten“). Mit den generierten Sequenzdaten wurden ein Abgleich zu öffentlichen Datenbanken (NCBI, EzBioCloud) durchgeführt (siehe „2.10.2 Verwendete Datenbanken“).

Wichtige Isolate wurden bei zwei internationalen Stammsammlungen hinterlegt und sind unter „Hinterlegung neuartiger Isolate in internationalen Stammsammlungen“ zusammengefasst. In dieser Arbeit wurde hierzu mit den Stammsammlungen in Deutschland (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), Spanien (*Spanish Type Culture Collection* (CECT), Valencia, Spanien) und Japan (*Japan Collection of Micoorganisms* (JCM), Ibaraki, Japan) zusammengearbeitet.

2.6 Mikrobiologische Arbeiten zur Charakterisierung ausgewählter Isolate

2.6.1 Optische Bestimmungen der Kolonie- und Zellmorphologie

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden am Axio Scope.A1 Mikroskop bei 1.000-facher Vergrößerung zur Bestimmung der Zellform, Motilität, der Sporenbildung oder Beobachtungen nach Gram-Färbung durchgeführt (2.6.2 Ermittlung des Gram-Verhaltens). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Klingl am Lehrstuhl für pflanzliche Entwicklungsbiologie und Elektronenmikroskopie der Ludwig-Maximilian-Universität München in Planegg-Martinsried, Deutschland. Es wurde sowohl Rasterelektronenmikroskopie (SEM, engl. *Scanning Electron Microscope*), welche Oberflächen von Strukturen mit Längen bis 50 nm auflöst, als auch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), welche eine Auflösung subzellulärer Strukturen bis zu 0,1 nm erlaubt, durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte aus Flüssigkulturen am Lehrstuhl für pflanzliche Entwicklungsbiologie und Elektronenmikroskopie: für TEM am EM912 erfolgte eine Negativkontrastierung mit 2% (w/v) Uranyl-Acetat nach Klingl et al. (2011); für SEM am Auriga wurden die Kulturen mit 2.5% (w/v) Glutaraldehyd chemisch fixiert, über Aceton-Waschschritte entwässert, kritisch-Punkt-getrocknet und mit Platinium überschichtet (Schuster et al. 2019).

2.6.2 Ermittlung des Gram-Verhaltens

Gram-Färbung

Ein Tropfen Bakteriensuspension wurde aerob auf einem Objektträger mit einem Tropfen Reinstwasser (MQ) suspendiert und anschließend hitzefixiert. Nach Färbung für 3 min mit Kristallviolett (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit Lugol'scher Lösung nachgespült und 2 min inkubiert. Die Lugol'sche Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit MQ abgespült und mit einer Entfärbelösung aus Ethanol und Aceton (80:20 v/v) 15 s entfärbt, ehe nochmals mit MQ gespült und anschließend für 1 min mit Safraninlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt wurde. Die gefärbten Zellen wurden im Anschluss lichtmikroskopisch im Hellfeld bei 1.000x Vergrößerung mittels Ölimmersion am Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Gram-positive Bakterien behalten aufgrund ihrer dicken mehrschichtigen Peptidoglykanschicht die dunkelblauen Farbkomplexe der ersten beiden Färbeschritte. Die Peptidoglykanschicht Gram-negativer Bakterien ist dagegen einschichtig und dünn, weshalb die Farbkomplexe mit Ethanol ausgewaschen werden und die Zellen nach Gegenfärbung mit Safranin rötlich erscheinen. Die Stämme *E. coli* DSM 30083^T (Gram-negativ) und *B. subtilis* W23 (Gram-positiv) wurden als Kontrollen für eine erfolgreiche Färbung mitgeführt.

KOH-Test

Der KOH-Test bietet neben der Gram-Färbung ein weiteres Verfahren zur Bestimmung des zellulären Gram-Verhaltens. Hierzu wurde etwas Zellmaterial von Platte anaerob in einer 3%-igen (w/v) KOH-Lösung suspendiert. Die dünne Peptidoglykanschicht Gram-negativer Bakterien lysiert und somit wird deren chromosomale DNA freigesetzt. Dadurch erhöht sich die Viskosität der Lösung und Fadenbildung ist zu beobachten. Gram-positive Zellen lysieren aufgrund ihrer dickeren Peptidoglykanschicht nicht; somit bleibt die Viskosität der wässrigen Lösung unverändert. Die Stämme *E. coli* DSM 30083^T (Gram-negativ) und *B. subtilis* W23 (Gram-positiv) wurden als Kontrollen mitgeführt.

2.6.3 Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen

Die Bestimmung des Wachstums erfolgte je nach Organismus nach 2-7 Tagen photometrisch. Es wurde entweder die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) oder die Gesamt-Zellproteinmenge eines thermisch lysierten Zellpellets (20 min bei 95 °C im Wasserbad suspendiert in 1% CHAPS (w/v), pH 11) nach Bradford (Bradford 1976; Compton und Jones 1985) bestimmt.

Temperatur-Optimum

Zur Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen wurde zunächst die optimale Wachstumstemperatur mit 2-3 biologischen Replikaten und zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen durchgeführt. Der Temperaturbereich wurde zunächst in 5 °C-Schritten eingegrenzt und zum Teil wurde ein genaueres Optimum in 2 °C Schritten bestimmt. Alle weiteren Wachstumsversuche wurden bei der optimalen Wachstumstemperatur durchgeführt.

pH-Optimum

Zur Bestimmung des optimalen pH wurde GS2-Medium mit pH 5 bis pH 9.5 mit den Puffer-Substanzen Natriumacetat Trihydrat, MOPS und TRIS (Tab. 25) hergestellt. Nach dem Autoklaviervorgang wurde der pH erneut gemessen und bei Bedarf auf die finalen pH-Werte nachjustiert (Tab. 26). Alle weiteren Wachstumsversuche wurden bei dem optimalen pH durchgeführt.

Tab. 25: Eingesetzte Puffersysteme.

pH-Bereich	5,0 – 5,5	6,0 – 8,0	8,5 – 9,5
Puffer (50 mM)	Natriumacetat Trihydrat	MOPS	TRIS

Tab. 26: Gemessene und eingestellte pH-Werte vor und nach dem Autoklavieren.

Eingestellter pH (vor dem Autoklavieren)	Gemessener pH (nach dem Autoklavieren)	Eingestellter pH (nach dem Autoklavieren)
5,0	6,2	5,1
5,5	6,6	5,7
6,0	6,4	6,1
6,5	6,7	-
7,0	7,1	-
7,5	7,7	-
8,0	7,7	-
8,5	8,7	-
9,0	9,1	-
9,5	9,4	-

Hitze-Resistenz / Sporenbildung

Der Test auf Hitzeresistenz bzw. Sporenbildung erfolgte mittels Pasteurisierung für 10 min bei 60, 70 oder 80 °C im Wasserbad. Wachstum wurde nach maximal 2 Wochen Inkubation in pasteurisierten und, zur Kontrolle, nicht erhitzten Kulturen dokumentiert.

NaCl-Toleranz

Für die Ermittlung der maximal tolerierten Salzkonzentration wurde vor dem Autoklavieren dem GS2-Medium (enthält 0,29% w/v Na⁺) zusätzlich 0,2 bis 10% (w/v) NaCl hinzugefügt und das Wachstum nach maximal 2 Wochen dokumentiert.

2.6.4 Bestimmung der Verwertung von C-Quellen

Screening mit AN Micro Plates™

AN Micro Plates™ wurden für das Screening von 95 biochemischen Test zur Charakterisierung ausgewählter Spezies nach Hersteller-Angaben verwendet. Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte auf Biolog Universal Anaerobe (BUA)-Agar für 3-5 Tage anaerob bei 37 °C. Die Inokulation der Testplatte erfolgte nach Hersteller-Angaben und wurde im Anschluss für 48 h anaerob bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell, sowie mit dem Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise™ bei 595 nm. Getestet wurde jeweils in biologischen Duplikaten. Als positiv gewertet wurden Reaktionen, die in beiden Versuchsdurchgängen einen eindeutigen Farbumschlag zeigten.

Wachstumsversuche

Zur Bestimmung des Wachstums auf verschiedenen C-Quellen (Tab. 7) erfolgte die Kultivierung in 10 ml GS2 mit i.d.R. 0,5% (w/v) C-Quelle für ein bis maximal 14 Tage bei der optimalen Wachstumstemperatur. Unlösliche C-Quellen (Cellulose, Stärke, Pectin, Xylan) wurden vor dem Autoklavieren abgewogen und dem Medium zugegeben. Getestet wurde in biologischen Duplikaten oder Triplikaten, welche stark verdünnt (1:50 oder 1:100) aus einer gut bewachsenen Vorkultur

angezogen wurden. Wachstum wurde in zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen optisch durch die dichtere Trübung im Vergleich zu einer unbeimpften Mediums-Kontrolle sowie vermehrter Gasbildung beurteilt. Bewachsene Kulturen wurden hinsichtlich der Stärke des Wachstums (OD_{600} oder Bestimmung der Gesamt-Zellproteinmenge nach Bradford (1976)) und Compton und Jones (1985) bewertet und zur Verifizierung erneut bei gleichen Bedingungen überimpft. Weiterführende Analysen erfolgten je nach Organismus mit der 1. oder 2. Überimpfung.

Quantifizierung verbleibender C-Quellen

Die Quantifizierung verbleibenden Substrates nach der Kultivierung ausgewählter Isolate erfolgte einerseits über die Quantifizierung reduzierender Enden löslicher C-Quellen oder dem Anthron-Assay nach Dische (1962) zur Quantifizierung von verbliebenem Cellulosepulver nach saurer Hydrolyse.

- DNSA-Assay

Die Quantifizierung löslicher C-Quellen (z.B. Glucose, Xylose oder Cellobiose) im Kulturüberstand erfolgte über die Quantifizierung reduzierender Ende mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure nach Miller (1959) in Modifikation nach Koeck et al. (2015b). Zu 50 μ l Kulturüberstand in entsprechenden Verdünnungen wurde 75 μ l DNSA-Lösung gegeben und der Reaktionsansatz für 5 min bei 95 °C im PCR Thermocycler gekocht. Im Anschluss wurde die OD bei 540 nm (Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise™, Tecan Group Ltd.) von 100 μ l Reaktionsansatz gemessen. Die Quantifizierung erfolgte einerseits anhand eines externen Standards der gleichen C-Quellen im linearen Konzentrationsbereich, sowie relativ von einer bewachsenen Kultur zu einer nicht beimpften Mediums-Kontrolle. (Rettenmaier et al. 2020c)

- Anthron-Assay

Die Etablierung und Durchführung des Anthron-Assays erfolgte im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Schneider (2019) am Lehrstuhl für Mikrobiologie. Bestimmt wurde die cellulolytische Aktivität über die Quantifizierung des verbleibenden Substrates. Hierzu wurde das verbleibende Cellulose-Pulver MN301, aus 2-4 ml Kultur oder Mediums-Kontrolle abzentrifugiert, gewaschen (2mal mit 1 ml MQ) und getrocknet (1 ml EtOH, 50 °C), mit 175 μ l Schwefelsäure (72% v/v) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) zu Furfural und Hydroxymethylfurfural, welche mit dem Anthron-Reagenz in einer Farbstoffbildung reagieren (Dische 1962), hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit MQ auf 1 ml Reaktionsvolumen aufgefüllt und 30 min bei 100 °C gekocht. Gemessen wurde die Absorption bei 620 nm (Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise™) von 100 μ l Probe mit 200 μ l eiskaltem Anthron-Reagenz (0,2% w/v in 96% v/v H_2SO_4) nach Inkubation (30 min, 80 °C im Wasserbad). Quantifiziert wurde anhand eines Glucose-Standards im Bereich 0,02-0,2 mg/ml. (Rettenmaier et al. 2020c)

Im Anschluss konnte die cellulolytische Aktivität einer Kultur im Vergleich zur unbeimpften Mediums-Kontrolle wie folgt berechnet werden:

$$\text{cellulolytische Aktivität (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{Glukose Mediums-Kontrolle}}}{C_{\text{Glukose Kultur}}} \right) \cdot 100$$

Formel 1: Berechnung cellulolytischer Aktivität nach Anthron-Assay nach Rettenmaier et al. (2020c).

- Dünnschicht-Chromatographie

Die Überprüfung der Verwertung der von den Isolaten genutzten C-Quellen erfolgte über Dünnschichtchromatographie (DC). Aufgetragen wurde 1 µl Kulturüberstand bewachsener Kulturen, 1 µl einer Mediums-Kontrolle (0,5% w/v C-Quelle in GS2 Medium), sowie eine Zuckerlösung (0,1-0,25% w/v) als Standard auf eine Kieselgelplatte (Kieselgelplatten TLC Silica gel 60, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Als Laufmittel wurde Acetonitril:H₂O (80:20, v/v) oder eine Gemisch aus Ethanol, n-Butanol und H₂O (5:4:1; v/v/v) verwendet. Die Färbung jeder Platte wurde mithilfe des Reagenzsprühgeräts ChromaJet DS 20 mit 4 ml DC-Färbelösung (Tab. 13), welche im Verhältnis 1:10 mit 85%-iger Phosphorsäure (H₃PO₄) versetzt wurde, durchgeführt. Durch einen anschließenden Hitzeschritt wurden die Platten für ca. 5 min auf einer Heizplatte bei 200 °C entwickelt.

2.6.5 Bestimmung flüchtiger Metabolite via Gaschromatographie

Zur Bestimmung freigesetzter Metabolite in Kulturüberstand-Proben wurde Gaschromatographie (GC) wie in Koeck et al. (2015b) beschrieben (GC-2010) angewandt oder am Gaschromatograph Nexis GC-2030 mit einer 30 m Stabilwax®-Säule (Durchmesser 0,25 mm und 0,25 µm Filmdicke) und 1 µl Injektionsvolumen der Probe bei einer Injektionstemperatur von 250 °C und einem Split von 1:10 durchgeführt. Die Überstände wurden zur Probenaufbereitung aufgetaut, erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 20 min, RT, Zentrifuge Biofuge Pico) und in ein neues Mikroreaktions-gefäß transferiert. Gemessen wurde in einem 500 µl Ansatz in den Verdünnungen 1:2-1:10 mit 0,05% (w/v) 1-Propanol als internen Standard in MQ (pH 2, eingestellt mit konzentrierter HCl). Zur Bestimmung der Art und Konzentration der im Probenüberstand befindlichen freien Metabolite wurde ein externer Standardmix aus jeweils 0,5% (w/v) Ethanol, Butanol, 2-Propanol, Propionsäure, Methanol, Isobutanol, Essigsäure, Buttersäure und Aceton eingesetzt. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 42-50 °C für 4 min, 50–240 °C für 7 min, 240 °C für 1 min, Flammenionisationsdetektor bei 260 °C. Die Quantifizierung der identifizierten Bestandteile erfolgte nach Abzug der Messwerte der Negativproben (unbeimpftes Medium). Zudem wurden lediglich Konzentrationen über 0,01% (w/v) gewertet.

2.6.6 Bestimmung von zellulären Fettsäuren und der Peptidoglykanstruktur

Die Bestimmung bakterieller Fettsäureprofile, welches für vergleichende Charakterisierungen verschiedener Spezies bei gleichen Kultivierungsbedingungen entscheidend ist (Tindall et al. 2010), erfolgte durch die DSMZ, Braunschweig, Deutschland aus 15 mg gefriergetrockneter Zellmasse. Hierzu wurde aus 0,5-1 l einer bakteriellen Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase und optimalen Wachstumsbedingungen das Zellpellet über Zentrifugation (4.800 rpm, 8 °C, 10 min, Zentrifuge Rotina 420R) und zweimaligem Waschen mit 0,9% (w/v) NaCl hergestellt und zunächst bei -80 °C eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgte am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der TU München offen in einer Gefriertrocknungsanlage (Labconco Corporation) über Nacht. Die Arbeiten bei DSMZ Braunschweig, Deutschland beinhalteten die Umwandlung der zellulären Fettsäuren zu Fettsäuremethylester (FAME, engl.: *fatty acid methyl ester*) über Verseifung und Methylierung nach Kuyenkendall et al. (1988) und Miller (1982) sowie anschließender Analyse über GC. Auf Basis des *Sherlock Microbial Identification Systems* (MIDI) erfolgte ein Datenbankabgleich des detektierten Fettsäuremusters. Der kalkulierte *Similarity Index* gibt die Ähnlichkeit des Fettsäuremusters des Testorganismus zu einem Organismus der Datenbank mit 1,000 für eine 100%-ige Übereinstimmung zu einem bekannten Organismus an (http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Similarity_Index.pdf, Stand August 2020).

Die Bestimmung der Peptidoglykanstruktur, welche vor allem für die Beschreibung neuer Genera Gram-positiver Bakterien wichtig ist (Tindall et al. 2010), erfolgte aus 3-4 g feuchter Zellmasse resuspendiert in Isopropanol:MQ (1:1, v/v) über GC/MS durch die DSMZ, Braunschweig, Deutschland nach Schumann (2011). Das Zellpellet wurde aus 0,5-1 l einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase und optimalen Wachstumsbedingungen über Zentrifugation (9.000G, 8 °C, 15 min) und zweimaligem Waschen mit 0,9% (w/v) NaCl hergestellt.

2.7 Proteinbiochemische Arbeiten zur Charakterisierung ausgewählter Isolate

2.7.1 Fällung und Renaturierung von Überstand-Proteinen

Die jeweiligen Kulturen wurden zentrifugiert (20 min, 4 °C, 4.500g) und der Kulturüberstand erneut zentrifugiert. Die gesättigte Ammoniumsulfat Lösung wurde bei 4 °C unter Rühren, tröpfchenweise zu dem Kulturüberstand bis zu einer Endkonzentration von 60% (v/v) zugegeben. Die Lösung wurden über Nacht bei 4 °C weitergerührt und am Folgetag zentrifugiert (30 min, 4 °C, 4.500g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml 1x MOPS, pH 6,5 (Tab. 11) mit 60% (v/v) gesättigter Ammoniumsulfatlösung resuspendiert.

Zur Renaturierung der Proteine wurden je 4 ml der Ammoniumsulfat-Suspension zentrifugiert (15 min, 4 °C, 20.800g), der Überstand verworfen und das Proteinpellet in 100 µl 1x MOPS, pH 6,5 (Tab. 11) resuspendiert. Zur Renaturierung der Proteine wurden die Lösungen vor Gebrauch über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch am BioSpektrometer® fluorescence (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.7.2 SDS-PAGE

Zur Analyse sekretierter Proteine ausgewählter Kulturen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Hierfür wurden Kulturüberstände (15 µl Überstand) mit 5 µl 4x Auftragspuffer (Tab. 14) gemischt und 5-15 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte pro Gel (Tab. 15) bei 15 mA für 1,5 bis 1,75 h in Laufpuffer (Tab. 16) mit 10 µl Probe und 4 µl Längenstandards Page Ruler prestained. Die Färbung des Gels erfolgte über 0,05% (v/v) Coomassie-Brilliantblau G-250, 10% (v/v) Essigsäure und 25% (v/v) Ethanol schwenkend für 30 min bei RT. Die Entfärbung erfolgte mit 10%-iger wässriger Essigsäure (v/v) ebenfalls schwenkend bei RT für 30 min. Danach wurden die Gele gescannt und ausgewertet.

2.7.3 Analyse von sekretierten Proteinen via Massenspektroskopie

Massenspektrometrische Analysen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Christina Ludwig am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS), TU München, Freising, Deutschland durchgeführt. Vorbereitende Arbeiten, wie die Anzucht der Kulturen, erfolgten am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München, Freising, Deutschland.

Probenherstellung

Die Anzucht erfolgte in biologischen Triplikaten in 10 ml GS2-Medium (Tab. 18) oder GS2_CAA-Medium (Tab. 20). Nach 7 Tagen, wurde 2 ml Kultur abzentrifugiert (30 min, 5.000 rpm, 8 °C), der Überstand in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 8 °C). Aliquots mit 15 µl Überstand und 15 µl SDS-Probenpuffer (4x-konzentriert; Tab. 14) wurden für 15 min bei 95 °C inkubiert und direkt analysiert oder bei -20 °C gelagert.

LC-MS/MS

Die Arbeiten am BayBioMS beinhalteten eine in-Gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gel, 3 min Einlaufzeit) Reduzierung (50 mM DTT), Alkylierung (10 mM Chloracetamid) und einen Trypsin Verdau (Trypsin-Gold, Promega) nach Shevchenko et al. (2006). Die Tandem Massenspektrometrie mit vorgeschalteter Flüssigchromatografie (LC-MS/MS) erfolgte mit 5 µl Peptidprobe nach Trocknung der Probe und Aufnahme in 20 µl Ameisensäure (0,1% w/v). Nach *nano electrospray ionization* erfolgte die massenspektrophotometrische Detektion im Modus *Data-dependend-aquisition* und positiven Ionisierungsmodus. Die detektierten Oligopeptide wurden mittels MaxQuant (Version 1.6.3.4) und dessen Suchmaschine Andromeda (Cox et al. 2011; Tyanova et al. 2016) basierend auf den automatisch annotierten Proteinsequenzen des zu analysierenden Organismus mit Trypsin als proteolytischen Enzym ohne *match-between-run* identifiziert und quantifiziert.

2.8 Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1 Primer

Zur Amplifikation von Zielgenen wurden in dieser Arbeit folgende Primer verwendet (Tab. 27). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch Eurofins Genomics MWG, Ebersberg, Deutschland.

Zur Anwendung in der Hochdurchsatz-Sequenzierung von PCR-Produkten (16S rRNA Gene oder GH48 Gene; siehe 2.9.2) wurden folgende Adapter-Sequenzen angefügt: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTA-TAAGAGACAG (Forward) bzw. GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG (Reverse).

Tab. 27: Verwendete Primer.

ID	Sequenz	Zielgen / Anwendung	Referenz
616F	AGAGTTTGATYMTGGCTC	Bakterielle 16S rRNA	Juretschko et al. (1998)
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC		
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Bakterielle 16S rRNA, V3-V4	Klindworth et al. (2013)
785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
F919mod	GAATTGACGGGGRYCCGCACAAG	Bakterielle 16S rRNA, V6-V8	Lebuhn et al. (2014a) modifiziert nach Rudi et al. (1997)
R1378mod	CGGTGTGTACAAGRCCCGRAACG		Lebuhn et al. (2014a) modifiziert nach Costa et al. (2006)
Cel48_490F1	T[I]ATGGTTGAAGCTCCDGAYTAYGG	Bakterielle GH48	Rettenmaier et al. (2020b) modifiziert nach Pereyra et al. (2010)
Cel48_920R1	CCAAA[I]CCRTACCAGTTRTCAACRTC		
Cel48-Mix2F	16 verschiedene Forward-Primer; siehe Tab. A 1	Bakterielle GH48	Rettenmaier et al. (2020b)
Cel48-Mix2R	9 verschiedene Reverse-Primer; siehe Tab. A 1		
S4MN4 N1	CCTGAAGCTTTTCATCAGAATA	Genom MD1 Contig 1	
S4MN4 N1c	CCCATGTCGAGAGTTTATAA		
S4MN4 N2	CCCTCAGGAGTTCATAAA	Genom MD1 Contig 2	
S4MN4 N2c	GGAGTACTTCTCTATCCAATA		
MD1_End_F2 (EF2)	CCAGATTCTTCAGAACGCAG	Genom MD1 Verbindung Contig 2 zu 1	Eigene Arbeit in Zusammenarbeit mit Luca Di Bello (Bachelorarbeit)
MD1_End_R2 (ER2)	TTCTCCATCTATCTTAAGGCAC		
MD1_Start_F1 (SF1)	GATCCAATTCTTGGACCGGAG	Genom MD1 Verbindung Contig 1 zu 2	
MD1_Start_R2 (SR2)	GTTCTATGGTTTTCCAGCCCC		
16S_MD1	AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGG	Sanger-Sequenzierung 16S rRNA PCR MD1	Eigene Arbeit
F_MA18_16S	ATGTCGTAGCCCTTCGGGG	Spezifischer Nachweis der 16S rRNA von <i>Ruminiclostridium herbifermentans</i> MA18 ^T	Schmidt (2019)
R_MA18_16S	CCACTTTACAGCTTTGCTTCTCATTG		
F_MA8_HeI4	TGCAATTGAATGGGAGCCAGG	Spezifischer Nachweis eines GH16 Gens von <i>Clostridium sartagoforme</i>	Schmidt (2019)
R_MA8_HeI4	CTTGATCAAATGGCGCTGGAAAAG		

Degenerative Positionen sind entsprechend der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) Kodierung (International Union of Pure and Applied Chemistry 2009) angegeben: D, AGT; H, ACT; N, ATGC; R, AG; V, ACG; Y, CT. I, Deoxy-Inosin.

2.8.2 Extraktion von Nucleinsäuren

Ergebnisse aus der metagenomischen und metatranskriptomischen Analyse sind stark abhängig von der Nucleinsäure-Isolierung, da die Extraktionsmethode, sowie nachfolgende Verfahren zur Amplifikation, zu einer Verzerrung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft führen kann (Sjöling S., Stafford W., Cowan D. A. 2006; Miao et al. 2014; Stagnati et al. 2017). Neben einer guten Ausbeute, spielt auch die Qualität der Nucleinsäuren eine wichtige Rolle. Neben der Molekülgröße, welche über eine Agarosegelelektrophorese oder, bei RNA, über den RIN Wert (*RNA Integrity Number*, RIN) bestimmt werden kann, wird auch die Verunreinigung mit Proteinen (A_{260}/A_{280}) oder Pufferbestandteilen wie Ethanol oder anderen Lösungsmitteln (A_{260}/A_{230}) berücksichtigt.

Extraktion von Nucleinsäuren aus Fermenterproben (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München)

Nucleinsäuren aus Fermenterproben wurden in dieser Arbeit entweder aus GR oder gewaschenen IS Proben (2.5.1 Probennahme aus Biogas Fermentern) extrahiert. Hierzu wurde das Kit EURx GeneMATRIX DNA+RNA+Protein (Roboklon, Berlin, Deutschland) mit Abänderungen im Schritt der Zell-Lyse verwendet. Die entsprechende Methode wurde von Bernhard Munk (Landesamt für Landwirtschaft, Freising, Deutschland) entwickelt und ist in gemeinsamen Publikationen im Detail beschrieben (Rettenmaier et al. 2020c; Rettenmaier et al. 2020b). Zusammengefasst wird die Zell-Lyse von ca. 300 mg Probe mit 300 µl ROTI-Phenol (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) in einem Lyse-Gefäß (2 ml) mit der Lyse-Matrix E (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland), *bead-beating* (2×20 s bei 5 m/s) und anschließender Zentrifugation (10 min, 10,000×g bei RT) durchgeführt. Klarer Überstand (100 µ) wird mit 200 µL Lyse ALL und 300 µL DRP auf die DNA-Binde-Säule gegeben und weiterführend nach Hersteller-Angaben (Roboklon, Berlin, Deutschland) mit den bereitgestellten Puffer-Lösungen gereinigt. DNA wurde in 40 µL Elutions-Puffer, RNA in 40 µL RNase-freiem Wasser (beides Roboklon, Berlin, Deutschland) eluiert. Ausbeute und Reinheit der Extrakte wurde am BioSpektrometer® fluorescence (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

Extraktion von Nucleinsäuren aus Fermenterproben (AQU, LfL)

Des Weiteren wurde für Hochdurchsatz-Sequenzierungen im Verbundprojekt Modisto aus ausgewählten Fermenterproben DNA und RNA am LfL, Abteilung AQU, Bernhard Munk, extrahiert. Hierfür wurde die DNA und RNA jeweils nach spezifischen Protokollen extrahiert.

- DNA-Extraktion nach Griffiths et al. (2000)

Die DNA-Extraktion basiert auf einem Protokoll nach Griffiths et al. (2000). Die in RNAlater stabilisierten Proben wurden 2mal mit je 1 ml KCl-Lösung (0,85% w/v) gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Das gewaschene Pellet wurde in ein Lyse-Gefäß (2 ml) mit der Lyse-Matrix E (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) mit 200 µl Extraktionspuffer (60 °C) und 200 µl

Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1 v/v) überführt und nach 5 s bei 6 m/s *bead-beaten* für 5 min auf Eis gekühlt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (10 min; 15.000g, 4 °C) in ein steriles Eppendorf-Tube überführt und der Lyse-Schritt mit dem Zellpellet erneut wiederholt. Zum Schluss wurde 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1 v/v) dem Pellet zugegeben und 10 min geschwenkt, und auch dieser Überstand nach erneuter Zentrifugation mit den Überständen aus Zentrifugation 1 und 2 zusammengeführt. Dieser Überstand wird 2mal mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v; Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) gewaschen und zentrifugiert. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte aus der wässrigen Phase mit doppeltem Volumen Präzipitationspuffer für 2 h bei 4 °C. Nach Zentrifugation (30 min; 18.000g, 4 °C) wurde 2mal mit eiskalten Ethanol (70% v/v) gewaschen und das Pellet bei RT getrocknet. Zur Hydratisierung in 50 µl DNase- und RNase-freiem H₂O wurde das Pellet 5 min bei 65 °C schüttelnd erhitzt und im Anschluss auf Eis gestellt.

Zur Gewinnung von RNA-freier DNA wurde im Anschluss an die Extraktion ein RNase-A Verdau durchgeführt. Dieser erfolgte durch Zugabe von 10 µl RNase A zu 200 µl Probe und anschließender Inkubation für 60 min bei 37 °C. Die erneute Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 20 µl Na-Acetat (3 M) und 200 µl Isopropanol (100%), Schwenken für 2 min bei RT und Zentrifugation (20 min; 18.000g, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde mit 700 µl eiskalten Ethanol (70% v/v) gewaschen, bei RT getrocknet und in 150 µl DNase- und RNase-freiem H₂O mit erneutem Hitzeschritt (5 min bei 65 °C) gelöst. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

- RNA-Extraktion mit Trizol

Die in RNAlater-stabilisierten Proben wurden 2mal mit je 1 ml KCl-Lösung (0,85% w/v) gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Das gewaschene Pellet wurde in ein Lyse-Gefäß (2 ml) mit der Lyse-Matrix E mit 500 µl Trizol transferiert. Es folgte 2mal 10 s bei 6 m/s *bead-beaten* (Fast Prep 24 Bead Beater) und anschließende Zentrifugation (10 min; 12.000g, 4 °C). Im Anschluss folgte eine kurze Inkubation (2-3 min) bei RT und Zentrifugation (15 min; 12.000g, 4 °C). Der Überstand wurde jeweils in ein steriles Eppendorf-Tube zusammengeführt und 500 µl Isopropanol zugegeben. Es folgten 10 min bei RT und Zentrifugation (10 min; 12.000g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml eiskalten Ethanol (70% v/v) gewaschen, zentrifugiert (5 min; 7.500g, 4 °C) und in 50 µl RNase-freiem H₂O mit einem Hitzeschritt (10 min bei 55 °C) gelöst und danach auf Eis gekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Zur Gewinnung von DNA-freier RNA wurde ein DNase-Verdau mit Turbo DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Zusätzlich wurden PCR-Inhibitoren über das OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, Freiburg Deutschland) nach Hersteller-Angaben entfernt.

- Extraktion von Nukleinsäuren aus bakteriellen Kulturen

Die Extraktion von gDNA aus bakteriellen Kulturen erfolgte einerseits mit Hilfe des Monarch® Genomic DNA Purification Kits (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) oder des DNA Soil Kits (Roboklon, Berlin, Deutschland) jeweils aus einem Zellpellet aus 2 ml Flüssigkultur, zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm) und resuspendiert in 100 µl 1x PBS Puffer (Tab. 8). Die Zell-Lyse für die Extraktion mit DNA Soil Kit erfolgte mechanisch in einem Lyse-Gefäß (2 ml) mit der Lyse-Matrix E, *bead-beating* (2×20 s bei 5 m/s) und anschließender Zentrifugation (10 min, 10.000×g bei RT). Die Zell-Lyse für die Extraktion mit Monarch® Genomic DNA Purification Kit erfolgte enzymatisch durch die Zugabe von 5 µl Lysozym (100 mg/ml) und 20 min Inkubation bei 37 °C. Die weiteren Schritte wurden jeweils nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Des Weiteren wurden Zellpellets aus 1 ml bakterieller Flüssigkultur in 600 µl RNAlater an das ZIEL, Core Facility Microbiome, TU München, Freising übergeben, um weiterführend 16S rRNA Amplikonsequenzierungen durchzuführen (2.9.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung von PCR-Produkten). Dazu wurde am ZIEL, Core Facility Microbiome, TU München, Freising zunächst folgende gDNA Extraktion durchgeführt: Zu den homogenisierten Proben wurden 250 µl 4 M Guanidiniumthiocyanat, 500 µl 5%-iges (w/v) Lauroylsarcosin Natriumsalz gegeben und 60 min bei 37 °C im schüttelnd (700 rpm) inkubiert. Die Zell-Lyse erfolgte mechanisch über *beat-beating* mit Hilfe von 500 mg Glasperlen (3x6,5 m/s für 40 s; FastPrep von MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland). Nach Behandlung mit 15 mg Polyvinylpyrrolidon, Vortexen und Zentrifugation (15.000g, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand mit RNase (finale Konzentration 10 mg/ml) 20-50 min bei 37 °C schüttelnd (700 rpm) inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Die Konzentration und Reinheit wurde am NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

Für die Hochdurchsatz-Sequenzierung bakterieller Genome (siehe „2.9.3 Hochdurchsatz-Sequenzierung von gDNA aus Reinkulturen“) wurde aus bakteriellen Kulturen hochmolekulare gDNA über zwei verschiedene Methoden extrahiert. Einerseits wurde Kit-basiert mit dem MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Hilde, Deutschland) aus 2-10 ml bakterieller Kultur nach Herstellerangaben extrahiert. Andererseits wurde aus größeren Mengen bakterieller Kulturen (50-100 ml) nach Rettenmaier et al. (2020c) basierend auf einer enzymatischen Zell-Lyse und nachfolgendem Ausschütteln der DNA über Choroform/Isoamylalkohol (Roti®-C/I) extrahiert.

2.8.3 Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Zur Amplifikation von genspezifischer cDNA aus RNA wurde eine reverse Transkription (RT) mit dem *Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthesis* Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) nach Herstellervorgaben durchgeführt. Hierzu wurde zunächst RNA aus drei Extraktionen (technische

Replikate) volumengleich gepoolt und verbliebene DNA mit dem DNA-free Turbo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangabe verdaut. Im Anschluss wurden je 5 µl RNA Probe für die RT mit Enzym bzw. MQ als Negativkontrolle verwendet. Die RNA Probe wurde zunächst mit Mastermix 1 (Tab. 28) 5 min bei 65 °C und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 7 µl Mastermix 2 (Tab. 28) zugegeben und die RT für 1 h bei 45 °C gefolgt von 15 min bei 70 °C im Thermocycler durchgeführt. Als Primer wurden R1378mod (16S rRNA Gene, V6-V8) und cel48_930RI oder cel48-Mix2R (GH48 Gene) verwendet (Tab. 27).

Tab. 28: Reaktionsansatz der RT.

Mastermix 1	
Nukleasefreies H ₂ O	9,5 µl
Reverse-Primer (100 pmol/µl)	0,5-1 µl
Mastermix 2	
dNTPs (je 10 µM)	2 µl
DTT	2 µl
Reverse Transkriptase / H ₂ O	1 µl
RT-Affinity Script Buffer	2 µl

2.8.4 Amplifikation von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden je nach Zielgen zwei verschiedene DNA-Polymerasen eingesetzt. Als Template wurde 2 µl gDNA in Konzentrationen zwischen 2-20 ng/µl oder genspezifische cDNA eingesetzt.

Die Amplifikation bakterieller 16S rRNA Genen (16S-rRNA-PCR) erfolgte durch die Phusion DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Der Ansatz und das Temperaturprofil wurden nach Herstellervorgaben entwickelt und sind in Tab. 29 und Tab. 30 zusammengefasst.

Tab. 29: 25 µl Ansatz der 16S-rRNA-PCR.

Phusion	0,25 µl
dNTPs (je 10 µM)	0,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Template (2-20 ng/µl)	2 µl
Puffer 5xHF	5 µl
MQ	14,75 µl

Tab. 30: Temperaturprofil der 16S-rRNA-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	30 s	30
98 °C	20 s	
57 °C	20 s	
72 °C	45 s	
72 °C	2 min	

Die Amplifikation bakterieller GH48 Gene (GH48-PCR) erfolgte über die Platinum *Taq* DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und folgendem Temperaturprofil (Tab. 31). Der PCR Ansatz (Tab. 32) wurde nach Herstellervorgaben entwickelt und in dieser Arbeit laufend optimiert.

Tab. 31: Temperaturprofil der GH48-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	30 s	26-30
98 °C	20 s	
60 °C	20 s	
72 °C	20 s	
72 °C	2 min	

Tab. 32: 25 µl Ansatz der GH48-PCR.

Platinum <i>Taq</i>	0,25 µl
dNTPs (je 10 µM)	0,5 µl
Forward-Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse-Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
Template (2,5-25 ng/µl)	2 µl
10xPuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
MQ	15,75 µl

2.8.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung von gDNA oder einzelner, gezielt über PCR amplifizierter DNA-Abschnitte wurde eine Agarosegelelektrophorese mit 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Tab. 9) durchgeführt. Das analytische Gel wurde mit 4 µl Probe, gemischt mit 1 µl Auftragspuffer (Gel Loading Dye Purple), beladen. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (3 µl GeneRuler 1 kb bzw. 1 kb Plus) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 40 min bei 100 V am EPS600. Zur anschließenden Visualisierung wurde für 10 min in 0,1% (v/v) Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und das Gel unter UV-Licht am Alphamager MINI analysiert.

2.8.6 Quantifizierung von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion

Die Quantifizierung von GH48 oder 16S rRNA Genen in DNA oder cDNA erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Die qPCR wurde nach den Temperaturprofilen in Tab. 33 und Tab. 34 am PCR-Cycler MxPro (Agilent Technologies) am LfL durchgeführt. Eingesetzt wurden 2-3 µl Template in einem 25 µl Ansatz (Tab. 35). Quantifiziert wurde anhand eines externen Standards und dem Fluoreszenz-Farbstoff EvaGreen® (Jena Bioscience). Zur Quantifizierung von GH48 Genen wurde linearisierte Plasmid-DNA pET24c:*cel48S* mit 50 ng/µl gDNA von *E. coli* als Hintergrund verwendet und die GH48-Genkopienzahl anhand der eingesetzten Menge an Plasmid-DNA berechnet. Zur Quantifizierung von 16S rRNA Genen

wurde thermisch lysierte *E.coli* K13 Suspension verwendet und die 16S rRNA-Genkopienzahl anhand der *most probable number* Methode abgeschätzt.

Tab. 33: Temperaturprofil der GH48-qPCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	10 min	
95 °C	20 s	40
60 °C	20 s	
72 °C	20 s	
83 °C +F	10 s	
95 °C +F	60 s	
55 °C +F	30 s	
95 °C +F	20s	

+F, Fluoreszenz-Messung nach diesem Schritt

Tab. 34: Temperaturprofil der 16S-qPCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	45
70 °C	1 min	
84 °C +F	10 s	
95 °C +F	60 s	
55 °C +F	30 s	
95 °C +F	20s	

+F, Fluoreszenz-Messung nach diesem Schritt

Tab. 35: qPCR Ansatz

Platinum <i>Taq</i>	0,2 µl
dNTPs (je 10 µM)	0,5 µl
Forward-Primer (10-100 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse-Primer (10-100 pmol/µl)	0,5 µl
Template (2,5-25 /µl)	2-3 µl
10xPuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
EvaGreen	0,25-1 µl
MQ /DEPC-H ₂ O	add to 25 µl

DEPC, Diethylpyrocarbonat

2.9 DNA Sequenzierung und Assemblierung

2.9.1 Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung nach Sanger, oder auch Didesoxymethode oder Kettenabbruchmethode genannt, ist eine etablierte, kostengünstige Methode zur Sequenzierung von dsDNA und ssDNA und wurde bereits im Jahr 1977 von Frederick Sanger und Kollegen entwickelt (Sanger et al. 1977). Die zu sequenzierende DNA wird zu diesem Zweck in einen Vektor kloniert und mittels einer DNA-Polymerase, vier verschiedenen Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten und des geeigneten Primers

repliziert und über die Bestimmung der jeweils zuletzt eingefügten Base sequenziert (Tipu und Shabbir 2015).

Zur Analyse der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten wurde in dieser Arbeit die PCR mit einem PCR-Clean up Kits (QIAquick PCR Purification Mini-Elute, Qiagen, Hilden, Deutschland oder NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Machery Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt und in MQ eluiert. Im Anschluss wurde die Konzentration, sowie die Reinheit (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) am BioSpektrometer® fluorescence bestimmt. Die DNA-Sequenzierung nach Sanger erfolgte entweder bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) aus insgesamt 15 µl PCR Produkt mit einer Konzentration von 10 ng/µl, oder bei GeneWiz (Leipzig, Deutschland) aus 5 µl PCR Produkt mit einer Konzentration von 10-50 ng/µl. Zur Sequenzierung wurde einer der Primer, welcher zur Amplifikation der Ziel-DNA diente, zu dem gereinigten PCR-Produkt wie folgt zugegeben: 2 µl Primer mit 10 pmol/µl (Eurofins Genomics) oder 5 µl Primer mit 5 pmol/µl (GeneWiz). Die Auswertung und Assemblierung der Sequenzier-Chromatogramme erfolgte mit Chromas v2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia).

2.9.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgte mittels Illumina MiSeq Technologie, welche innerhalb der Illumina-Sequenzier-Technologien eine hohe Read-Länge (PE300) erreichen kann (Besser et al. 2018).

16S rRNA Amplikonsequenzierung

16S rRNA Amplikonsequenzierungen erfolgten am ZIEL, Core Facility Microbiome, TU München, Freising, Deutschland aus DNA und cDNA (2.8.3 Reverse Transkription von RNA zu cDNA) nach standardisierten Methoden (Lagkourdos et al. 2015). Amplikon-Bibliotheken der V3-V4 Region der bakteriellen 16S rRNA Gene werden über PCR [25 Zyklen; Primer 431F und 785R (Klindworth et al. 2013)] aus 24 ng DNA erstellt und über AMPure XP (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte nach einer zweiten PCR nach Berry et al. (2011) im *paired-end* Modus (PE275) an einer MiSeq-Anlage nach Herstellerangaben. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der IMNGS (engl. *Integrated Microbial Next Generation Sequencing*) Plattform bzw. dem NGS Toolkit Version 3.3., welche vom ZIEL, Core Facility Mikrobiom bereitgestellt wurden. (Reitmeier et al. 2020b; Reitmeier et al. 2020a)

- IMNGS.org

Diese Auswertungs-Pipeline wurde an der TU München von Lagkourdos et al. (2016) gezielt als einfach zugängliche Pipeline für die Analyse prokaryotischer 16S rRNA Amplikonsequenzierungen entwickelt. Die Pipeline umfasst ein Assembly der *paired reads* und *quality filtering*, sowie *length*, *chimeras* & *redundancing filtering*, auch *demultiplexing* genannt. Im Anschluss erfolgt eine

taxonomische Klassifizierung. In dieser Arbeit wurden dazu folgende Software einer UPARSE (Edgar 2013) basierten Pipeline kombiniert: *Demultiplexing* erfolgte mit *demultiplexor_v3.pl* (nicht publiziertes Perl script); *Pairing, quality filtering* und *OTU clustering* mit 97% Identität über USEARCH Version 8.0 (Edgar 2010); Filtern von Chimären via UCHIME (RDP Set 15 als Referenz) (Edgar et al. 2011); taxonomische Klassifizierung mit RDP classifier version 2.11 training set 15 (Wang et al. 2007); Sequenz-Alignment mit MUSCLE (Edgar 2004); *treeing* via Fasttree (Price et al. 2010). Zusätzlich zur standardisierten Pipeline wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Die Anzahl an erlaubten *mismatches* der Barcodes, 2; minimaler Fastq-Qualitäts-Score zum Trimmen ungepaarte Reads, 3; Länge einzelner Reads oder Amplikone für gepaarte, überlappende Sequenzen, 350-600 bp; Trimmen (*forward* und *reverse*), 10 bp; minimale relative Abundanz von OTUs, 0,0001-0,0025.

- NGS-Toolkit Version 3.3

Diese Auswertungs-Pipeline generiert über USEARCH v11 (Edgar 2016) aus demultiplexed Fastq-Daten zOTUs (zero-radius OTUs) basierend auf 97% Sequenzübereinstimmung. Analysiert wurden Reads mit folgenden Parametern: Die Anzahl an erlaubten *mismatches* der Barcodes, 1; minimaler Fastq-Qualitäts-Score zum Trimmen ungepaarte Reads, 20; Länge einzelner Reads oder Amplikone für gepaarte, überlappende Sequenzen, 300-600 bp; Trimmen (*forward* und *reverse*), 5 bp; minimale relative Abundanz von zOTUs, 0,0025. Die taxonomische Klassifizierung erfolgt über die SILVA Datenbank (Quast et al. 2012). (Reitmeier et al. 2020b)

GH48 Amplikonsequenzierung nach Rettenmaier et al. (2020b)

GH48 Amplikonsequenzierungen erfolgte die Aufreinigung der 1. PCR (siehe „2.8.4 Amplifikation von Zielgenen über Polymerasekettenreaktion“) über AMPure XP (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) am ZIEL, Core Facility Microbiome, TU München, Freising, Deutschland. Im Anschluss erfolgte die Bibliothek-Herstellung und Sequenzierung analog zu 16S rRNA Amplikonen.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit einer spezifisch angepassten, UPARSE-basierten (Edgar 2013) Pipeline, welche in Kooperation von Ilias Lagkourdos, ZIEL-Core Facility Microbiome, TU München, Freising, Deutschland entwickelt wurde. Diese Pipeline umfasste ein *demultiplexing* über *demultiplexor_v3.pl*; *pairing, filtering & OTU clustering* basierend auf 94% Sequenz-Identität über USEARCH 8.0 (Edgar 2010) und eine taxonomische Zuordnung über die eigens entwickelte GH48 Referenzdatenbank (siehe „2.10.2 Verwendete Datenbanken“).

Die Auswertung der Rohdaten über IMNGS.org (16S) oder der GH48-Pipeline (GH48) ermöglichte im Anschluss eine statistische Auswertung via RHEA (Lagkourdos et al. 2017) in R (<https://www.r-project.org/>).

2.9.3 Hochdurchsatz-Sequenzierung von gDNA aus Reinkulturen

Genomsequenzierung mittels Illumina HiSeq 2500 Technologie ermöglicht bei einem hohen Durchsatz (10-1.000 Gb) auch eine hohe Genauigkeit der Sequenzierung (Besser et al. 2018). Die Sequenzierung erfolgte am ZIEL-Core Facility Microbiome, TU München, Freising, Deutschland aus 1 µg gDNA einer Reinkultur. Die DNA-Bibliothek wurde über TruSeq DNA PCR-free sample preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) erstellt und ein Protokoll zur Optimierung der DNA-Scherung und Fragment-Längen-Selektion angewandt (Huptas et al. 2016). Die Sequenzierung nach Herstellerangaben am Illumina HiSeq 2500 erzeugte etwa 3,2 Millionen Reads im PE150 Modus. Die Assemblierung der Rohdaten erfolgte mit Unicycler v4.6 (Wick et al. 2017) oder SPAdes v3.11.1 (Bankevich et al. 2012).

Genomsequenzierung mittels PacBio RSII Technologie ermöglicht Read-Längen von bis zu 60 kbp und durchschnittlich 10 kbp (Besser et al. 2018). Die PacBio-Sequenzierung aus gDNA einer bakteriellen Reinkultur erfolgte bei Novogene, UK aus hochmolekularer DNA (Fragmentgrößen \geq 20 kbp). Die Assemblierung der Rohdaten nach einem Schritt zur Qualitäts-Filterung der Reads erfolgte mit SMRT portal v3.2.0 (<https://www.pacb.com/support/software-downloads/>).

2.10 Bioinformatik

2.10.1 Verwendete Software

In dieser Arbeit wurden Rohdaten mit folgender Software und, wenn nicht anders angegeben, mit Standard-Einstellungen analysiert (Tab. 36).

Tab. 36: Software.

Software	Hersteller
Chromas v2.6.6	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia
dbCAN2	http://bcb.unl.edu/dbCAN2/ ; Zhang et al. (2018a)
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Albuquerque, NM, USA
Galaxy	https://usegalaxy.eu/ oder https://usegalaxy.org/ ; Afgan et al. (2018)
Graph Pad Prism 7	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/ ;
IMNGS	https://www.imngs.org/ ; Lagkouvardos et al. (2016)
MEGA7	https://www.megasoftware.net/ ; (Kumar et al. 2016)
NGS-Toolkit v3.3	Reitmeier et al. (2020b)
R	https://www.r-project.org/
RHEA	https://github.com/Lagkouvardos/Rhea ; Lagkouvardos et al. (2017)
Signal P Version 5	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ ; Almagro Armenteros et al. (2019)
SMRT portal v3.2.0	https://www.pacb.com/support/software-downloads/
SPAdes v3.11.2 oder v3.13.0	https://github.com/ablab/spades/releases ; (Bankevich et al. 2012)
UBCG v3	https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg ; Na et al. (2018)
Unicycler v4.6	Wick et al. (2017)

2.10.2 Verwendete Datenbanken

In dieser Arbeit wurden Rohdaten mit folgender Datenbanken analysiert (Tab. 37).

Tab. 37: Datenbanken.

Datenbank	URL	Anwendung	Referenz
CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database)	http://www.cazy.org/	Allgemeine Recherche zur Vorhersagen von Enzymaktivitäten nach dbCAN2 Annotation	Lombard et al. (2014)
EZbiocloud	https://www.ezbiocloud.net/	Identifikation bakterieller Isolate basierend auf 16S rRNA Gensequenzen	Yoon et al. (2017)
GH48	eigene Arbeit	Identifikation bakterieller GH48 Amplikonsequenzen	Rettenmaier et al. (2020b)
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	https://www.genome.jp/kegg/	Vorhersagen von Stoffwechselwegen nach automatischer Protein-Annotation bakterieller Genomsequenzen	Ogata et al. (1999)
Micorbial Genome Atlas (MiGA) – Biogas microbiome	http://microbial-genomes.org/	Identifikation bakterieller Isolate basierend auf Genomsequenzen in andere Biogasanlagen	Campanaro et al. (2020)
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Allgemeine Recherche; Vergleichende Analysen von Nukleotid- (BLASTN) und Proteinsequenzen (BLASTP)	NCBI Resource Coordinators (2018)
UniProt	https://www.uniprot.org/	Analyse von Proteinsequenzen	UniProt Consortium 2019
SILVA	https://www.arb-silva.de/	Identifikation bakterieller Isolate basierend auf 16S rRNA Amplikon-Gensequenzen	Quast et al. (2012)

2.10.3 Funktionelle Auswertung bakterieller Genomsequenzen

Die funktionelle Auswertung bakterieller Genomsequenzen erfolgte über eingehende Analysen der automatisch annotierten Proteinsequenzen. Diese automatische Annotation erfolgte entweder über die *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) von NCBI (Haft et al. 2018; Tatusova et al. 2016) oder eine *Prokaryotic genome annotation* (PROKKA; Galaxy Version 1.14.5+galaxy0) Annotation via <https://usegalaxy.eu/>.

Weiterführend wurden die annotierten Proteinsequenzen hinsichtlich der metabolischen Bedeutung analysiert. Hierzu erfolgte einerseits die Annotation von Stoffwechselwegen mittels KEGG (Tab. 37) mit KEGG mapping über die Algorithmen BlastKOALA (Kanehisa et al. 2016) oder KofamKOALA (Aramaki et al. 2020), sowie die automatische Vorhersage von *Carbohydrate-active enzymes* (CAZymes) mittels dbCAN2 (Tab. 37). Gewertet wurden CAZymes, welche mit beiden Algorithmen, HMMER (Finn et al. 2011) zur Annotation von CAZyme Modulen, sowie Diamond (Buchfink et al. 2015) für BLAST Hits in CAZy.org, vorhergesagt wurden. Zudem erfolgte die Vorhersage von Signalpeptiden via SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011). Zusätzlich erfolgte die Vorhersage von CAZymes speziell für das Isolat N2K1^T auch in Kooperation mit Dr. Vincent Lombard, CNRS - Aix-Marseille Université, AFMB UMR 7257 Case 932, AFMB, Marseille, Frankreich, und <http://www.cazy.org/> (*Carbohydrate Active Enzymes database*; (Lombard et al. 2014)).

Die gezielte Analyse einzelner Protein-Sequenzen erfolgte via BLASTP (protein-protein BLAST) und Abgleich mit der NCBI Datenbank Non-redundant protein sequences), sowie Signal P Version 5 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Almagro Armenteros et al. (2019)).

2.10.4 Berechnung phylogenetischer Distanzen

Berechnung phylogenetische Distanzen basierend auf 16S rRNA Gensequenzen

Die phylogenetische Einordnung neuartiger Isolate erfolgte über 16S rRNA Gensequenzanalysen. Hierzu wurden über EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) die 30 nächstverwandten Organismen, welche valide veröffentlicht sind, ausgewählt und die 16S rRNA Gensequenz heruntergeladen (NCBI Datenbank). Das Alignment in MEGA7 (Kumar et al. 2016) erfolgte mit MUSCLE (Edgar 2004). Die Berechnung der phylogenetischen Distanzen erfolgte in MEGA7 durch die *Maximum Likelihood* Methode (Felsenstein 1981) mit 1.000 Wiederholungen zu statistischen Validierung (Felsenstein 1985).

Berechnung phylogenetische Distanzen basierend auf Genomsequenzen

Die Berechnung phylogenetischer Distanzen basierend auf bakteriellen Genomsequenzen erfolgte über die UBCG-Pipeline Version 3 (UBCG, engl.: *up-to-date bacterial core genes*) von EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg>). Die Pipeline von Na et al. (2018) basiert auf dem multiplen Alignment von 92 Genen, welche aus 1.492 Spezies zusammengefasst wurden, und nachfolgend der Berechnung von 92 phylogenetischen Bäumen. Aus diesen 92 Bäumen wird ein Consensus-Baum erstellt.

Die Auswahl der Referenzgenome erfolgte in dieser Arbeit über den Abgleich der 16S rRNA Gensequenz mit der EZBioCloud-Datenbank. Die Genomsequenzen der nächstverwandten Organismen (bis maximal 90% 16S rRNA Identität) wurden von der NCBI Datenbank bezogen.

Zusätzlich wurden Genomsequenzen hinsichtlich der Average Nucleotide Identity (ANI) über <http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/> (Richter et al. 2016) über den ANIb Algorithmus analysiert. ANI-Werte geben neben 16S rRNA Gensequenz-Identitäten Aufschluss über die Taxonomie eines Organismus. Der Grenzwert für die Identifikation auf Spezies-Ebene nach Tindall et al. (2010) ist 95% Genomsequenzübereinstimmung.

Neben ANI ist auch die Analyse der Proteinsequenzen entscheidend für die taxonomische Einordnung. Eine Möglichkeit hierzu ist die Berechnung der *Percentage Of Conserved Proteins* (POCP) nach Qin et al. (2014) mit einem vorgeschlagene Grenzwert für die Identifikation auf Genus-Ebene von 50%.

Ergebnisse

3.1 Identifizierung, Anreicherung und Isolierung von (cellulolytischen) Leitorganismen aus Biogasfermentern

3.1.1 Analyse der bakteriellen Diversität zur Bewertung der Kultivierungsmethoden

Um die in dieser Arbeit angewandten Kultivierungsmethoden zu bewerten, wurde zunächst eine Analyse der mikrobiellen Diversität in den Anreicherungskulturen mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, variable Regionen V3-V4, mit anschließender Isolierung und Identifizierung einzelner Organismen durchgeführt. Hierzu wurden mikrobiologische Proben aus dem thermophilen Fermenterbetrieb in 2018 verwendet. Verglichen wurde einerseits die Entnahme von frischem GR und andererseits die Voranreicherung cellulolytischer Mikroorganismen direkt im Fermenter über die IS Methode (2.5.1 Probennahme aus Biogas Fermentern). Zudem erfolgte die Anreicherung und Isolierung in drei verschiedenen Medien, GS2, GS2.5GR und GR20 (2.3 Verwendete Medien). Die Ergebnisse wurden im Detail in *Systematics and Applied Microbiology* publiziert (Rettenmaier et al. 2019a). Für diese Arbeit relevante Ergebnisse aus dieser Publikation werden hier nochmals aufgeführt.

Die Diversität innerhalb einer Anreicherungskultur (α -Diversität) lag für Sequenzen mit einer relativen Abundanz $\geq 0,001$, jeweils gemittelt über biologische Triplikate, zwischen 34 OTUs für die Anreicherung aus GR in GR20 und 71 OTUs für die Anreicherung aus IS in GS2.5GR (Tab. 38). Darüber hinaus sind auch Veränderungen der einzelnen getesteten Bedingungen (β -Diversität) entscheidend. Hierzu konnten signifikante Unterschiede je nach verwendetem Medium ($p = 0,004$) oder Anreicherungsmethode ($p = 0,002$) beobachtet werden. Darüber hinaus war der Anteil an bis dato nicht kultivierten Organismen unterschiedlich, der u.a. für die Isolierung neuartiger cellulolytischer Organismen entscheidend ist. Die taxonomische Einordnung der einzelnen OTUs deutete auf einen großen Anteil nicht identifizierte Genera hin (11,9-45,3%; Tab. 39). In den Proben GR20-GR, GR20-IS und GS2-IS konnte sogar ein hoher Anteil an OTUs nicht einmal auf Familien-Ebene eingeordnet werden (21,5%, 18,5% und 44,4%; Tab. 39). (Rettenmaier et al. 2019a)

Tab. 38: α -Diversität aller Anreicherungskulturen nach Rettenmaier et al. (2019a), Tab. 1.

Medium	Inokulum	r	Mittelwert (r)	e	Mittelwert (e)
GR20	GR1	34		0,35	
	GR2	27	34	0,11	0,27
	GR3	42		0,36	
GS2.5GR	GR1	40		0,35	
	GR2	45	42	0,30	0,33
	GR3	41		0,32	
GS2	GR1	53		0,40	
	GR2	47	48	0,39	0,37
	GR3	45		0,34	
GR20	IS1	30		0,33	
	IS2	29	36	0,22	0,22
	IS3	48		0,12	
GS2.5GR	IS1	65		0,32	
	IS2	72	71	0,36	0,34
	IS3	75		0,34	
GS2	IS1	63		0,36	
	IS2	56	56	0,34	0,31
	IS3	49		0,25	

Richness (r): Anzahl detektierter OTUs in einer Probe. *Evenness* (e): Verteilung einzelner OTUs in einer Probe. Mittelwerte wurden für biologischen Triplikate bestimmt.

Tab. 39: Durchschnittliche relative Abundanz unbekannter Familien oder Genera nach Rettenmaier et al. (2019a), Tab. 2.

Medium	Inokulum	Familien	Genera
GR20	GR	21,5%	33,6%
GS2.5GR	GR	5,4%	11,9%
GS2	GR	6,8%	18,2%
GR20	IS	18,5%	20,7%
GS2.5GR	IS	7,9%	19,2%
GS2	IS	44,4%	45,3%

3.1.2 Analyse der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit verschiedener Fermenterzustände

Bakterielle Diversität und deren transkriptionelle Aktivität in Biogasfermentern mit verschiedenen Prozessbedingungen

In DNA und RNA, isoliert durch Bernhard Munk, LfL-AQU, aus dem mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieb zu verschiedenen Probenahme-Zeitpunkten (siehe dazu Tab. A 14), konnten mit NGS-Toolkit Version 3.3 insgesamt 264 verschiedene zOTUs basierend auf 97% Sequenzübereinstimmung und einer relativen Abundanz $\geq 0,0025$ detektiert werden. Hierbei ist die Diversität in DNA der Proben aus dem mesophil-stabilen Fermenterbetrieb (MS) mit einer *Richness* von 183-197 zOTUs am höchsten (Tab. 40). Die *Richness* ist wie erwartet bei mesophilen Prozessbedingungen, stabil (MS) oder instabil (MI), signifikant höher ($p = 0,002$) als bei thermophil

stabilen (TS) oder instabilen (TI) Bedingungen. Der Anteil unbekannter Taxa nach Klassifizierung mit der SILVA Datenbank auf Genus-Ebene lag im Mittel über alle Probe bei 81,3% +/- 3% und verdeutlicht die noch immer geltende Theorie der „Black Box Biogas Microbioms“.

Tab. 40: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung in DNA des mesophilen und thermophilen Fermenterbetriebes.

Probe	Richness	Evenness	Anteil unbekannter Genera [%]	Anteil bekannter Genera [%]
MS-PN2	196	0,58	78,08	21,92
MS-PN14-1	197	0,57	79,35	20,65
MS-PN14-2	183	0,57	80,63	19,37
MI-PN2	148	0,57	73,48	26,52
MI-PN19-1	154	0,56	84,72	15,28
MI-PN19-2	145	0,58	83,05	16,95
TS-PN2	130	0,55	82,60	17,40
TS-PN8-1	141	0,51	84,29	15,71
TS-PN8-2	138	0,52	82,19	17,81
TI-PN2	115	0,54	82,47	17,53
TI-PN8-9-1	119	0,54	81,74	18,26
TI-PN8-9-2	118	0,54	82,51	17,49

Die DNA Extraktion, sowie die Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL-AQU.

Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouravdos et al. 2017) in R.

Zusätzlich erfolgte ein beidseitiger T-Test unter Annahme gleicher Varianz in Excel 2016 mesophil vs. thermophil: $p = 0,002$.

M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

Im Detail wurde 13 verschiedene bakterielle Phyla und, trotz gezielter Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA, ein archaelles Phylum in sehr geringer Abundanz (*Euryarchaeota*) detektiert (Abb. 8). Die relative Abundanz dieser variierte innerhalb der Replikate (1 und 2) zu einem Fermenterbetrieb kaum. Ebenfalls wurden kaum Unterschiede zwischen zwei Probenahme-Zeitpunkten (PN) festgestellt. 16S rRNA Sequenzen des Phylums *Firmicutes* dominierten vor allem im thermophilen Fermenterbetrieb mit im Mittel 83% im stabilen Betrieb und im Mittel 75% im instabilen Betrieb. Für den mesophilen Fermenterbetrieb ist der relative Anteil dieses Phylums nur bei 46% für den stabilen Betrieb und 23% im instabilen Betrieb. Stattdessen sind im mesophilen Fermenterbetrieb auch 16S rRNA Sequenzen des Phylums *Bacteroidetes* mit im Mittel 35% für den stabilen Betrieb und 44% im instabilen Betrieb stark abundant, während diese Phylum im thermophilen Fermenterbetrieb nur mit geringer Abundanz von im Mittel 6% detektiert wurde. Deutlich zu beobachten war auch, dass die mikrobielle Gemeinschaft des thermophilen Fermenterbetriebes unabhängig von der Prozessstabilität konstant blieb. Im Gegensatz dazu war eine deutliche Veränderung beim mesophilen Fermenterbetrieb von MS zu MI zu beobachten.

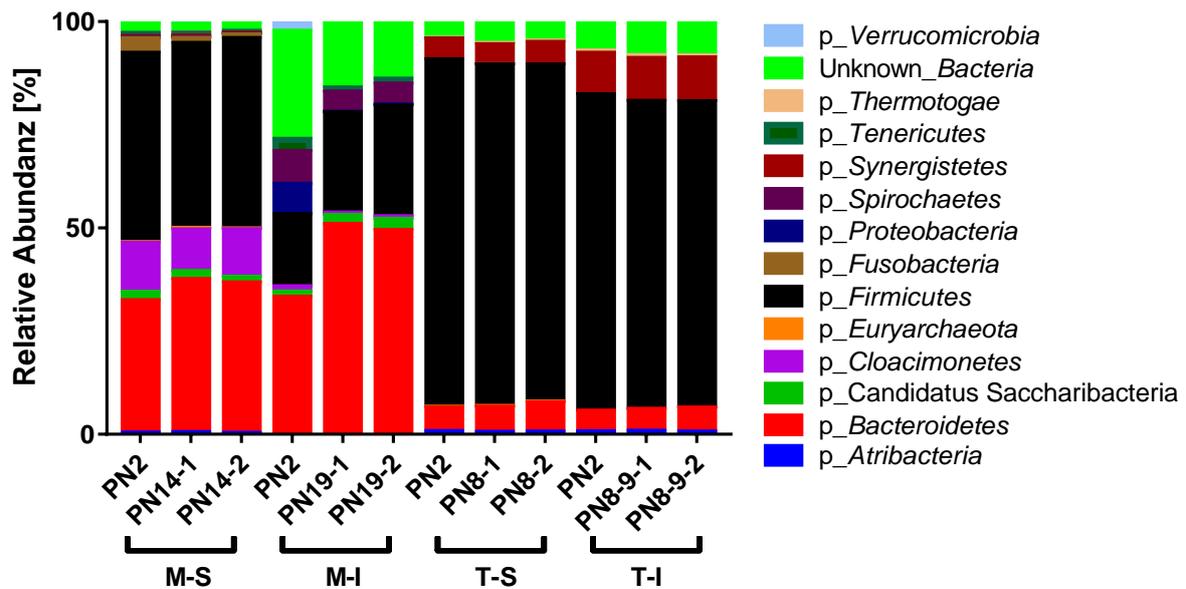


Abb. 8: Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA. Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Roh-Daten sind unter PRJNA682319 öffentlich zugänglich. M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

In RNA wurde im mesophilen Prozess im Vergleich zum thermophilen Prozess wiederum mit statistischer Signifikanz eine diversere mikrobielle Gemeinschaft detektiert ($p = 0,0001$). Im Mittel betrug die *Richness* 175 oder 154 zOTUs für MS oder MI und 128 bzw. 132 für TS oder TI (Tab. 41). Der Anteil unbekannter Genera lag ähnlich zu den Beobachtungen mit DNA bei 80% +/- 6%. Die aktive bakterielle Gemeinschaft, sichtbar in RNA, variierte in der Regel zwischen den einzelnen PN kaum. Nur für MI wurde eine deutliche Abnahme von Vertretern des Phylums *Verrucomicrobia* von PN3 zu PN19-1 und -2 beobachtet. (Abb. 9), welche im Gegenzug mit einer Zunahme der relativen Abundanz anderer Phyla wie z.B. *Bacteroidetes* korrelierte. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit DNA war das Auftreten und die relative Abundanz mit RNA vergleichbar.

Nur für einzelne Phyla wurde eine höhere relative transkriptionelle Aktivität detektiert. 16S rRNA Amplikonsequenzen des Phylum *Thermotogae* wurde in RNA des thermophil-instabilen Prozesses mit im Mittel 10,45% detektiert, während diese in DNA nur 0,58% im Mittel für den gleichen Fermenterbetrieb betrug. Im Gegensatz dazu war die transkriptionelle Aktivität unbekannter Bakterien (*Unknown_Bacteria*) in TS und TI geringer als deren relative Abundanz in DNA.

Tab. 41: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung mit RNA isoliert aus den mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieben.

Probe	Richness	Evenness	Anteil unbekannter Genera [%]	Anteil bekannter Genera [%]
MS-PN3	179	0,53	86,11	13,89
MS-PN14-1	172	0,55	85,92	14,08
MS-PN14-2	175	0,56	81,98	18,02
MI-PN3	152	0,53	84,66	15,34
MI-PN19-1	157	0,56	86,91	13,09
MI-PN19-2	154	0,56	85,31	14,69
TS-PN3	139	0,52	75,55	24,45
TS-PN8-1	119	0,53	75,77	24,23
TS-PN8-2	126	0,53	80,49	19,51
TI-PN3	132	0,52	73,07	26,93
TI-PN8-9-1	131	0,52	71,65	28,35
TI-PN8-9-2	132	0,51	71,80	28,20

Die RNA Extraktion, sowie RT und Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL.

Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R.

Zusätzlich wurde ein beidseitiger T-Test unter Annahme gleicher Varianz in Excel 2016 mesophil vs. thermophil durchgeführt: $p = 0,0001$.

M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

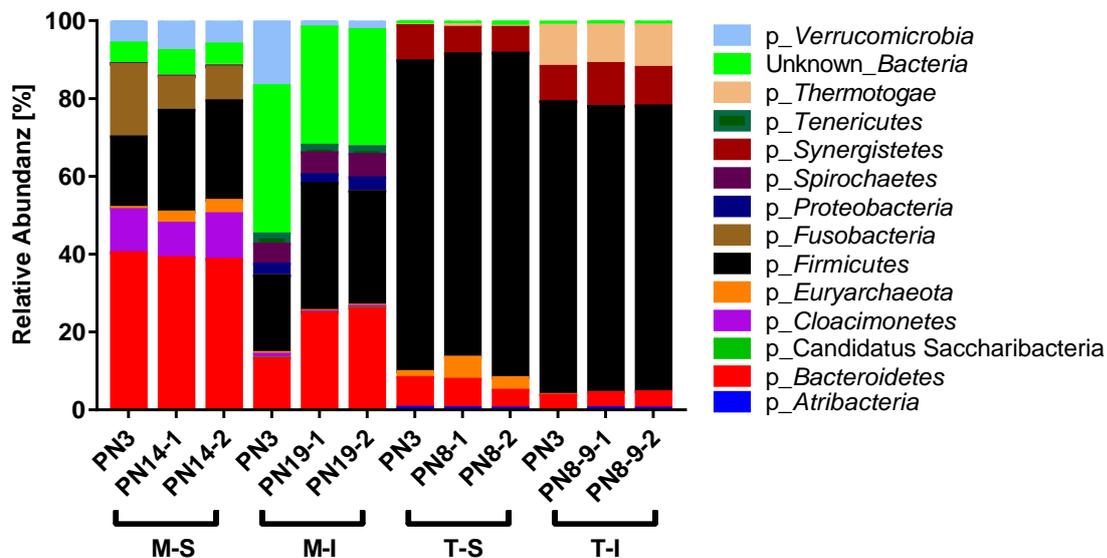


Abb. 9: Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit RNA. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Roh-Daten sind unter PRJNA682384 öffentlich zugänglich. M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

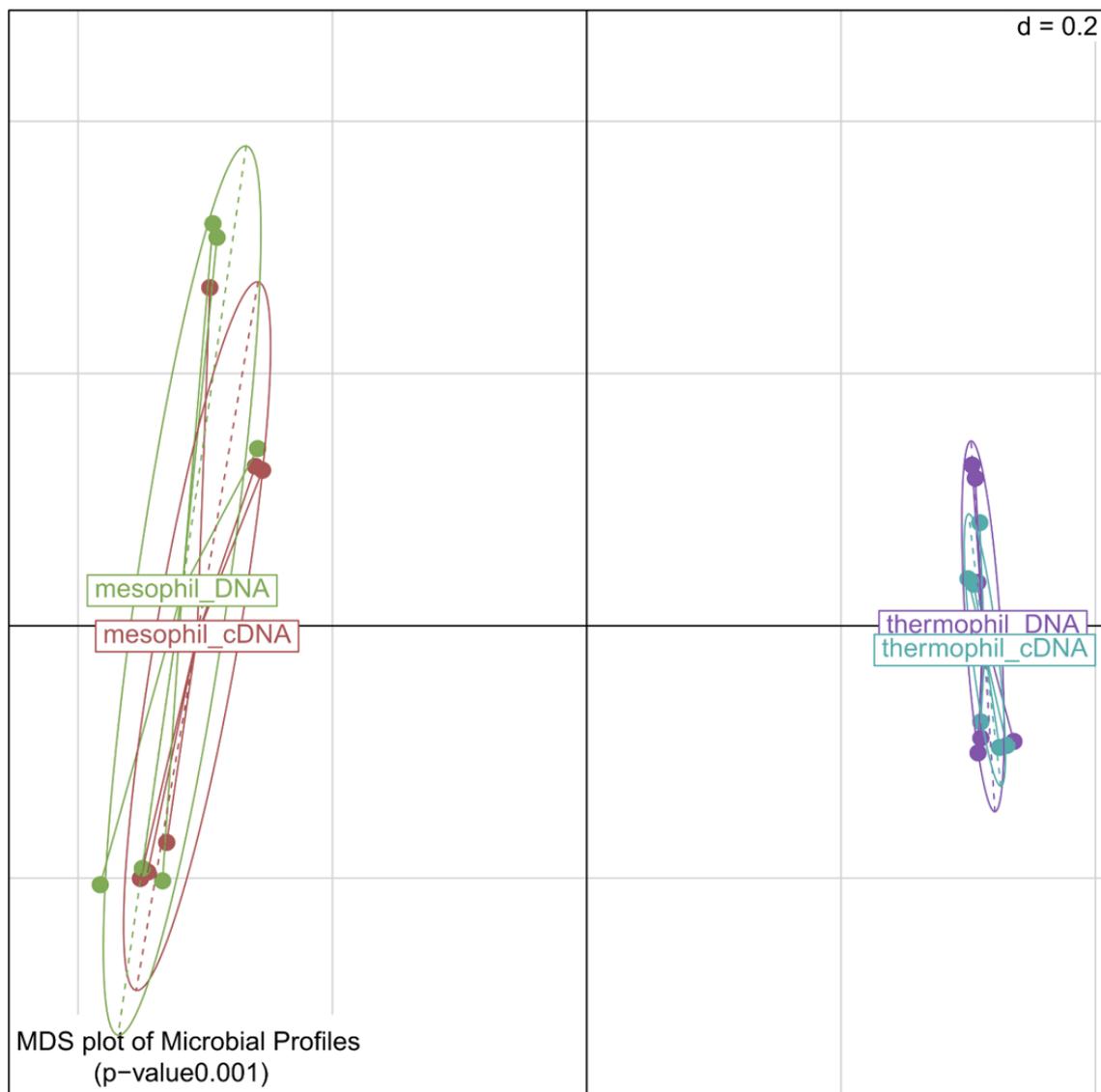


Abb. 10: Multidimensional-Scaling (MDS) der β -Diversitäts-Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung, identifiziert mittels 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA und RNA (cDNA) isoliert aus den mesophilen oder thermophilen Fermenterbetrieben. Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte über Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Roh-Daten sind unter PRJNA682319 (DNA) und PRJNA682384 (cDNA) öffentlich zugänglich.

β -Diversitäts-Analysen bestätigen die vorab beschriebenen Beobachtungen. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,001$) zwischen der mikrobiellen Gemeinschaft abhängig von der Prozesstemperatur beobachtet (Abb. 10). Zudem ist eine deutliche Korrelation zwischen detektierten Taxa in DNA und deren transkriptionelle Aktivität zu beobachten. Ein *de novo clustering* der 16S rRNA Amplikonsequenzierung bestätigte dies. Basierend auf einem Clustering in vier Gruppen wurden jeweils alle Proben, DNA und RNA, eines Fermenterbetriebes zusammengefügt (Abb. A 1; $p = 0,001$). Zudem waren die Unterschiede zwischen MS zu MI deutlich höher als zwischen TS und TI.

Bakterielle Diversität in cellulolytischen Anreicherungskulturen aus Biogasfermenterproben

Die Anreicherung und Isolierung cellulolytischer Mikroorganismen erfolgte wie in Rettenmaier et al. (2019a) beschrieben (siehe auch „3.1.1 Analyse der bakteriellen Diversität zur Bewertung der Kultivierungsmethoden“) im Rahmen der Masterarbeit von Schmidt (2019) zu mehreren Zeitpunkten des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes (MS1, MS2, MS3), sowie jeweils einmal zu MI, TS und TI (Tab. A 13). Hierbei konnten die statistisch signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft im Fermenterbetrieb abhängig von der Temperatur auch für die Anreicherungskulturen bei 37 °C (mesophil) oder 55 °C (thermophil) bestätigt werden ($p=0,001$; (Schmidt 2019)). Die Roh-Daten der 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung sind unter den Identifikationsnummern PRJNA674617 (mesophil) und PRJNA674481 (thermophil) öffentlich zugänglich.

Im Weiteren werden die Ergebnisse der Anreicherungen der stabilen Prozesse (MS3 und TS) nach Schmidt (2019) für zOTUs mit relativer Abundanz $\geq 0,0025$ dargestellt.

- Diversität in mesophilen cellulolytischen Anreicherungskulturen

In mesophilen cellulolytischen Anreicherungskulturen wurden insgesamt 300 zOTUs basierend auf 97% Sequenzübereinstimmung und einer relativen Abundanz $\geq 0,0025$ detektiert. Im Mittel lag die *Richness* bei 133 mit einer *Evenness* von 0,51 (Tab. 42). Der Anteil unbekannter Genera lag zwischen 16 bis 86% (Mittelwert 40%). Starke Abweichungen zwischen den Replikaten I und II wurden hier vor allem für Kulturen angereichert in GR20 Medium oder angereichert aus GR beobachtet.

Tab. 42: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung von DNA isoliert aus Anreicherungskulturen des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes.

Inokulum	Medium	Replikat	Richness	Evenness	Anteil unbekannter Genera [%]	Anteil bekannter Genera [%]
GR	GR20	I	119	0,53	53,91	46,09
		II	124	0,46	85,16	14,84
	GS2.5GR	I	133	0,45	16,39	83,61
		II	93	0,53	60,50	39,50
	GS2	I	100	0,56	21,28	78,72
		II	99	0,55	35,87	64,13
IS	GR20	I	121	0,45	85,98	14,02
		II	137	0,48	16,28	83,72
	GS2.5GR	I	199	0,54	28,34	71,66
		II	150	0,47	28,14	71,86
	GS2	I	169	0,57	28,30	71,70
		II	147	0,57	18,17	81,83

Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouravdos et al. 2017) in R.

GR, Gärrest; IS; *in sacco*

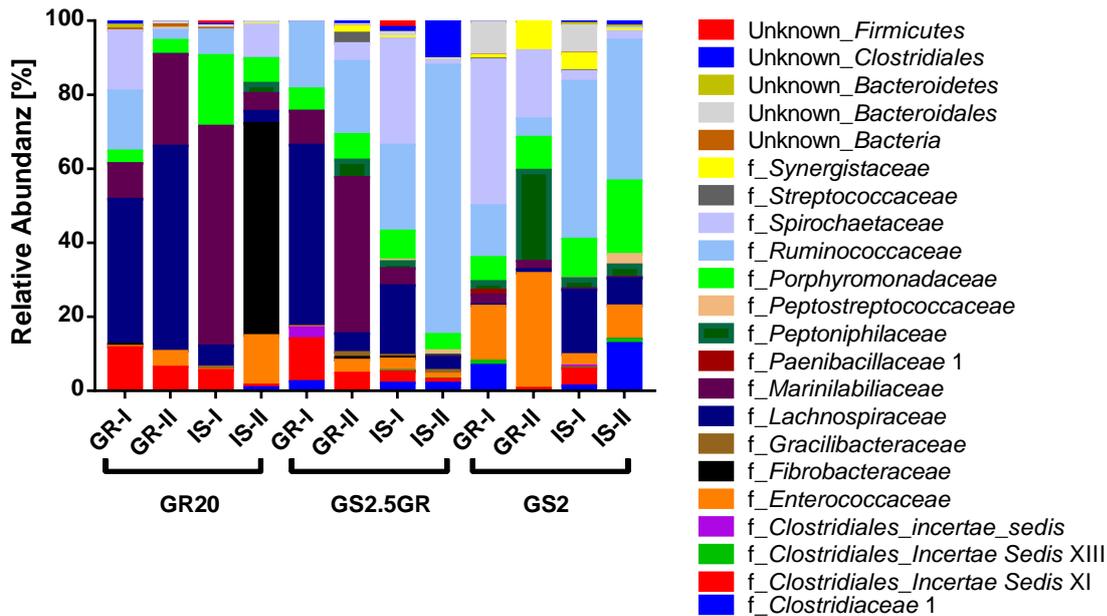


Abb. 11: Relative Abundanz einzelner Familien, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus cellulolytischer Anreicherungskulturen des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes MS3. Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Roh-Daten sind unter PRJNA674617 öffentlich zugänglich. GR, Gärrest; IS, *in sacco*.

Die detaillierte Analyse der angereicherten Taxa verdeutlicht die Variabilität in den mikrobiellen Gemeinschaften. Innerhalb der einzelnen biologischen Duplikate I und II wurden starke Unterschiede detektiert (Abb. 11). Dennoch wurde eine Tendenz abhängig von Inokulations-Probe, GR oder IS, bzw. dem verwendeten Medium beobachtet. In Kulturen angereichert mit GR in GR20 oder GS2.5GR konnten in hoher Abundanz unter anderem zOTUs der Familie *Lachnospiraceae* detektiert werden [39%, 55% oder 18% in GR-I und -II (GR20) bzw. GR-II (GS2.5GR)]. Zudem sind zOTUs der Familie *Marinilabiliaceae* vor allem in Anreicherungen mit GR20 oder GS2.5GR Medium detektiert worden (22,1+/-19,7% für GR20 und GS2.5GR; 1,5+/-1% in GS2). Eine starke Abweichung ist für die Anreicherung IS-II (GR20) zu beobachten. Hier wurde im Gegensatz zu allen anderen Proben zOTUs der Familie *Fibrobacteraceae* mit hoher relativer Abundanz (57,3%) detektiert.

- Diversität in thermophilen Anreicherungskulturen

In thermophilen Anreicherungskulturen wurden insgesamt 196 zOTUs basierend auf 97% Sequenzübereinstimmung und einer relativen Abundanz $\geq 0,0025$ detektiert. Im Mittel lag die *Richness* bei 93 mit einer *Evenness* von 0,49 (Tab. 43). Der Anteil unbekannter Genera lag zwischen 13 und 88% (Mittelwert 58%). Starke Abweichungen zwischen den Replikaten I und II wurden hierzu vor allem für Kulturen angereichert in GR20 oder GS2.5GR Medium beobachtet.

Tab. 43: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Anreicherungskulturen des thermophil-stabilen Fermenterbetriebes.

Inokulum	Medium	Replikat	Richness	Evenness	Anteil unbekannter Genera [%]	Anteil bekannter Genera [%]
GR	GR20	I	61	0,59	15,93	84,07
		II	92	0,59	62,25	37,75
	GS2.5GR	I	111	0,41	81,74	18,26
		II	110	0,58	12,85	87,15
	GS2	I	92	0,53	72,04	27,96
		II	103	0,43	73,43	26,57
IS	GR20	I	67	0,41	87,60	12,40
		II	76	0,41	29,02	70,98
	GS2.5GR	I	124	0,55	44,62	55,38
		II	63	0,44	74,06	25,94
	GS2	I	108	0,49	65,42	34,58
		II	103	0,49	75,92	24,08

Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkourdos et al. 2017) in R.

GR, Gärrest; IS, *in sacco*.

Die geringere Diversität in thermophilen Kulturen erlaubte die Analyse der zOTUs auf Genus-Ebene (Abb. 12). Die Anreicherung in GS2 Medium, sowohl mit GR als auch IS, resultierte in einer signifikant höheren relativen Abundanz von zOTUs der Familie *Ruminococcaceae* ($p = 0,0002$; beidseitiger heterosketastischer T-Test in Excel 2016). Im Gegenzug dominierten in GR20 oder GS2.5GR Medium zOTUs der Klasse *Clostridiales* (im Mittel 40% relative Abundanz für GR20 und GS2.5GR) oder zOTUs des Genus *Clostridium* Cluster III, welche vor allem eine hohe relative Abundanz bei der Anreicherung aus GR erreichten (GR-I und –II (GR20), 26% und 21%; GR-II (GS2.5GR), 45%).

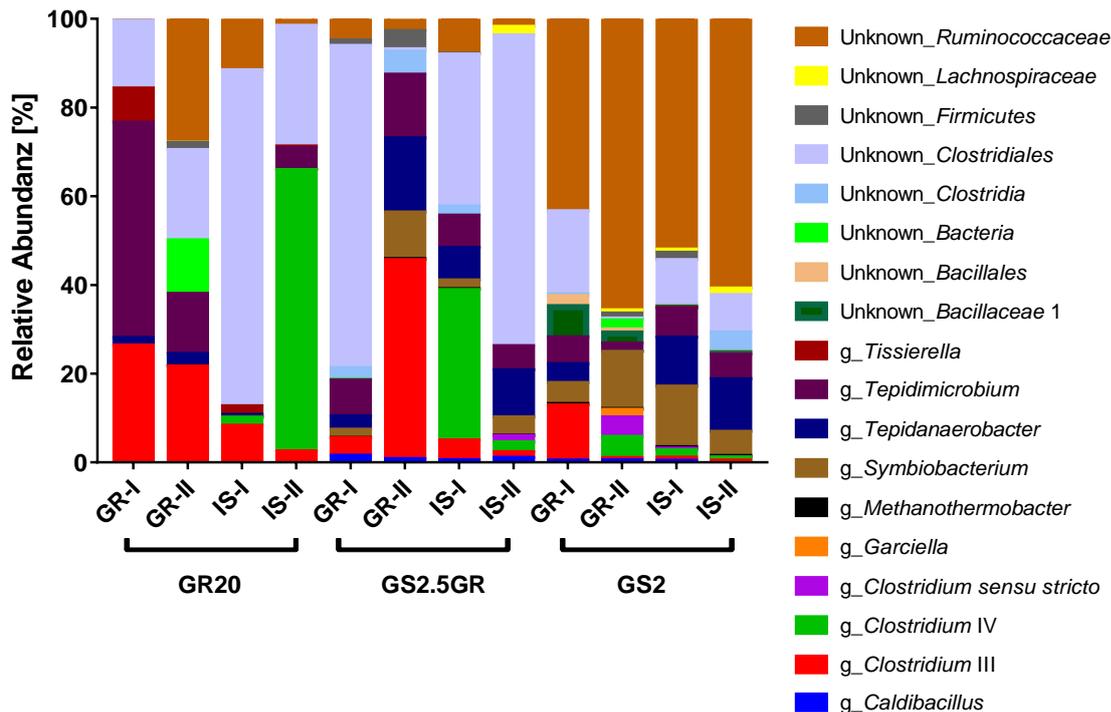


Abb. 12: Relative Abundanz einzelner Genera, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus cellulolytischen Anreicherungskulturen des thermophil-stabilen Fermenterbetriebes TS. Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Roh-Daten sind unter PRJNA674481 öffentlich zugänglich. GR, Gärrest; IS, *in sacco*.

Zusammenfassung der bakteriellen Diversität in Biogasfermentern und cellulolytischen Anreicherungskulturen

Vergleichende Analysen der bakteriellen Gemeinschaft in den Biogasfermentern und in den gezielten Anreicherungen cellulolytischer Gemeinschaften ist aufgrund der Komplexität nur auf Phylum-Ebene möglich. Insgesamt wurden 264 zOTUs in DNA und RNA der Biogasfermenter zu verschiedenen Zuständen, 300 zOTUs in mesophilen, cellulolytischen Anreicherungen und 196 in thermophilen, cellulolytischen Anreicherungen identifiziert. Die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften ist jeweils bei mesophilen Bedingungen deutlich höher als bei thermophilen. Auf Phylum-Ebene blieben über die Anreicherung in allen drei verwendeten Medien die Phyla *Firmicutes* und *Bacteroides* des mesophilen Fermenterbetriebes erhalten. zOTUs des Phylums *Fibrobacteres* wurden in GR-I (GS2.5GR) stark angereichert, konnten jedoch im Fermenter nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden die transkriptionell aktiven unbekannt Bakterien („Unknown_Bacteria“) oder auch zOTUs des Phylums *Verruimicrobia* in den Anreicherungen nicht detektiert. Unter thermophilen Bedingungen wird die relative Abundanz des Phylums *Firmicutes* im Fermenter über die Anreicherung unter den verwendeten Bedingungen nochmals deutlich erhöht. Die Phyla *Synergistetes* und *Bacteroidetes*, welche im Fermenter sowohl in DNA als auch in RNA detektiert wurden, waren in den Anreicherungen nicht mehr nachweisbar. (Abb. 13)

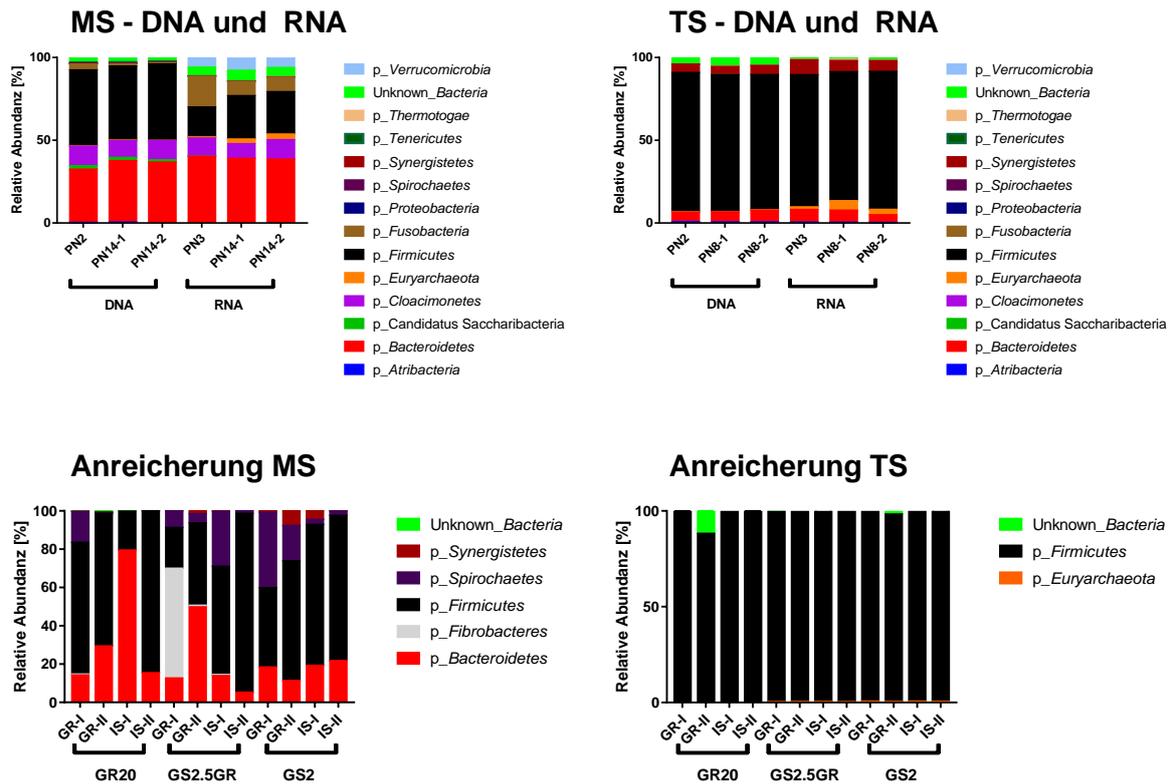


Abb. 13: Zusammenfassung der Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung. Die Auswertung der Roh-Daten erfolgte mit NGS-Toolkit v3.3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Roh-Daten sind unter PRJNA682319 (DNA), PRJNA682384 (RNA), PRJNA674617 (MS) und PRJNA674481 (TS) öffentlich zugänglich. M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme; GR, Gärrest; IS, *in sacco*.

3.1.3 Isolierung von (cellulolytischen) Leitorganismen aus Biogasfermentern

Die Isolierungsversuche starteten mit dem Fermenterbetrieb 2017; bis einschließlich 2019 resultierten in dieser Arbeit in sieben Reinkulturen aus dem mesophilen Prozess bzw. fünf aus dem thermophilen Prozess. Cellulolyse wurde bei insgesamt fünf dieser Reinkulturen festgestellt, darunter die beiden neuartigen mesophilen Spezies N2K1^T und MA18^T. Zudem werden drei cellulolytische Mischisolate (S4MN4, 253c-K6 und MA7c) im Folgenden im Detail beschrieben. Eine Zusammenfassung ist in Tab. 44 dargestellt.

Tab. 44: Zusammenfassung interessanter Reinkulturen, sowie Mischisolate isoliert im Rahmen dieser Doktorarbeit zusammen mit studentischen Arbeiten.

Isolat-ID	Glycerin-Kultur ID	Identifizierter Organismus	16S rRNA Übereinstimmung [%]	16S rRNA Gensequenz oder Identifikationsnummer NCBI	Medium	Temperatur	C	S	Referenz
S4MN4	264	Mischkultur	-	-	GS2	M	J	J	Rettenmaier (2017)
N2K1	232	<i>Acetivibrio mesophilus</i> sp. nov.	100	MK138666	GS2	M	J	J	Rettenmaier et al. (2019b)
S1	283-285	<i>Clostridium jeddahense</i>	>99	>S1_16S rRNA	GS2	M	N	N	Diese Arbeit
S4MN4-3-1	178; 181	<i>Clostridium aminovalericum</i>	97	>S4MN4-3-1_16S rRNA	GS2	M	N	N	Diese Arbeit
S4MN4-3-3	179, 180	<i>Clostridium merdae</i>	98	>S4MN4-3-2_16S rRNA	GS2	M	N	N	Diese Arbeit
MD1	292; 293	<i>Anaerotaenia torta</i> / <i>Mobilitalea sibirica</i>	97	MW180938	GS2	M	N	J	Diese Arbeit
249c-K6	265	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>	>99	MN744427	GS2	T	N	J	Rettenmaier et al. (2020c)
253c-K6	275	Mischkultur aus <i>D. raffinosedens</i> und <i>A. thermocellus</i>	-	-	GS2	T	J	J	Rettenmaier et al. (2020c)
250c-K4 und weitere	274 und weitere	<i>A. thermocellus</i>	>99	-	GS2	T	J	J	Rettenmaier et al. (2020c); Rettenmaier et al. (2019a); Schmidt (2019)
MA18^T MSII.1	291 267	<i>Ruminiclostridium herbifermentans</i> sp. nov.	100	MK935571	GR20; GS2.5GR; GS2	M	J	J	Rettenmaier et al. (2021)
MA7nc	208	<i>Clostridium sartagoforme</i>	>99	MW229081	GS2	M	N	J	Diese Arbeit

Isolat-ID	Glycerin-Kultur ID	Identifizierter Organismus	16S rRNA Übereinstimmung [%]	16S rRNA Gensequenz oder Identifikationsnummer NCBI	Medium	Temperatur	C	S	Referenz
MA7c	282	<i>Clostridium sartagoforme</i> in Co-Kultur mit <i>Ruminiclostridium josui</i>	-	-	GS2	M	J	J	Diese Arbeit
MS-GR-II.2 MI-GR-III.3	n.v.	<i>Clostridium sartagoforme</i>	100	>MS-GRII.2_16S rRNA	GR20; GS2.5GR;	M	J(?)	J	Schmidt (2019)
S2T2-S3; TS-IS-II und weitere	226; 268	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	>98	MK431709; >TS-IS-II_16S rRNA	GR20; GS2	T	J	J	Rettenmaier et al. (2019a) und Schmidt (2019)
TS-IS-I.2	269	<i>Herbinix luporum</i>	>99	>TS-IS-I.2_16S rRNA	GS2.5GR	T	J	J	Schmidt (2019)

C, cellulolytisch; S, saccharolytisch; M, mesophil, T, thermophil; J, Ja; N, Nein; J(?), unsicher; n.V.; nicht vorhanden

3.2 Physiologische und genomsequenzbasierte Charakterisierung ausgewählter Isolate und deren Einordnung in den Biogasprozess

3.2.1 Mischkultur S4MN4

Zusätzlich zur Gewinnung von Reinkulturen wurde eine cellulolytische Mischkultur, genannt S4MN4, eingehend analysiert. Die Mischkultur S4MN4 wurde im Rahmen der Masterarbeit von Rettenmaier (2017) am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München, im Vorfeld dieser Doktorarbeit isoliert.

Zur Bestimmung der enthaltenden Organismen wurde neben der Vereinzelung der Organismen auf Platte eine 16S rRNA Amplikonsequenzierung durchgeführt. Die Vereinzelung der Organismen aus S4MN4 führte zu einem cellulolytischen Isolat (*A. mesophilus*, N2K1^T), einem saccharolytischen Isolat (MD1, ein neuer Vertreter innerhalb der Familie *Lachnospiraceae*), sowie weiteren möglicherweise asacharolytischen Organismen (S1, *Clostridium jeddahense*; S4MN4-3-1, 97% 16S rRNA Übereinstimmung zu *Clostridium aminovalericum*; S4MN4-3-2, 98% 16S rRNA Übereinstimmung zu *C. merdae*). Für asacharolytische Isolate wurde Wachstum in GS2-Medium ohne extra zugegebene C-Quelle beobachtet. DC Analysen der Kultivierung von S1 bestätigten, dass auch bei Anzucht in GS2-Medium mit 0,5% (w/v) Zucker dieser nach Wachstum von S1 komplett im Medium zurückbleibt. Im Gegensatz dazu deuten allerdings Screening-Analysen von S4MN4-3-1 und S4MN4-3-2 via AN Micro Plates zumindest auf eine saccharolytische Enzymsausstattung hin, auch wenn für Wachstum in GS2-Medium zusätzlich zu Hefe-Extrakt keine weitere C-Quelle nötig ist. S4MN4-3-1 zeigte positive Reaktionen für D/L-Fructose, D-Galacturonsäure, D-Glucosamininsäure, Palatinose, L-Rhamnose und Uridine. S4MN4-3-2 zeigte positive Reaktionen für 2'-Deoxy-Adenosin, 3-Hydroxybuttersäure, 3-Methyl-D-Glucose, α -D-Glucose, α -Ketovaleriansäure, D/L-Apfelsäure, D-Cellobiose, Dextrin, i-Erythritol, D/L-Fructose, D-Galacturonsäure, Gentibiose, Glycerol, Inosin, D-Mannose, L-Milchsäure, D-Milchsäure-Methylester, Palatinose, Pyruvat(-Methylester), L-Rhamnose, L-Serin, D-Sorbitol, Thymidin, Turanose, sowie Uridin. Vor allem S4MN4-3-2 scheint demnach neben der proteolytischen Lebensform (Wachstum auf Hefeextrakt, im Screening positive Reaktionen für Aminosäuren) auch eine vielfältige Enzymsausstattung zur Fermentation von Kohlenhydraten, wie z.B. Cellobiose, zu besitzen.

16S rRNA Amplikon-Analysen

Amplikonsequenzierungen der 16S rRNA Gensequenz, Region V3-V4, deuteten auf eine stabile Mischkultur aus drei bis vier dominierenden Organismen hin. Die relative Abundanz einzelner Genera variierte innerhalb der biologischen Duplikate kaum. Die taxonomische Einordnung der OTUs via IMNGS.org mit einer relativen Abundanz $\geq 0,0001$ identifizierte Organismen des Genus *Clostridium* (Cluster XIVa, IV und III), sowie unbekannte Organismen in der Familie *Lachnospiraceae* (Abb. 14). Interessanterweise wurden OTUs des Genus *Clostridium* III nur bei Kultivierung mit Cellulose (FP,

FP+Cb oder PASC) detektiert. Direkt damit korrelierte die Abundanz von OTUs des Genus *Clostridium* IV, welcher bei der Kultivierung mit Cellulose weniger stark vertreten ist als im Vergleich zur Kultivierung mit Cellobiose oder Xylan. OTUs des Genus *Clostridium* XIVa waren in allen Proben am stärksten vertreten. Die Dominanz trat allerdings verstärkt bei der Kultivierung mit Cellulose in den Vordergrund. OTUs klassifiziert als unbekannte Organismen in der Familie *Lachnospiraceae* traten bei allen Bedingungen in gleichbleibender Abundanz auf.

Einzelne OTU Sequenzen konnten mit hoher Übereinstimmung einzelnen Isolaten zugeordnet werden. Die OTUs 1, 6, 11 und 31 (siehe Anhang: „16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4, S4MN4: OTUs mit Übereinstimmung zu Isolaten“) zeigten hohe Übereinstimmung (>98%) zu den 16S rRNA Gensequenzen der Isolate MD1, S1, N2K1^T und S4MN4-3-1, respektive, und wurden den Genera *Clostridium* XIVa (OTU_1 und _31), *Clostridium* IV (OTU_6) und *Clostridium* III (OTU_11) zugeordnet. OTU_523 wird als unbekannter Organismus innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* eingeordnet und hat eine geringe Übereinstimmung (<98%) zur 16S rRNA Gensequenz des Isolates MD1. Interessanterweise ist S4MN4-3-2 trotz der im Screening beobachteten saccharolytischen Kapazität des Isolates nicht eindeutig in den 16S rRNA Amplikonsequenzen detektierbar.

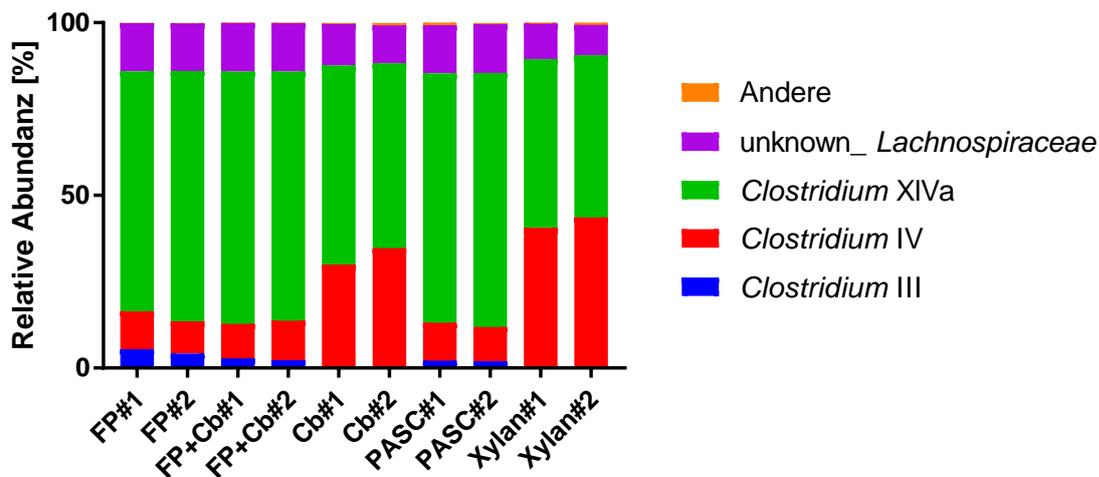


Abb. 14: Zusammenfassung der 16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4, von DNA isoliert aus S4MN4 auf Genus-Ebene. Analysiert wurde S4MN4 kultiviert bei 45 °C in GS2 Medium mit verschiedenen C-Quellen (FP, 0,5%; FP+Cb, 0,5%+0,2%; Cb, 0,5%; PASC, 0,5%; Xylan, 0,5% jeweils w/v) in biologischen Duplikaten. Die Kultivierung erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Scheitz (2019). Die Auswertung der Sequenzier-Daten erfolgte mit IMNGS.org (Lagkouvardos et al. 2016) für OTUs mit relativer Abundanz $\geq 0,0001$. Die statistische Auswertung erfolgte via Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Rohdaten sind unter der Identifikationsnummer PRJNA672848 bei NCBI öffentlich zugänglich.

Genomsequenzierung

Zur genomsequenzbasierten Analyse dieses cellulolytischen und xylanolytischen Mischisolates mit bis dato unbekanntem Organismen wurde eine Multi-Genomsequenzierung mit der PacBio-Sequenzierungstechnologie in Kooperation mit ZIEL-Core Facility Microbiome, TU München, Freising durchgeführt. Hierfür wurde gDNA von S4MN4 Kultivierung in GS2 Medium mit FP als einziger C-Quelle (S4MN4_FP) verwendet. Die resultierenden Genomsequenzen (SRR12990413) entsprachen allerdings nicht den Erwartungen, da nur zwei verschiedene 16S rRNA Gensequenzen mit Ähnlichkeiten zu *C. jeddahense* (entspricht *Clostridium* IV [Abb. 14] bzw. Isolat S1 [Tab. 44]) und *Mobilitalea sibirica* mit 96,8% 16S rRNA Übereinstimmung (entspricht *Clostridium* XIVa [Abb. 14] bzw. Isolat MD1 [Tab. 44]) detektiert wurden. Illumina-Sequenzierungen der gDNA von S4MN4_FP im Vergleich zu gDNA von S4MN4 nach Kultivierung in GS2 Medium mit PASC als einziger C-Quelle (S4MN4_PASC), isoliert und analysiert im Rahmen der Masterarbeit von Scheitz (2019), verdeutlichten die Problematik. Nach Scheitz (2019) resultierte die Sequenzierung von S4MN4_PASC im Vergleich zu S4MN4_FP in der doppelten Anzahl an gesamten Nukleinsäuren; zudem konnten alle vier erwarteten 16S rRNA Gensequenzen detektiert werden (Tab. 45). Die höhere Anzahl an CAZymes, insbesondere von GHs mit SP, in S4MN4_PASC deutete auf eine nicht-repräsentative Abreicherung der cellulolytischen Organismen in S4MN4_FP hin. Cellulolytische Organismen können an das Substrat anhaften und deshalb wurden dieser bei der Entfernung des verbleibenden unlöslichen Substrates (FP) durch Zentrifugation abgereichert; im Folgenden waren diese Organismen in der gDNA unterrepräsentiert. PASC ist dagegen eine amorphe Form von Cellulose und ist leichter abbaubar. Zudem konnte verbleibendes, unlösliches Substrat vor der gDNA Extraktion mittels enzymatischer Hydrolyse entfernt werden und so eine Abreicherung durch Zentrifugation vermieden werden (Scheitz 2019). Die Roh-Daten der beschriebenen Genomsequenzierungen sind bei NCBI unter der Identifikationsnummer PRJNA672905 öffentlich zugänglich.

Tab. 45: Vergleich der Illumina-Sequenzierungen von S4MN4_FP und S4MN4_PASC.

	S4MN4_FP (SRR12990415)	S4MN4_PASC (SRR12990414)
bp gesamt	8.478.781	15.858.137
Contigs >= 1.000 bp	302	1.691
Anzahl verschiedener 16S rRNA Gene	2	4
CAZymes (HMMER+Diamond)	125	270
GHs mit SP	8	39

S4MN4_FP, S4MN4 kultiviert mit FP als einzige C-Quelle, gDNA Extraktion erfolgte wie in „Extraktion von Nukleinsäuren aus bakteriellen Kulturen“ beschrieben.

S4MN4_PASC, S4MN4 kultiviert mit FP als einzige C-Quelle, gDNA Extraktion erfolgte nach Scheitz (2019) CAZymes, darunter auch GHs, wurden via dbCAN2 (Zhang et al. 2018a) nach automatischer Annotationen der Genomsequenzen via PROKKA Version 1.13.3 identifiziert.

Analyse sekretierter CAZymes

Zur weiteren Analyse der Bedeutung für den Abbau von Cellulose oder Hemicellulose einzelner Spezies bzw. einzelner, extrazellulärer GHs von S4MN4 wurden die sekretierten Proteine von S4MN4 angezogen auf den C-Quellen FP, PASC und Xylan über LC-MS/MS analysiert (Kooperation mit Dr. Christina Ludwig, BayBioMS, TU München). Nach Scheitz (2019) variiert die Menge an sekretierten Proteinen innerhalb der biologischen Triplikate kaum, allerdings ist ein deutlicher Unterschied vor allem zwischen FP oder PASC zu Xylan zu beobachten, welcher sich auch in der Anzahl der identifizierten Proteinen über LC-MS/MS widerspiegelt (Tab. 46).

Tab. 46: Analyse sekretierter Proteine von S4MN4.

Probe	Proteinkonzentration nach Bradford [mg/ml]	Summe identifizierter Proteine nach LC-MS/MS
S4MN4-FP1	0,334	1.412
S4MN4-FP2	0,319	1.403
S4MN4-FP3	0,322	1.360
S4MN4-PASC1	0,222	1.389
S4MN4-PASC2	0,203	1.384
S4MN4-PASC3	0,204	1.281
S4MN4-Xylan1	0,047	592
S4MN4-Xylan2	0,046	627
S4MN4-Xylan3	0,051	492

Die Mischkultur S4MN4 wurde in biologischen Triplikaten (Nr. 1-3) 7 Tage in GS2 Medium mit 0,5% (w/v) FP, PASC oder Xylan bei 45 °C angezogen. Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Scheitz (2019).

Die Auswertung der Roh-Daten der LC-MS/MS Analysen erfolgte in Kooperation mit Dr. Christina Ludwig, BayBioMS, TU München. Die Identifizierung einzelner Proteine erfolgte über die Proteinsequenzen aus S4MN4_PASC, annotiert über PROKKA Version 1.13.3.

Die oben beschriebenen 16S rRNA Amplikonsequenzierungen identifizierten das Isolat N2K1^T in S4MN4_FP und S4MN4_PASC, jedoch nicht in S4MN4_Xylan. Die Analyse der sekretierten Proteine bestätigt dies. Die Analyse der relativen Abundanz der „reducing end cellulose 1,4-beta-cellobiosidase“, zugeordnet zur GH Familie 48 mit Dockerin-Modul (RXE59309.1), war im Mittel aus drei biologischen Replikaten besonders abundant in den Proben S4MN4_FP ($3,2 \times 10^8$, Rang 25) und S4MN4-PASC ($9,9 \times 10^7$, Rang 72), jedoch nicht in S4MN4_Xylan. Dies unterstützt die essentielle Rolle dieses Isolates für die Hydrolyse von Cellulose.

Neben N2K1^T wird auch das Isolat MD1 in allen analysierten Bedingungen von S4MN4 identifiziert. MD1 besitzt zwar eine Vielzahl von CAZymes, jedoch nur vier Enzyme mit SP (siehe „Funktionelle Analyse der Genomsequenz“). Interessanterweise ist aus diesen vier Enzymen (Tab. 51) nur das Protein MBB2184454.1 (CE4) ausschließlich im Sekretom von S4MN4_PASC mit einer mittleren Abundanz von $1,9 \times 10^6$ (Rang 807) vertreten. Das Isolat MD1 scheint deshalb keine tragende Rolle im Abbau von unlöslicher Cellulose oder Hemicellulose zu haben.

Eine Textsuche in den automatischen Benennungen der Protein-Sequenzen abgeleitet aus der Multi-Genomsequenzierung nach „Cellulo“ oder „Cellulase“ ergab fünf Treffer (Tab. 47). Keines dieser vier Proteine wurde in S4MN4_Xylan detektiert. Für drei Proteine wurde ein Signalpeptid vorhergesagt, diese Proteine sind nach BLASTP Analysen GHs der Organismen N2K1^T und MD1. Für MHPJIEBC_06249, einer möglichen GH5 aus MD1 wurde über dbCAN2 kein Signalpeptid detektiert; die Analyse mit Signal P Version 5 deutet allerdings auf ein Signalpeptid mit der Schnittstelle zwischen Aminosäure 19 und 20 hin (Wahrscheinlichkeit von 0,9989 für Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)). Das Protein MHPJIEBC_07988 deutet auf cellulosomale Komponenten eines weiteren Bakteriums der Klasse *Clostridiales* hin, welches noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Möglicherweise deutet dies auf cellulolytische Eigenschaften des bis dato nicht kultivierten bzw. identifizierten Organismus „Unknown_Lachnospiraceae“ aus den 16S rRNA Amplikon-Analysen hin. Dies verdeutlicht die Problematik von Multigenom-Analysen von Mischkulturen mit unbekanntem Spezies. Um eindeutige Schlussfolgerungen hinsichtlich der Relevanz der einzelnen Organismen für den Abbau spezifischer Substrate, hier Cellulose und Hemicellulose, machen zu können, ist die Identifizierung, Charakterisierung und Genomsequenzierung auf Spezies-Ebene unbedingt erforderlich.

Tab. 47: „Cellulasen“ detektiert in den sekretierten Proteinen von S4MN4.

Automatische Benennung	Protein ID	Mittlere relative Abundanz S4MN4_FP und Standardabweichung	Rang in S4MN4_FP	Mittlere relative Abundanz S4MN4_PASC und Standardabweichung	Rang in S4MN4_PASC	BLASTP Ergebnis (Benennung; Übereinstimmung [%]; Identifikationsnummer)	Signalpeptid [J/N]
Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (reducing end)	MHPJIEBC_10548	3,0x10 ⁸ +/- 1,1x10 ⁸	25	9,9x10 ⁷ +/- 6,2x10 ⁷	72	endoglucanase <i>Hungateiclostridium mesophilum</i> ; 100; WP_128705948.1	J
Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	MHPJIEBC_11610	1,0x10 ⁸ +/- 2,7x10 ⁷	80	8,2x10 ⁷ +/- 4,0x10 ⁷	83	glycoside hydrolase family 9 protein <i>Hungateiclostridium mesophilum</i> ; 100; WP_128705743.1	J
Cellulosome-anchoring protein	MHPJIEBC_07988	2,0x10 ⁷ +/- 7,3x10 ⁶	275	-	-	MULTISPECIES: S-layer homology domain-containing protein <i>Clostridiales</i> ; 100; WP_069196093.1	N
Cellulase/esterase CelE	MHPJIEBC_06249	3,7x10 ⁶ +/- 1,3x10 ⁶	684	2,4x10 ⁶ +/- 9,5x10 ⁵	747	glycoside hydrolase family 5 protein <i>Lachnospiraceae</i> bacterium MD1; 100; MBB2184729.1	J
Cellulase/esterase CelE	MHPJIEBC_06024	-	-	5,2x10 ⁴ +/- 3,7x10 ⁴	1.496	GDSL family lipase <i>Lachnospiraceae</i> bacterium MD1; 100; MBB2184451.1	N

Die Annotation und Benennung der Protein-Sequenzen erfolgte automatisch mit PROKKA Version 1.13.3.

Die Aminosäure-Sequenzen (siehe Anhang: Proteinsequenzen S4MN4 detektiert im Sekretom nach Textsuche „Cellulo“ / „Cellulase“) wurde mittels BLASTP mit der NCBI Datenbank (non-redundant protein sequences (nr)) abgeglichen. Signalpeptide wurden mit Signal P Version 5 für Gram-positive Bakterien vorhergesagt (Almagro Armenteros et al. 2019).

3.2.2 *Acetivibrio mesophilus* sp. nov., N2K1^T

Isolierung, Sequenzierung und Phylogenie

Das Isolat N2K1^T wurde aus der cellulolytischen Mischkultur S4MN4 isoliert und konnte über 16S rRNA-Gensequenzierung zu 97-98% *Acetivibrio straminisolvens* (Tindall 2019b) [früher: *Hungateiclostridium straminisolvens* (Zhang et al. 2018b) und ursprünglich *Clostridium straminisolvens* (Kato et al. 2004)] zugeordnet werden.

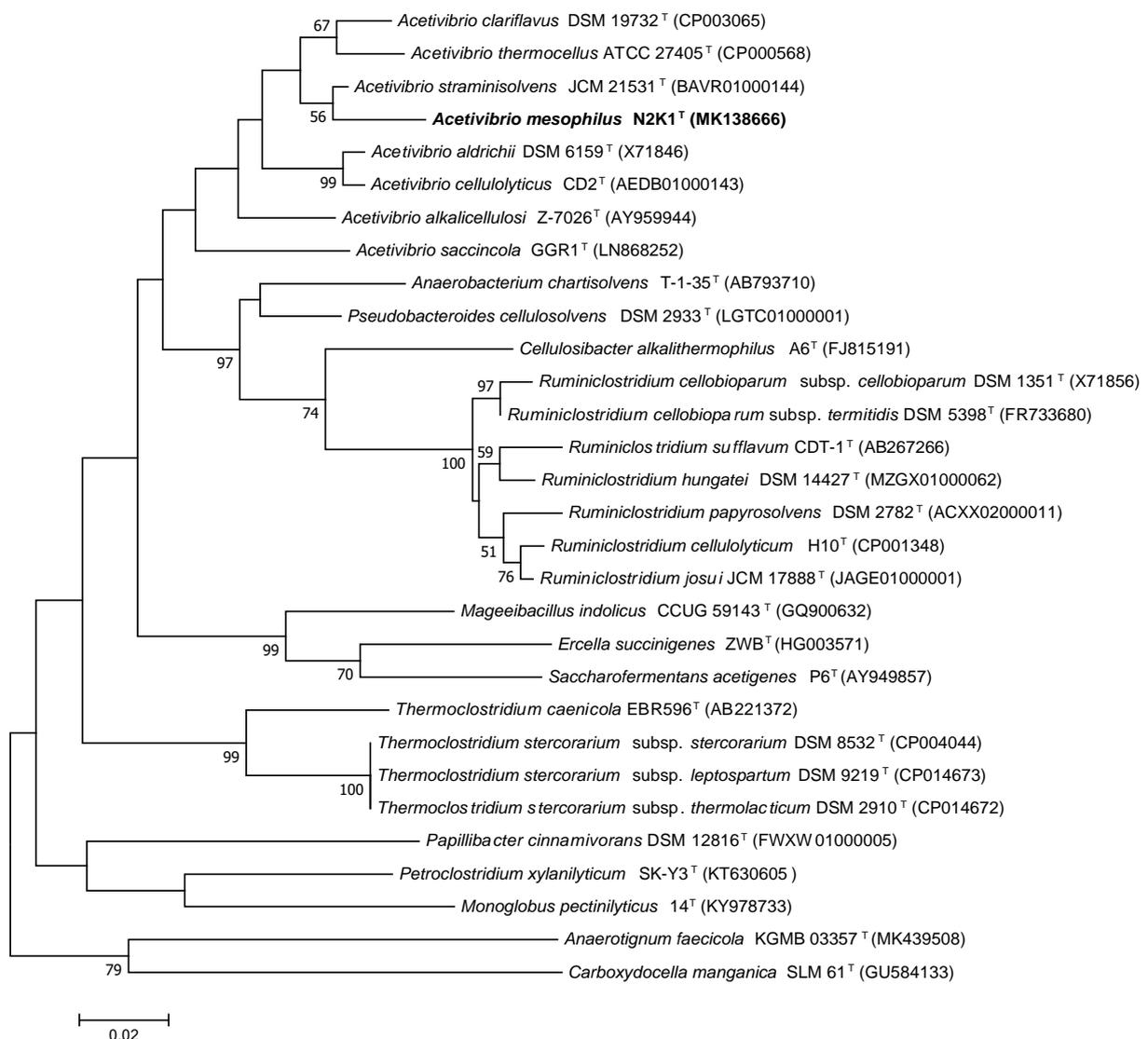


Abb. 15: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von N2K1^T. Die 16S rRNA Gensequenzen wurden mit über MUSCLE aligniert und die phylogenetischen Distanzen mit 1.000 Wiederholungen (Felsenstein 1985) nach der *Maximum Likelihood* Methode (Felsenstein 1981) basierend auf dem Tamura-Nei Modell (Tamura und Nei 1993) in MEGA7 (Kumar et al. 2016) berechnet. Gezeigt ist der wahrscheinlichste Baum (highest log likelihood: -9202,11) zusammen mit der Wiederholbarkeit (>50) an den Verzweigungen. Balken, 0,02 Substitutionen. Die Analyse beinhaltete 30 16S rRNA Gensequenzen (Identifikationsnummern angegeben) mit einer Länge von 1.207 bp.

16S rRNA Gensequenzanalysen ermöglichten die phylogenetische Einordnung von N2K1^T (Abb. 15). N2K1^T ist demnach Teil eines Clusters mit allen bekannten Spezies des Genus *Acetivibrio* und hat zudem einen gemeinsamen Vorfahren mit dem nächstverwandten Organismus *A. straminisolvens* JCM 21531^T. Bootstrap für diese Verzweigung ist 56.

Die Genomsequenz von N2K1^T umfasst 4,04 Mbp, aufgeteilt auf 93 Contigs mit einem N₅₀ von 113.652 bp und einem G+C Gehalt von 38.36 mol%. Phylogenetisch bestätigte die Analyse der kompletten Genomsequenz die vorangegangene Identifizierung basierend auf 16S rRNA Genen (Abb. 15). N2K1^T zeigt die höchste Homologie zu *A. straminisolvens* JCM 21531^T mit einem Bootstrap-Wert von 100, sowie 47 aus 92 Gensequenzen, die diese Verzweigung unterstützen (Abb. 16). Zudem konnten in öffentlichen Datenbanken zwei weitere Genomsequenzen der Isolate Bc-iso-3 und link-BC1 mit hoher Übereinstimmung zu N2K1^T identifiziert und somit der Spezies *A. mesophilus* zugeordnet werden.

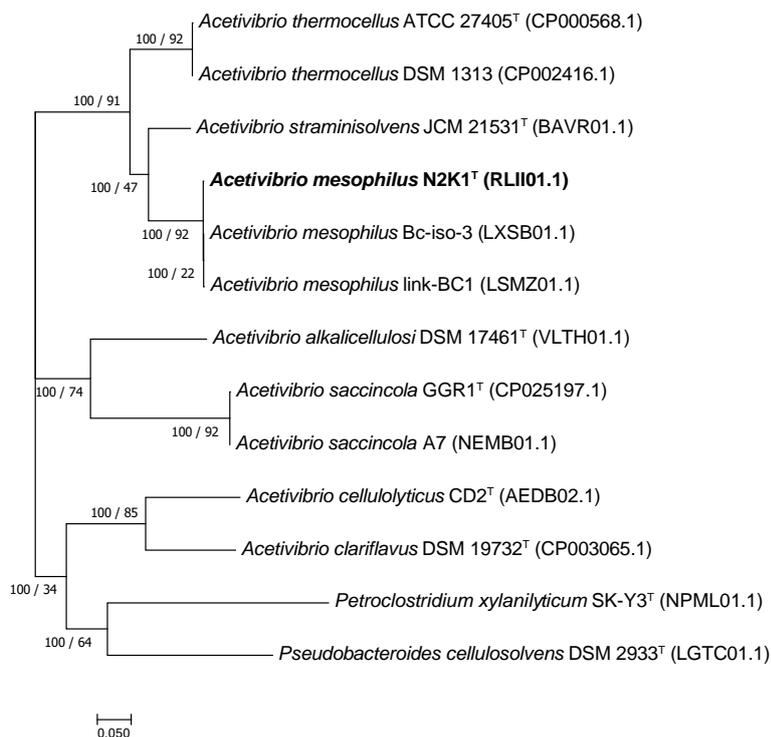


Abb. 16: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 up-to-date bacterial core genes in Genomsequenzen, von N2K1^T. Der Baum wurde aus 13 Genome (Identifikationsnummern angegeben) über UBCG Version 3 (Na et al. 2018) berechnet. An den Verzweigungen ist die statistische Relevanz aus 1.000 Wiederholungen (Bootstrap), sowie die Anzahl an Genen die diese Topologie unterstützen (Gene Support Index, GSI) wie folgt angegeben: Bootstrap / GSI.

Tab. 48: ANI-Werte, bestimmt über jspecies.org (Richter et al. 2016), der Genomsequenz von N2K1^T (RLII01.1) zu 12 anderen Genomen.

Genom (Organismus, Identifikationsnr.)	Größe [bp]	Anzahl Contigs / Scaffolds	GC Gehalt [mol%]	Anzahl N	ANIb [%]	Aligniert [%]	Aligniert [bp]
<i>Acetivibrio mesophilus</i> N2K1 ^T , RLII01.1	4.044.838	93	38,1	0	100	100	4.044.838
<i>A. mesophilus</i> Bc-iso-3, LXS01.1	4.327.139	4	38,2	0	99,13 [#]	92,09	3.724.882
<i>A. mesophilus</i> link-BC1, LSMZ01.1	4.202.104	192	38,2	27	99,11 [#]	91,78	3.712.282
<i>A. straminisolvens</i> JCM 21531 ^T , BAVR01.1	3.907.117	195	38,3	0	85,15	68,23	2.759.615
<i>A. thermocellus</i> ATCC 27405 ^T , CP000568.1	3.186.534	1	40,3	0	82,64	41,58	1.681.654
<i>A. thermocellus</i> DSM 1313, CP002416.1	2.959.377	1	40,6	0	82,53	41,02	1.659.114
<i>A. cellulolyticus</i> CD2 ^T , AEDB02.1	6.146.535	10	35,5	24	70,24	37,32	1.509.689
<i>A. alkalicellulosi</i> DSM 17461 ^T , VLTH01.1	5.307.226	3	31,7	7100	69,86	32,18	1.301.497
<i>A. clariflavus</i> DSM 19732 ^T , CP003065.1	3.886.140	1	37,0	0	72,12	30,86	1.248.397
<i>Pseudobacteroides celluloso</i> DSM 2933 ^T , LGTC01.1	5.925.138	1	36,4	0	68,48	23,47	949.492
<i>A. saccincola</i> GGR1 ^T , CP025197.1	3.000.963	1	35,9	0	70,77	24,28	982.107
<i>A. saccincola</i> A7, NEMB01.1	3.759.855	4	34,9	0	71,15	30,68	1.240.839
<i>Petroclostridium xylanilyticum</i> SK-Y3 ^T , NPML01.1	3.863.184	41	37,2	0	67,26 [*]	17,36	702.100

#, über Grenzwert für Identifikation auf Spezies-Ebene

*, nicht vertrauenswürdige Alignment

ANI Analysen bestätigen die phylogenetischen Analysen. Das Genom von N2K1^T zeigt >95% Übereinstimmung zu den Genomen der Isolate Bc-iso-3 und link-BC1, sowie deutlich <95% zu anderen Spezies innerhalb des Genus *Acetivibrio* oder anderen Organismen mit phylogenetisch größerer Distanz (Tab. 48).

Einordnung in den Biogasprozess

Die Isolate Bc-iso-3, abgelegt bei NCBI am 31.08.2016 unter dem Projektnamen „Sequencing cellulolytic bacteria isolated from anaerobic digesters“ und link-BC1, abgelegt bei NCBI am 20.07.2017 unter dem Projektnamen „Cellulolytic Clostridium strain link-BC1 that produces cellulosomes“ verdeutlichen, dass Isolate derselben Spezies wie N2K1^T bereits aus einem ähnlichen natürlichen Habitat (Biogas Fermenter) und mit ähnlichen Eigenschaften (cellulolytisch) isoliert und sequenziert wurden. Jedoch fehlten bis dato eine physiologische und phylogenetische Charakterisierung, welche entscheidend für weiterführende Hypothesen hinsichtlich der Bedeutung dieser Spezies sind.

Des Weiteren ermöglichte der Abgleich der Genomsequenz von N2K1^T mit der öffentlich zugänglichen Datenbank ‚biogas microbiome‘ nach Campanaro et al. (2020) (2.10.2 Verwendete Datenbanken) die Zuordnung eines *metagenome-assembled genome* (MAG) zur gleichen Spezies. Der MAG METABAT AS05jafATM 73, welcher aus den Rohdaten (SRR2312703) des Metagenom-Projektes PRJNA294734 [NCBI; „Metagenomic characterization of metabolic network from an ammonia rich biogas reactor with emphasis on cellulose degrading bacteria.“; (Sun et al. 2014)] assembliert wurde, hat einen ANI-Wert von 99.75% zur Genomsequenz von N2K1^T und kann demnach eindeutig derselben Spezies zugordnet werden. Auch hier verdeutlicht sich die putative Rolle von Isolaten derselben Spezies wie N2K1^T in Bezug auf die Cellulolyse im Biogasprozess.

Physiologie

Zellen von N2K1^T waren stäbchen-förmig, nicht beweglich, sporenbildend und Gram-positiv. Wachstum wurde in einem Temperaturbereich von 30-50 °C und bevorzugt bei neutralem pH (Optimum pH 7,5) beobachtet. Zudem tolerierte N2K1^T zusätzliche Salzkonzentrationen von bis zu 1,8% NaCl im Medium und zeigte ein sehr eingeschränktes Substratverwertungsspektrum. Eindeutig metabolisiert wurden nur die C-Quellen Cellobiose und Cellulose (Filterpapier Whatman No.1), jeweils 0,5% (w/v). Fermentationsprodukte waren hauptsächlich Essigsäure und Ethanol als flüchtige Metabolite. Kein Wachstum wurde mit den C-Quellen Arabinose, Fructose, Glucose, Lactose, Mannitol, Mannose, Ribose, Stärke, Saccharose, Trehalose, Xylan and Xylose, jeweils 0,5% (w/v), beobachtet. Chemotaxonomisch sind C₁₆ zelluläre Fettsäuren in der Zellwand von N2K1^T dominierend. Bei Wachstum in GS2 Medium wurde hauptsächlich C_{16:0} iso (46,6%), C_{16:0} DMA (7,1%) und C_{16:0} (5,7%), sowie eine nicht eindeutig identifizierbare Fettsäure (UN16.107 16i DMA; 20,0%) detektiert. (Rettenmaier et al. 2019b)

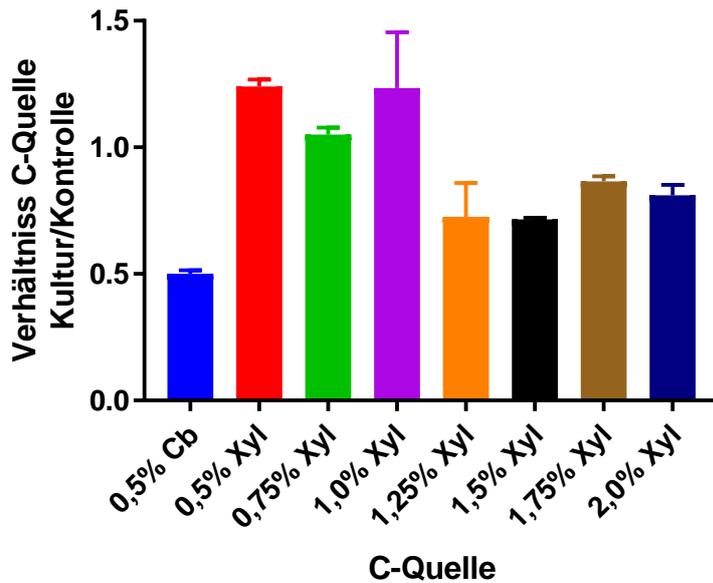


Abb. 17: Analyse zur Substrat-Verwertung von N2K1^T via DNSA. Gemessen wurde die Menge an verbleibender C-Quelle nach Inkubation im Vergleich zu nicht-inokuliertem Medium aus zwei biologischen Replikaten, gemessen in jeweils drei technischen Replikaten.

Weiterführend wurde für ausgewählte C-Quellen zum Test der Verwertung von Pentosen (hier: Xylose und Arabinose) der Einfluss der Substratkonzentration getestet. N2K1^T zeigt Wachstum mit Xylose zum Teil ab einer Konzentration von 1% (w/v) Xylose im Medium. Deutliches Wachstum zusammen mit einer gelblich-orangen Verfärbung des Mediums wurde ab einer Konzentration von 1,25% mit einem Optimum bei 1,75% (w/v) Xylose im Medium beobachtet (Abb. A 2). Hierbei werden allerdings trotz längerer Inkubation (5 Tage, 45 °C) geringere Zelldichten im Vergleich zu Wachstum (4 Tage, 45 °C) mit 0.5% (w/v) Cellobiose erreicht. Zusätzlich zum Wachstum wurde die Substratverwertung von Xylose über DC und DNSA gemessen. Ab einer Konzentration von 1,25% (w/v) Xylose verbleibt nach der Inkubation 75-90% der eingesetzten Substratmenge im Medium. Demnach korreliert das Wachstum von N2K1^T mit der Verwertung von Xylose. Im Vergleich zu Cellobiose (50% verbleibendes Substrat nach Inkubation) ist der Anteil an verwerteter Xylose sehr gering (Abb. 17). Für die Konzentration 0,5-1,0% (w/v) Xylose wurden in der beimpften aber nicht angewachsenen Kultur zum Teil mehr Xylose detektiert als in der sterilen Mediums-Kontrolle, welche die gleiche Menge Xylose beinhaltet und ebenfalls inkubiert wurde. Dies könnte durch mögliche Wechselwirkungen des Nachweisreagenz (DNSA) mit Zellrückständen erklärt werden. Bei den eingesetzten Arabinose-Konzentrationen (0-2% w/v) wurde auch nach 10 Tagen Inkubation kein Wachstum beobachtet.

Funktionelle Analyse der Genomsequenz

Die automatische Annotation der Genomsequenz von N2K1^T mit PGAP Version 4.6 (15.11.2018) ergab 3.299 kodierende Gene und 67 RNA Gene (54 tRNAs, 9 rRNAs und 4 non-coding RNAs). Weiterführend ermöglichte die automatische Annotation die Analyse vorhandener Stoffwechselwege, sowie CAZymes.

Die KEGG Annotation via KofamKOALA (durchgeführt am 15.10.2020) ordnete aus 3.299 kodierenden Genen 1.803 Proteine zu 1.349 Orthologen zu. Daraus konnten z.B. insgesamt 13 Kohlenhydrat-Stoffwechselwege komplett oder mit nur einem fehlenden Modul annotiert werden (Tab. A 2).

Insgesamt wurden 122 CAZymes via dbCAN2 in den Proteinsequenzen von N2K1^T identifiziert. Davon haben mehr als die Hälfte, 64 Proteine (Tab. A 4), putativ ein Signalpeptid, was auf eine hohe Enzymaktivität hinsichtlich Kohlenhydratabbau im extrazellulären Raum von N2K1^T hindeutet. Neben 51 GHs sind auch drei Proteine (RXE57906.1, RXE58351.1 und RXE60086.1) mit Cohesin-Modulen als extrazellulär annotiert worden. Dies lässt auf cellulosomale Enzymkomplexe schließen. Das Protein RXE57906.1 ist mit 1.825 Aminosäuren das größte der drei cellulosomalen Strukturproteine (Scaffoldin) und setzt sich aus insgesamt acht Cohesin-Typ-I-Modulen und einer CBM3 zusammen. Zudem konnten zwei Proteine der GHF 48 (RXE59061.1 und RXE59309.1), welche entscheidend für den Abbau von vor allem kristalliner Cellulose ist, annotiert werden. Das Protein RXE59309.1 ist putativ extrazellulär mit einem GH48-Modul und einem N-terminalen Dockerin-Modul und hat eine Aminosäure-Sequenzähnlichkeit von 80,7% zu *A. thermocellus* (WP_080547391.1). Das Protein RXE59061.1 ist ebenfalls putativ extrazellulär mit einem GH48-Modul und einem N-terminalen CBM3 und einer Aminosäure-Sequenzähnlichkeit von 83,5% zu *A. thermocellus* (WP_003512026.1). Die hohen Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten zu dem bekannten und sehr effektiven cellulolytischen Organismus *A. thermocellus* deuten auch für N2K1^T auf eine hohe cellulolytische Aktivität hin. Das Genus *Acetivibrio* umfasst mehrere bedeutende Cellulose-Verwerter, unter anderem den bekannten und sehr effektiven cellulolytischen Organismus *A. thermocellus*. Deshalb wurden CAZymes von N2K1^T neben der automatischen Annotation auch manuell geprüft (Kooperation mit Dr. Vincent Lombard, CNRS, Aix-Marseille Universität, AFMB, Marseille, Frankreich und <http://www.cazy.org/>). Diese Analysen identifizierten 171 Proteine als mögliche CAZymes, darunter 71 mit Dockerin-Modulen, welche für die Interaktion funktioneller CAZymes mit dem cellulosomalen Strukturprotein erforderlich sind. Dies deutet auf eine Ähnlichkeit der Cellulosom-Ausstattung mit *A. thermocellus* [72 Dockerin-Module (Pinheiro et al. 2009)] hin.

Analysen der sekretierten Proteine von N2K1^T via LC-MS/MS nach Wachstum in GS2_CAA Medium mit Filterpapier als C-Quelle detektierten cellulosomale Komponenten unter den abundantesten Proteinen. Das cellulosomale Strukturprotein RXE57906.1 ist anhand der relativen Quantifizierung das

acht-häufigste Protein und RXE59309.1 (GH48) auf Rang fünf (Tab. A 3). Dies bestätigte die Relevanz der automatisch vorhergesagten CAZymes hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Abbau kristalliner Cellulose (hier: Filterpapier).

Taxonomie

Physiologische und phylogenetische Unterschiede ermöglichten die Abgrenzung des Isolates N2K1^T von anderen Vertretern innerhalb des Genus *Acetivibrio*. Demzufolge wurde das Isolat N2K1^T als neue Spezies, *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov. N2K1^T = DSM 107956^T = CECT 9704^T, im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* beschrieben (Rettenmaier et al. 2019b) und im Zuge der Umbenennung nach Tindall (2019a) im März 2020 als *Acetivibrio mesophilus* N2K1^T in die *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN; <https://www.bacterio.net/>; abgerufen am 17.09.2020; (Euzéby 1997)) aufgenommen (Oren und Garrity 2020). Die 16S rRNA Gensequenz, sowie die Genomsequenz von N2K1^T wurde bei NCBI mit den Identifikationsnummern MK138666 und RLII000000000 öffentlich zugänglich gemacht.

3.2.3 MD1, ein neuer Vertreter innerhalb der Familie *Lachnospiraceae*

Isolierung und Genomsequenzierung

Die vorangegangene 16S rRNA Amplikon- und Genomsequenzierung der cellulolytischen Mischkultur S4MN4 (3.2.1 Mischkultur S4MN4) ermöglichte in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Zinser, Precigen Bioinformatics Germany GmbH die Assemblierung des Genoms eines bis dato nicht kultivierten Organismus. Das kombinierte Assembly aus Illumina und PacBio Reads mit SPAdes v3.13.0 resultierte in fünf Contigs ≥ 1.000 bp und ermöglichte einen Einblick in die Physiologie des Organismus. Die Annotation von kodierenden Genen und zusätzlich die automatische Vorhersage von CAZymes mittels dbCAN2 gab Aufschlüsse über den Stoffwechsel des bis dato unkultivierten Organismus. Interessant war, dass kaum extrazelluläre CAZymes vorhergesagt wurden. Demnach mussten zur Isolierung lösliche Substrate eingesetzt werden. Die hohe Abundanz von α -Amylasen deutet auf Stärke-Verwertung hin. MD1 konnte über die Verwendung von Maltodextrin 10 aus Stärke in Reinkultur isoliert werden und wurde bei DSMZ, Braunschweig, Deutschland (DSM 110715) und JCM, Japan (JCM 39125) hinterlegt. Die 16S rRNA Gensequenz des Reinisolates hat 100% Übereinstimmung zur 16S rRNA des assemblierten Genoms (>Unclassified bacterium, Isolate MD1 16S rRNA gene) und 96.1-96.9% Übereinstimmung zu *Mobilitalea sibirica* P3M-3^T bzw. *Anaerotaenia torta* FH052^T. Eine erneute Sequenzierung der gDNA isoliert aus der Reinkultur mittels Illumina HiSeq 2500 am ZIEL-Core Facility Microbiome, TU München, Freising, bestätigte das zuvor assemblierte Genom. Die ANI-Analyse ergab eine Übereinstimmung von 100%.

Weiterführend konnten die beiden größten der fünf Contigs ≥ 1.000 bp aus oben beschriebener Assemblierung mittels PCR und Sanger-Sequenzierung der PCR Produkte geschlossen werden. Primer an den jeweiligen Enden der Contigs N1 (4,1 Mbp) und N2 (34 kbp) ermöglichten die Anordnung dieser beiden Contigs: Bei der Kombination der Primer S4MN4 N1c + S4MN4 N2 sowie S4MN4 N2c + S4MN4 N1 (Tab. 27) wurde jeweils eine Bande bei ~ 700 bp beobachtet (Abb. A 3). Die Assemblierung dieser beiden Contigs wurden im Anschluss über PCR und Sequenzierung mit den Primern MD1_End_F2 + MD1_End_R2 sowie MD1_Start_F1 + MD1_Start_R2 verifiziert. Das resultierende Genom aus 4 Contigs ≥ 1.000 bp und insgesamt 4.163.427 bp mit einem N_{50} von 4.147.987 bp wurde bei NCBI unter der Identifikationsnummer JACEGA01.1 öffentlich zugänglich gemacht.

Die 16S rRNA Gensequenz nach Amplifikation über PCR mit den Primern 616F und 630R konnte in Volllänge nur über Sanger-Sequenzierung mit den Primer 616F und 16S_MD1 sequenziert und assembliert werden (Clone Manager 9). Diese Sequenz ist unter der Identifikationsnummer MW180938 bei NCBI öffentlich zugänglich.

Phylogenie

16S rRNA Gensequenzanalysen ermöglichten die phylogenetische Einordnung von MD1 (Abb. 18). MD1 ist demnach zu *M. sibirica* P3M-3^T und *A. torta* FH052^T am nächsten verwandt. Evolutionär teilen sich MD1, P3M-3^T und FH052^T einen gemeinsamen Vorfahren mit Spezies des Genus *Herbinix*. Bootstrap für diese Verzweigung ist 84.

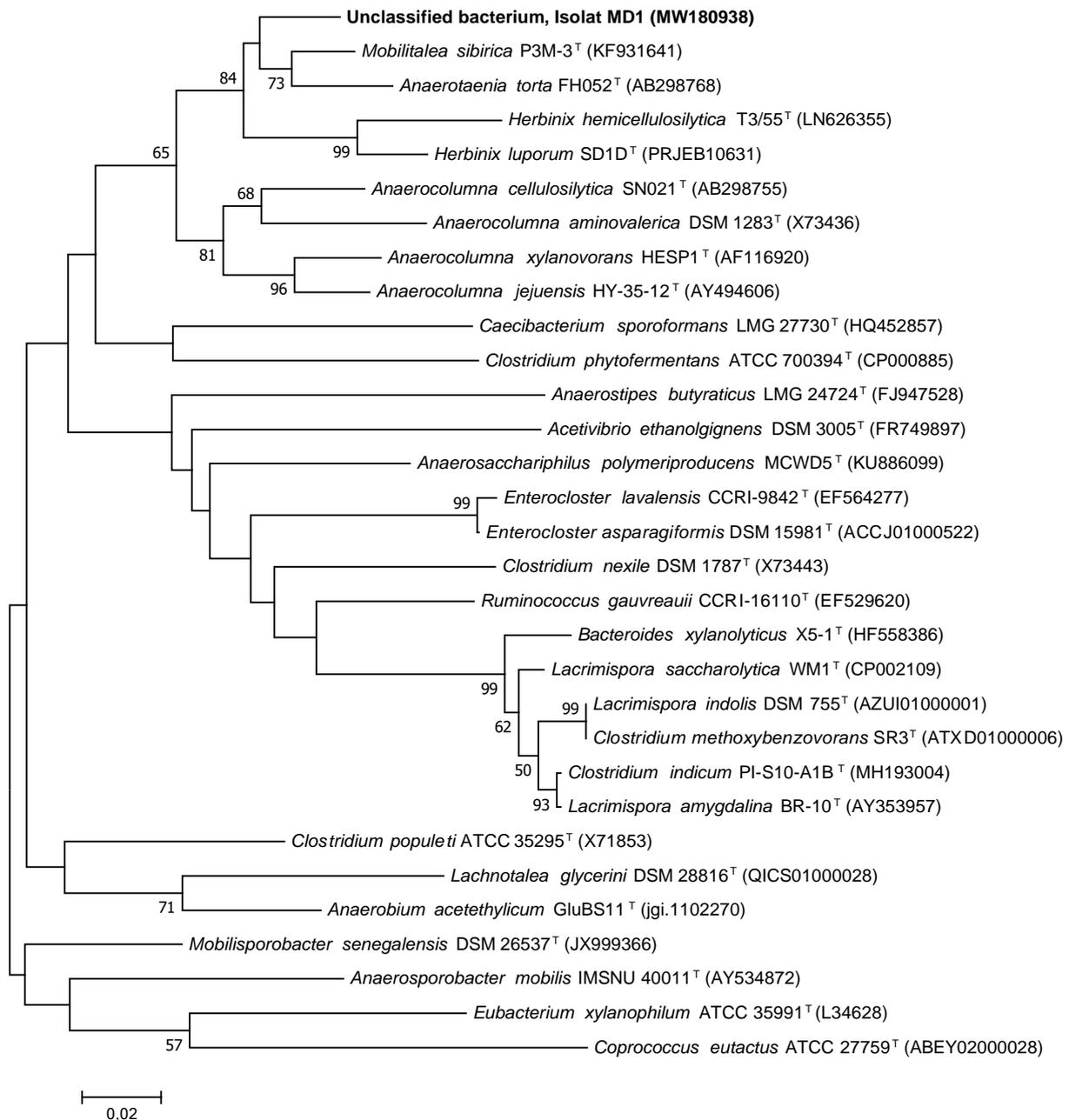


Abb. 18: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von MD1. Die 16S rRNA Gensequenzen wurden mit über MUSCLE aligniert und die phylogenetischen Distanzen mit 1.000 Wiederholungen (Felsenstein 1985) nach der *Maximum Likelihood* Methode (Felsenstein 1981) basierend auf dem Tamura-Nei Modell (Tamura und Nei 1993) in MEGA7 (Kumar et al. 2016) berechnet. Gezeigt ist der wahrscheinlichste Baum (highest log likelihood: -7859.74) zusammen mit der Wiederholbarkeit (>50) an den Verzweigungen. Balken, 0,02 Substitutionen. Die Analyse beinhaltet 31 16S rRNA Gensequenzen (Identifikationsnummern angegeben) mit einer Länge von 1.327 bp.

Phylogenetisch bestätigte die Analyse der kompletten Genomsequenz die Klassifizierung basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. MD1 zeigte die höchste Homologie zu *A. torta* FH052^T und teilt sich wiederum eine gemeinsame Verzweigung mit den Vertretern des Genus *Herbinix* (Abb. 19). Diese Verzweigungen werden von 72 bzw. 83 aus 92 analysierten Genen und jeweils einem Bootstrap-Wert von 100 unterstützt. Für *M. sibirica* P3M-3^T lag keine Genomsequenz vor (Stand Oktober, 2020).

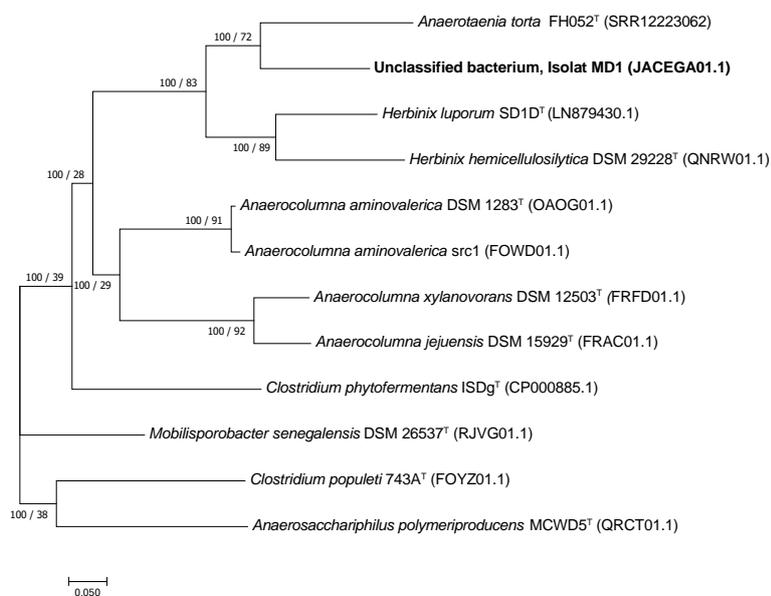


Abb. 19: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 up-to-date bacterial core genes in Genomsequenzen, von MD1. Der Baum wurde aus 12 Genome (Identifikationsnummern angegeben) über UBCG v3 (Na et al. 2018) berechnet. An den Verzweigungen ist die statistische Relevanz aus 1.000 Wiederholungen (Bootstrap), sowie die Anzahl an Genen die diese Topologie unterstützen (Gene Support Index, GSI) wie folgt angegeben: Bootstrap / GSI.

Die Assemblierung (SPAdes Galaxy Version 3.12.0) und Annotation (PROKKA Galaxy Version 1.14.5) des Genoms von *A. torta* FH052^T aus den Roh-Daten (verfügbar bei NCBI unter SRR12223062) ermöglichte neben der UBCG Phylogenie auch die Berechnung eines ANI-Wertes und des POCP. MD1 teilt sich, neben einem ANI-Wert von 70%, der deutlich unter dem Schwellenwert zur Spezies-Abgrenzung liegt, 50,58% der konservierten Proteine mit *A. torta* FH052^T (Tab. 49). Dieser Wert liegt knapp über dem von Qin et al. (2014) vorgeschlagenen Grenzwert von 50% zur Abgrenzung auf Genus-Ebene und widerspricht damit der Hypothese, MD1 als neuen Genus innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* einzuordnen. Die Genomsequenz von *M. sibirica* P3M-3^T könnte Aufschluss über die Klassifizierung von MD1 geben.

Tab. 49: Berechnung des POCP von MD1 zu *A. torta* FH052^T.

	<i>A. torta</i> FH052 ^T (SRR12223062)	MD1 (JACEGA01.1)
T	4.647	3.511
C	2.118	2.008
POCP	50.58%	

T, Anzahl Proteine; C, Anzahl konservierter Proteine

POCP = (C1+C2)/(T1+T2) nach Qin et al. (2014)

Physiologie

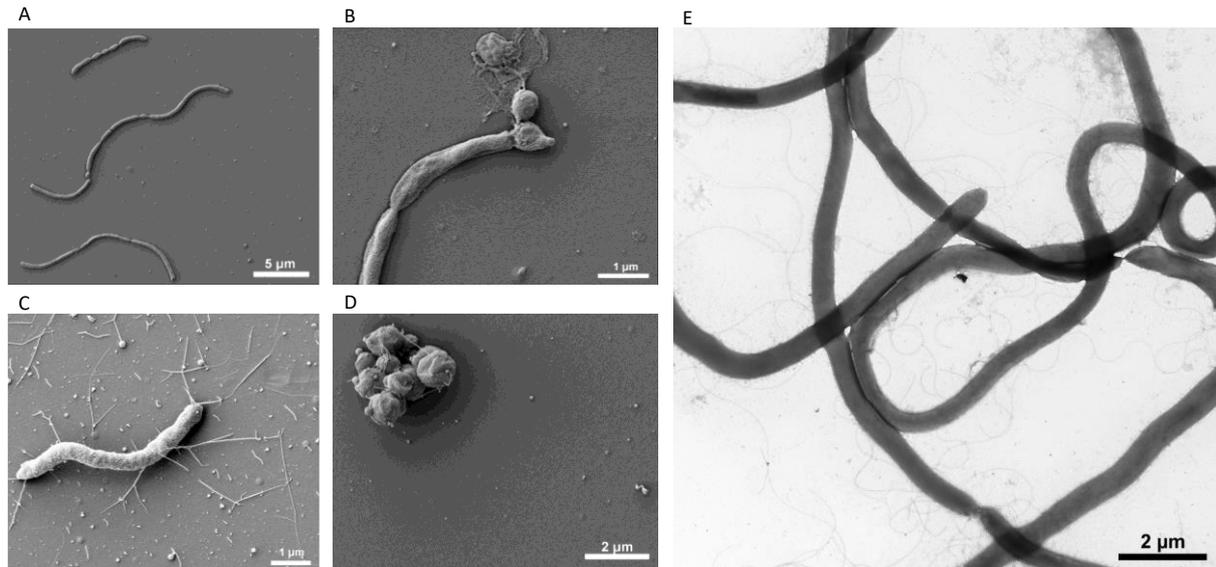


Abb. 20: Zellmorphologie von MD1. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Klingl, Dept. Biologie I – Botanik, LMU, Planegg-Martinsried, Deutschland erstellt. **A-D) SEM Aufnahmen** von MD1 nach 24 h bei 45 °C in 10 ml GS2+0,5% (w/v) Maltodextrin10 (A und C) oder 48 bei 45 °C in 10 ml GS2+0,5% (w/v) Maltodextrin10 (D) bzw. 0,5% (w/v) Cellobiose (B); **E) TEM Aufnahme** von MD1 nach 24 h bei 45 °C in 10 ml GS2+0,5% (w/v) Maltodextrin10.

Das Isolat MD1 ist polymorph, wird aber in vitaler Form zumeist als nicht-beweglich, stäbchen-förmig in langen, gebogenen Ketten beobachtet (Abb. 20). Die TEM-Aufnahmen (Abb. 20, E) deuten auf das Vorhandensein von Flagellen hin. Physiologische Charakterisierungen deuten auf optimale Wachstumsbedingungen von MD1 bei 40 °C, pH 7.1 mit bis zu 1% (w/v) zusätzlichem NaCl in GS2 Medium hin. Aus 20 getesteten C-Quellen (0,5% w/v) konnten die Monosaccharide Arabinose, Galactose, Glucose und Xylose, die Disaccharide Cellobiose, Lactose und Maltose, sowie die Polysaccharide Maltodextrin10, Stärke und Xylan verwertet werden. Dabei produzierte MD1 hauptsächlich Isopropanol und Essigsäure als flüchtige Metabolite. Wachstum in GS2 Medium ohne zusätzliche C-Quelle oder mit den C-Quellen Cellulose in Form von Filterpapier oder PASC, Fructose, Mannose, Saccharose, Trehalose oder Pektin wurde nicht beobachtet. MD1 wurde als Gram-negativ mit einem Peptidoglykan-Typ A1γ-meso-Dpm-direkt klassifiziert. Die abundanten zellulären Fettsäuren (>5%) sind in Tab. 50 aufgeführt.

Tab. 50: Zelluläre Fettsäuren (>5%) von MD1 kultiviert in GS2 Medium + 0,5% (w/v) Cellobiose, pH 7.1 nach 24 h bei 40 °C.

Fettsäure	Relative Abundanz
C _{14:0} FAME	6,38%
C _{14:0} DMA	16,05%
C _{16:0} FAME	35,31%
C _{16:1} CIS 9 DMA	7,48%
C _{16:0} DMA	7,73%
C _{18:1} CIS 11 DMA	8,45%

Die Analyse wurde bei DSMZ, Braunschweig, Deutschland nach TSBA40, Calc. ANAER6 durchgeführt: *Total Response*, 337.112; *Percentage Named*, 97,46. Der Abgleich mit der Referenzdatenbank BHIBLA ergab keinen Treffer.

Funktionelle Analyse der Genomsequenz

Die automatische Annotation der Genomsequenz von MD1 mit PGAP Version 4.12 (21.07.2020) resultierte in 3.511 kodierende Gene und 71 RNA Gene (52 tRNAs, 5 komplette rRNA Operone aus 5S, 16S und 23S, und 4 non-coding RNAs). Weiterführend ermöglichte die automatische Annotation die Analyse vorhandener Stoffwechselwege, sowie CAZymes.

Die KEGG Annotation via BlastKOALA (durchgeführt am 13.08.2020) der 3.511 kodierenden Gene war für 53,4% (1.875) Proteine erfolgreich. Daraus konnten insgesamt elf Kohlenhydrat-Stoffwechselwege (Tab. A 5) und drei Energie-Stoffwechselwege (Kohlenstoff-Fixierung, Stickstoff-Fixierung und ATP Synthese) komplett rekonstruiert werden. Die hohe Anzahl an Kohlenhydrat-Stoffwechselwegen korreliert mit der beobachteten saccharolytischen Lebensform. Zudem wurden 50 Proteine der bakteriellen Motilität zugeordnet. Dies könnte die elektronenmikroskopische Beobachtung von Flagellen bestätigen (Abb. 20, E).

Insgesamt wurden 97 CAZymes via dbCAN2 in den Proteinsequenzen von MD1 identifiziert. Für nur vier der potentiellen CAZymes wurde ein Signalpeptid vorhergesagt. Nur diese CAZymes können demnach in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Diese vier Proteinen beinhalten nach HMMER und Diamond Annotation eine GH18, eine GH13, eine CE1+GH10 mit mehreren CBM9 Modulen, sowie eine CE4. Nach CAZy.org deuten diese CAZymes auf Chitinase Aktivität (GH18), α -Amylase Aktivität (GH13 Subfamilie 36), Xylanase Aktivität (GH10) und Acetyl-Xylan-Esterase Aktivität (CE4) hin (Stand 13.10.20). Ein Vergleich der Proteinsequenzen dieser vier Enzyme über BLASTP mit der NCBI Datenbank deutet auf Homologie zu Proteinen von *Mobilisporobacter senegalensis*, *Herbinix hemicellulosilytica* und *Herbinix luporum* hin (Tab. 51). Intrazellulär wurde eine Vielzahl an CAZymes annotiert. Die insgesamt 93 Proteine setzen sich aus 62 GHs, 26 GTs und 5 CEs zusammen. Innerhalb der GHs ist die Familie GH2, welche auf β -Galactosidase Aktivität hindeuten kann (cazy.org, 13.10.20), mit sieben Vertretern am abundantesten, gefolgt von GH43 (β -Xylosidase Aktivität; cazy.org, 13.10.20)

mit sechs Vertretern und GH51 (Endoglucanase Aktivität; cazy.org, 13.10.20) mit fünf Vertretern (Tab. A 6).

Tab. 51: BLASTP Analyse der CAZymes mit Signalpeptid, identifiziert über dbCAN2 (Zhang et al. 2018a), von MD1.

dbCAN2 Analyse			BLASTP Analyse		
Protein ID	HMMER	DIAMOND	Bester Treffer [Proteinname, Organismus]	ID	Übereinstimmung [%]
MBB2182 410.1	GH18	GH18	Ig-like domain-containing protein, <i>Mobilisporobacter senegalensis</i>	WP_17016 4338.1	56,23
MBB2182 564.1	GH13_36	GH13_36	hypothetical protein, <i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	WP_10320 3143.1	65,98
MBB2183 261.1	CBM9+CBM9+CE1+C BM9+GH10	CBM9+CE1 +GH10	endo-1,4-beta-xylanase, <i>Herbinix luporum</i>	WP_05825 8264.1	77,58
MBB2184 454.1	CE4	CE4	polysaccharide deacetylase family protein, <i>Mobilisporobacter senegalensis</i>	WP_12361 0534.1	75,66

ID, Identifikationsnummer

3.2.4 Zusammenspiel von *Defluviitalea raffinosedens* 249c-K6 mit *A. thermocellus* in einer cellulolytischen Mischkultur

Isolierung und Charakterisierung

Die Arbeiten zur Bewertung der Kultivierungsmethoden resultierten neben Reinkulturen auch in cellulolytischen Mischkulturen. Im Detail wurde in den Kulturen GR20_GR1, GR20_MN2, GS2.5GR_T4, GS2_QR3 und GS2_MN3 über 16S rRNA Amplikonsequenzierung OTUs mit Homologie zu Vertretern des Genus *Defluviitalea* mit bis zu 91,3% relativer Abundanz detektiert (Tab. A 7). Demnach sind *Defluviitalea* Spezies in cellulolytischen Co-Kulturen aller verwendeten Medien vertreten. (Rettenmaier et al. 2019a)

Das häufige Auftreten und die hohe Abundanz von Vertretern des Genus *Defluviitalea* in diesen Mischkulturen deutete auf ein synergistisches Zusammenspiel mit den bekannten cellulolytischen Organismen *H. hemicellulosilytica* oder *A. thermocellus* hin. Weiterführende Isolierungsversuche resultierten in mehreren Reinkulturen verschiedener *A. thermocellus* Isolate. Aus GS2.5GR_T4 wurde über den Wechsel des Medium zu GS2 eine stabile Co-Kultur aus *A. thermocellus* und *D. raffinosedens*, genannt 253-K6, isoliert. Weiterführend konnte daraus über den Wechsel der C-Quelle zu Xylose *D. raffinosedens* in Reinkultur, genannt 249c-K6, isoliert werden. *D. raffinosedens* kann, im Gegensatz zu *A. thermocellus* (Koeck et al. 2015a), die Pentose Xylose für den Energiestoffwechsel nutzen (Ma et al. 2017). Somit wurde über mehrmaliges Vereinzeln und Überimpfen gewährleistet, keine

A. thermocellus Kontamination in 249c-K6 mehr vorzufinden. Die 16S rRNA Gen-Sequenz des Isolates 249c-K6, öffentlich zugänglich in der NCBI Datenbank unter der Identifikationsnummer MN744427, hat 99,86% Übereinstimmung zu *D. raffinosedens* A6^T. 16S rRNA Identitäten zu anderen Spezies innerhalb dieses Genus ist deutlich unterhalb des Schwellenwerts zur Spezies-Abgrenzung (96,47% zu *D. saccharophila* LIND6LT2^T bzw. 94,35% zu *D. phaphyphila* Alg1^T). Das Isolat 249c-K6 kann demnach eindeutig der Spezies *D. raffinosedens* zugeordnet werden. (Rettenmaier et al. 2020c)

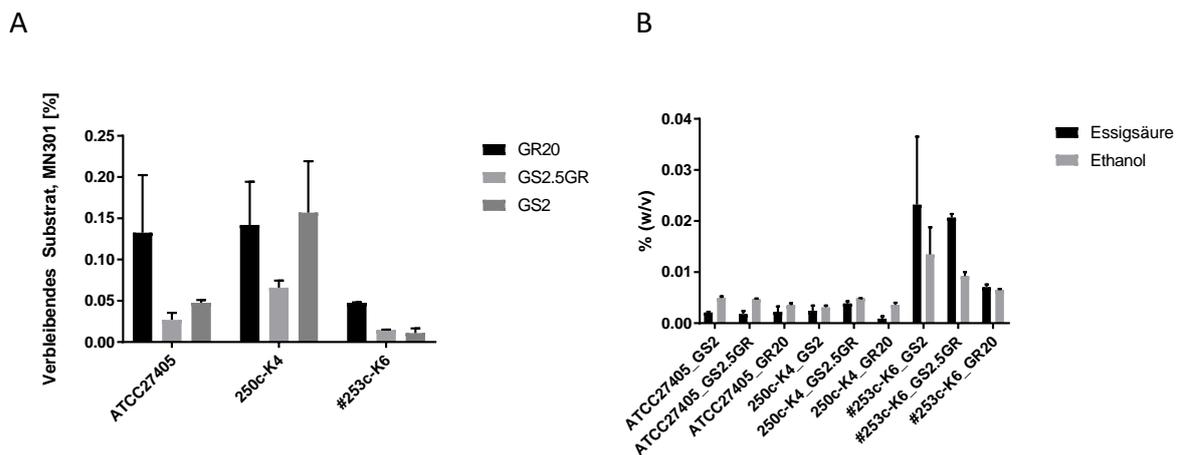


Abb. 21: Charakterisierung von *D. raffinosedens* in Co-Kultur mit *A. thermocellus* nach Rettenmaier et al. (2020c). **A)** Bestimmung des verbleibenden Substrates und **B)** Bestimmung flüchtigen Metabolite mittels GC von *A. thermocellus* Isolaten (hier: 250c-K4) im Vergleich zum Typstamm *A. thermocellus* ATCC27405^T, sowie der Co-Kultur #253c-K6 (*A. thermocellus* mit *D. raffinosedens*). Alle Kulturen wurden in biologischen Duplikaten in drei verschiedenen Medien mit 0,2% (w/v) Cellulose Pulver MN301 angezogen. Die Daten wurden auf eine Inkubationszeit von zwei Tagen normalisiert. Gezeigt werden die Teilabbildungen A) und B) nach Übersetzung auf Deutsch.

Nach Rettenmaier et al. (2020c) ist *D. raffinosedens*, Isolat 249c-K6, wie aus der Stamm-Charakterisierung von Ma et al. (2017) zu erwarten, zwar nicht cellulolytisch, jedoch saccharolytisch. Es wurde gezeigt, dass die Präsenz dieses saccharolytischen Organismus einen starken Einfluss auf die Cellulose-Hydrolyse cellulolytischer Organismen, hier *A. thermocellus*, hatte. In allen drei getesteten Medien konnte die Co-Kultur aus *A. thermocellus* und *D. raffinosedens* deutlich mehr Cellulose in Form von Cellulose Pulver MN301 hydrolysieren als Reinkulturen von *A. thermocellus* (Isolat 250c-K4 und ATCC 27405^T; Abb. 21, A). Parallel dazu produziert die Co-Kultur deutlich mehr der auch für den Biogas Prozess bedeutenden flüchtigen Metabolite Essigsäure und Ethanol (Abb. 21, B).

Genomsequenzierung

Die Genomsequenz von *D. raffinosedens* wurde am ZIEL—Institute for Food & Health, Core Facility Microbiome, TU München, Freising Deutschland mittels Illumina HiSeq 2500 im PE150 Modus sequenziert und über SPAdes v3.11.1 assembliert. Die Assemblierung resultierte in 31 Contigs mit einer Gesamtlänge von 3.092.124 bp und einem GC Gehalt von 35.67 mol% und ist unter der Identifikationsnummer PRJNA591875 in der NCBI Datenbank öffentlich zugänglich. Nach Rettenmaier

et al. (2020c) repräsentiert diese Genomsequenz das erste Genom dieser Spezies und das zweite Genom innerhalb des Genus *Defluviitalea*. Die phylogenetische Einordnung über 16S rRNA Gensequenz-Identität wird basierend auf der kompletten Genomsequenz bestätigt. Innerhalb 14 Referenzorganismen ist das Genom von *D. phaphyphila* Alg1^T am ähnlichsten zu 249c-K6 (Abb. 22).

Die automatische Annotation der Genomsequenz von 249c-K6 mit PGAP Version 4.10 (12.12.2019) resultierte in 2.806 kodierenden Genen und 86 RNA Genen. Die funktionelle Analyse hinsichtlich der Existenz von CAZymes identifizierte nach Rettenmaier et al. (2020c) insgesamt 53 CAZymes, davon 32 GHs und davon wiederum nur 6 GHs mit Signalpeptid.

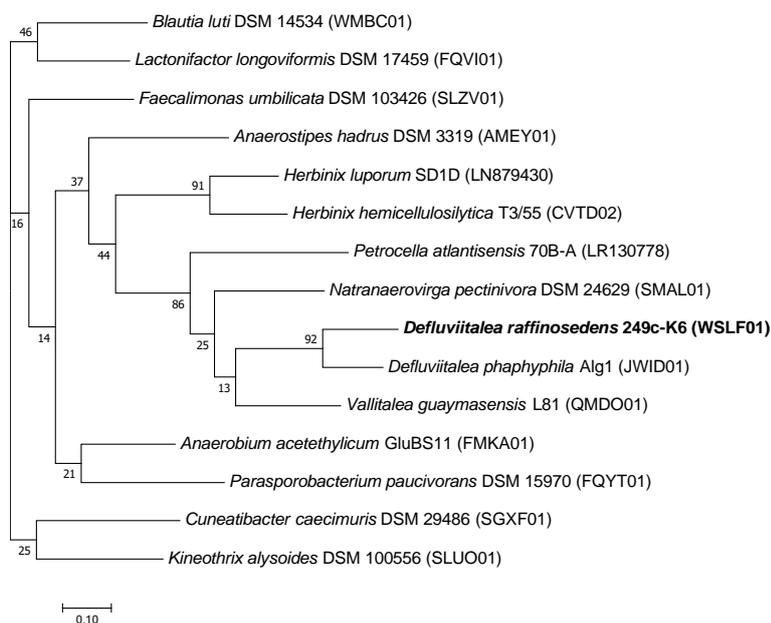


Abb. 22: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 up-to-date bacterial core genes in Genomsequenzen, von *D. raffinosedens* 249c-K6 nach Rettenmaier et al. (2020c), Figure 1. Der Baum wurde aus 15 Genome (Identifikationsnummern angegeben) über UBCG Version 3 (Na et al. 2018) berechnet. An den Verzweigungen ist die statistische Relevanz aus 1.000 Wiederholungen (Bootstrap), sowie die Anzahl an Genen die diese Topologie unterstützen (Gene Support Index, GSI) wie folgt angegeben: Bootstrap / GSI.

Defluviitalea spp. in Biogasanlagen

Amplikonsequenzierungen der bakteriellen 16S rRNA Gene, Region V6-V8 der Biogasfermenter, aus denen 249c-K6 isoliert wurde, ermöglichten die Abschätzung der relativen Abundanz von *Defluviitalea* spp. in diesen thermophil betriebenen Fermentern sowie den Vergleich zum mesophilen Fermenterbetrieb. OTUs mit Ähnlichkeit zu *Defluviitalea* wurden ausschließlich im thermophilen Fermenterbetrieb mit einer relativen Abundanz von 0,003-1,310 in DNA oder cDNA detektiert (Tab. A 8). Die höchste Abundanz wurde in cDNA des Fermenters T2 unter hoch-effizienten Prozessbedingungen festgestellt. Somit könnte die transkriptionelle Aktivität von *Defluviitalea* spp. mit der Effizienz des Biogasprozesses korrelieren. (Rettenmaier et al. 2020c)

Der Abgleich der Genomsequenz von 249c-K6 mit der öffentlich zugänglichen Datenbank ‚biogas microbiome‘ nach Campanaro et al. (2020) ermöglichte die Zuordnung eines MAG zur Spezies *D. raffinosedens*. Der MAG METABAT AS04akNAM 106, assembliert aus dem Metagenom eines im Labor-Maßstab bei 55 °C mit Acetat und Hefe-Extrakt betriebenen Biogasreaktors, hat einen ANI-Wert von 99.5% zur Genomsequenz von 249c-K6 und kann demnach eindeutig derselben Spezies zugordnet werden. (Rettenmaier et al. 2020c)

3.2.5 *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., MA18^T

Isolierung

Das Isolat MA18^T wurde zuerst aus dem mesophilen Fermenterbetrieb 2017 in GR20 Medium isoliert. 16S rRNA Gensequenzanalysen deuteten auf eine neue Spezies innerhalb des Genus *Ruminiclostridium* hin. Die höchste Übereinstimmung wurde mit 97,23% zu *R. sufflavum* beobachtet.

Eine stabile Kultivierung in Reinkultur wurde im Rahmen der Masterarbeit von Scheitz (2019) erreicht und ermöglichte die weiterführende physiologische Charakterisierung und Genomsequenzanalysen von Kowolik (2020). Interessanterweise wurde in 2019 erneut ein Isolat (MS-GR11.1) derselben Spezies aus dem mesophilen Fermenterbetrieb in GR20 Medium isoliert (Schmidt 2019).

Das Isolat MA18^T = DSM 109966^T = JCM 39124^T wurde demzufolge als *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov. im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* beschrieben. Relevante Ergebnisse aus Rettenmaier et al. (2021) werden im Folgenden erneut beschrieben.

Sequenzierung und Phylogenie

16S rRNA Gensequenzanalysen ermöglichten die phylogenetische Einordnung von MA18^T (Abb. 23 nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 1). MA18^T ist demnach Teil eines Clusters mit allen bekannten Spezies des Genus *Ruminiclostridium* und hat zudem einen gemeinsamen Vorfahren mit dem nächstverwandten Organismus *R. sufflavum* CDT-1^T = DSM 19573^T. Bootstrap für diese Verzweigung ist 90.

Die Genomsequenz von MA18^T wurde über die PacBio RSII Technologie sequenziert (Novogene, UK) und die Assemblierung über SMRT portal Version 3.2.0 resultierte in einem zirkulären Genom der Länge 4.817.678 bp mit einem GC-Gehalt von 33,16 mol%. Die phylogenetische Analyse basierend auf der kompletten Genomsequenz bestätigte die vorangegangene Analyse basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. Die Genomsequenz von MA18^T ist basierend auf 89 von 92 analysierten Genen am ähnlichsten zur Genomsequenz von *R. sufflavum* DSM 19573^T (Abb. 24). Des Weiteren wird über 90 aus 92 analysierten Genen auch die Einordnung von MA18^T zum Genus *Ruminiclostridium* bestätigt.

Der ANI-Wert dieser beiden Genome ist 76,88% und unterstützt somit die Abgrenzung von MA18^T als neue Spezies.

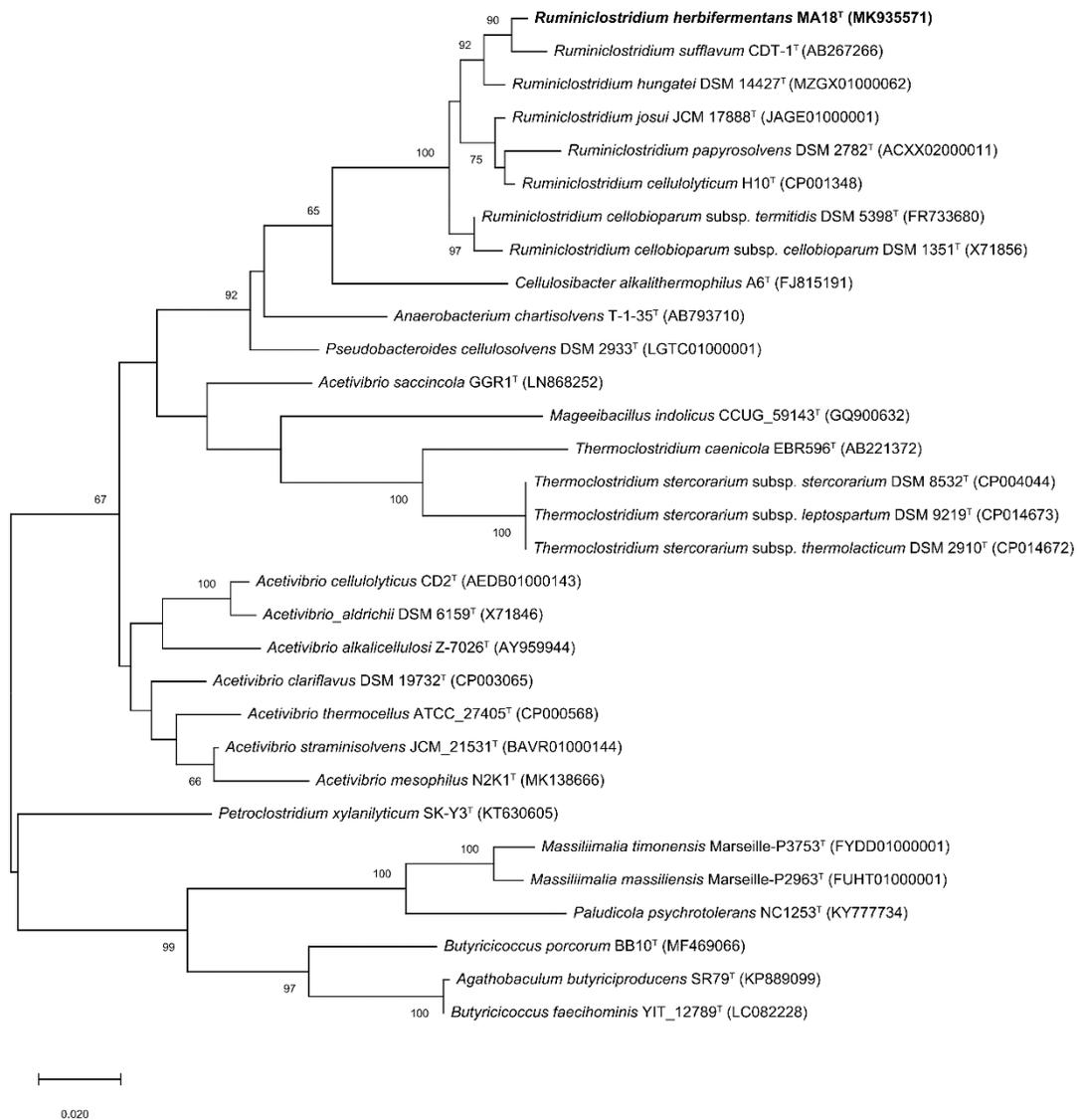


Abb. 23: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von MA18^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 1. Die 16S rRNA Gensequenzen wurden mit über MUSCLE aligniert und die phylogenetischen Distanzen mit 1.000 Wiederholungen (Felsenstein 1985) nach der *Maximum Likelihood* Methode (Felsenstein 1981) basierend auf dem Tamura-Nei Modell (Tamura und Nei 1993) in MEGAX (Kumar et al. 2018) berechnet. Gezeigt ist der wahrscheinlichste Baum (highest log likelihood: -8409.12) zusammen mit der Wiederholbarkeit (>50) an den Verzweigungen. Balken, 0,02 Substitutionen. Die Analyse beinhaltet 31 16S rRNA Gensequenzen (Identifikationsnummern angegeben) mit einer Länge von 1.315 bp.

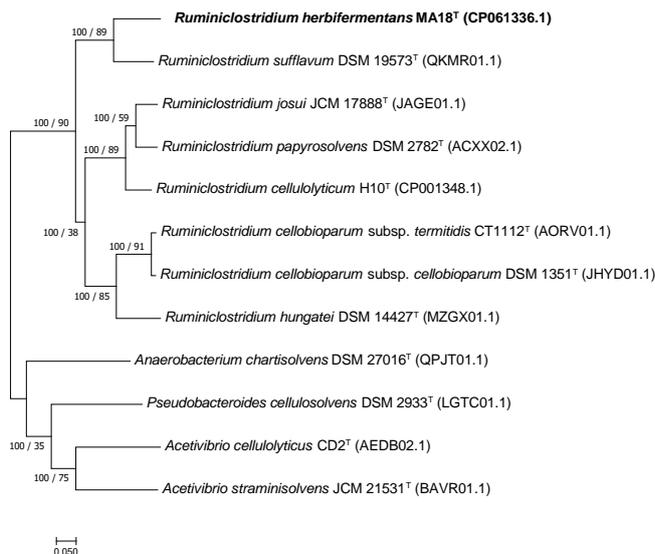


Abb. 24: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 up-to-date bacterial core genes in Genomsequenzen, von MA18^T. Der Baum wurde aus 12 Genome (Identifikationsnummern angegeben) über UBCG Version3 (Na et al. 2018) berechnet. An den Verzweigungen ist die statistische Relevanz aus 1.000 Wiederholungen (Bootstrap), sowie die Anzahl an Genen die diese Topologie unterstützen (Gene Support Index, GSI) wie folgt angegeben: Bootstrap / GSI.

Physiologie

Die Arbeiten von Kowolik (2020) beschreiben MA18^T als mesophile bis moderat thermophile, cellulolytische und xylanolytische Spezies. Zellen von MA18^T sind leicht gebogene, bewegliche Stäbchen, die einzeln oder gepaart auftreten (Abb. 25) und Sporen bilden können. Optimales Wachstum wurde bei 40-48 °C (Bereich 20-55 °C) und neutralem pH (pH 6,5-8,5; Bereich 6,0-8,5) beobachtet. MA18^T wurde hauptsächlich Gram-negativ gefärbt und verhielt sich auch im KOH-Test Gram-negativ. Chemotaxonomische Analysen wiesen den Peptidoglykan-Typ A1γ-meso-Dpm-direkt nach, welcher charakteristisch für Gram-negative Organismen ist (Schleifer und Kandler 1972). Des Weiteren wurden hauptsächlich die zellulären Fettsäuren C_{14:0} ISO FAME, C_{15:0} ANTEISO FAME und C_{15:0} ISO DMA detektiert.

Die Substrate Arabinose, Ribose, Cellobiose, Cellulose in Form von Filterpapier und PASC, und Xylan wurden zu den Stoffwechselprodukten Essigsäure und Ethanol vergoren. Nicht verstoffwechselt wurden die C-Quellen Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Maltodextrin 10, Mannose, Pektin und Stärke. DC Analysen zeigten, dass MA18^T bei Wachstum auf Cellobiose Glucose sekretierte. Glucose-Sekretion bei Wachstum auf Cellulose wurde auch für *A. thermocellus* beschrieben (Özpinar und Özkan 2007). MA18^T könnte demnach, ähnlich wie in den Beobachtungen zu „3.2.4 Zusammenspiel von *Defluviitalea raffinosedens* 249c-K6 mit *A. thermocellus*“, synergistisch mit Glucose-verwertenden Organismen in seinem natürlichen Habitat, dem Biogasfermenter, zusammenspielen.

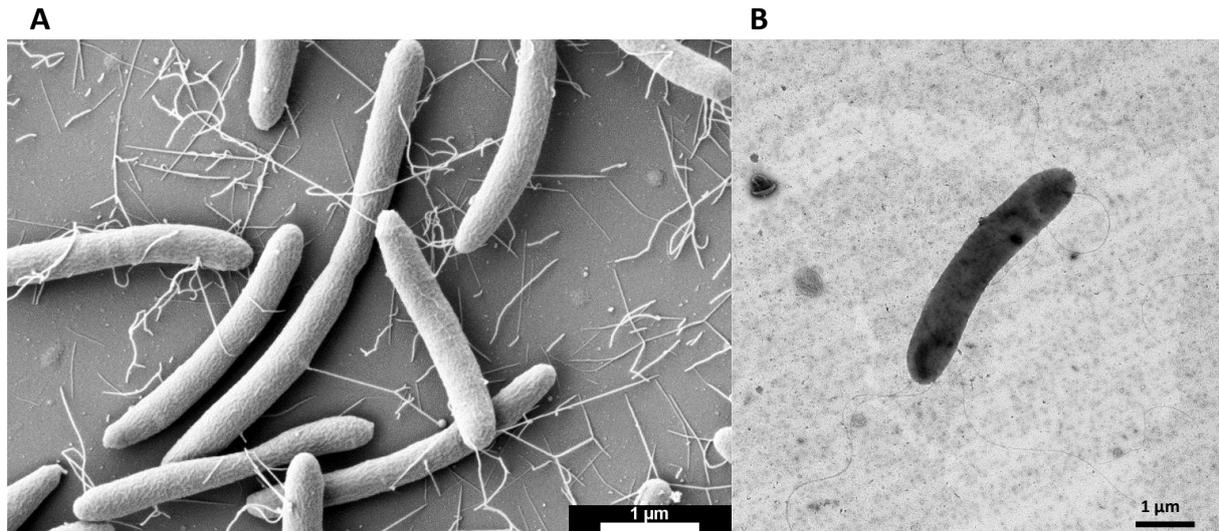


Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von MA18^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 5 B) und C). A) SEM-Aufnahme nach Kultivierung mit 0,5% (w/v) Cellobiose (2 d, 40 °C). B) TEM-Aufnahme nach Kultivierung mit 0,5% (w/v) FP (5 d, 40 °C). Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Klingl, Dept. Biologie I – Botanik, LMU, Planegg-Martinsried, Deutschland erstellt. Balken, 1 µm.

Funktionelle Analyse der Genomsequenz

Die automatische Annotation der Genomsequenz von MA18^T mit PGAP Version 4.12 (13.09.2020), öffentlich zugänglich in der NCBI Datenbank unter der Identifikationsnummer CP061336.1, resultierte in 3.707 Protein-kodierenden Genen und 79 RNA-Genen, davon 5 rRNA Operons.

Die automatische Annotation von CAZymes detektierte 134 Gene, darunter 64 putative, extrazelluläre GHs (Tab. A 9). Am häufigsten vertreten waren GHs der Familien 43, 5 und 9, welche nach cazy.org Enzyme der Klassen Xylosidase, endo-β-1,4-Glucanase oder Endoglucanasen beinhalten (Tab. 52). Dies unterstützt die zuvor beschriebene cellulolytische und xylanolytische Lebensweise.

Die Detektion von Dockerin-Modulen deutete auf cellulosomale Organisation hin. Dassa et al. (2017) beschrieb eine charakteristische Organisation der cellulosomal Gen-Cluster in mesophilen *Clostridien*. Auch für das Isolat MA18^T konnte ein solches cellulosomales Gencluster identifiziert werden, welches am ähnlichsten zum Cluster von *R. sufflavum* war (Abb. 26). In diesem Cluster sind analog zu *R. sufflavum* Gene in räumlicher Nähe zu den cellulosomal Strukturproteinen (*cip*, *cellulosome-integrating protein*) angeordnet, die für GHs der Familien 9, 5, 8 und 48 kodieren. Interessanterweise enthält dieses Cluster im Genom von MA18^T die beiden einzigen Gene, die für GH48 Enzyme kodieren, welche die Klasse der *reducing end-acting* Cellobiohydrolasen zusammenfasst (Lombard et al. 2014) und damit auch entscheidend für den Abbau kristalliner Cellulose sind (Koeck et al. 2014a). Zudem umfasst das Gen-Cluster von MA18^T vier, anstatt wie bei *R. sufflavum* zwei, Cips. Dies könnte auf eine besonders hohe Aktivität hinsichtlich des Abbaus von Cellulose oder Hemicellulose hindeuten und korreliert mit den physiologischen Beobachtungen zu diesem Isolat.

Tab. 52: Abundante GH-Familien, vorhergesagt für Isolat MA18^T via dbCAN2 (Zhang et al. 2018a), und deren mögliche Enzymklassen nach Lombard et al. (2014).

Protein-IDs	GH-Familie	Putative Enzymklasse (cazy.org)
<ul style="list-style-type: none"> • QNU65851.1_2579 • QNU66658.1_3479 • QNU66660.1_3481 • QNU67712.1_855 • QNU68671.1_1917 • QNU68673.1_1919 	GH43	β-xylosidase (EC 3.2.1.37); α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); xylanase (EC 3.2.1.8);
<ul style="list-style-type: none"> • QNU65955.1_2697 • QNU66059.1_2812 • QNU66064.1_2817 • QNU66065.1_2818 • QNU67298.1_352 • QNU67685.1_821 	GH5	endo-β-1,4-glucanase / cellulase (EC 3.2.1.4); endo-β-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8); β-glucosidase (EC 3.2.1.21);
<ul style="list-style-type: none"> • QNU65468.1_2149 • QNU65790.1_2507 • QNU66061.1_2814 • QNU66062.1_2815 • QNU67290.1_341 • QNU67291.1_342 • QNU67293.1_344 • QNU67294.1_346 • QNU67297.1_350 • QNU67895.1_1056 • QNU68135.1_1324 • QNU68136.1_1325 • QNU68137.1_1326 • QNU68703.1_345 • QNU68902.1_2880 	GH9	endoglucanase (EC 3.2.1.4); endo-β-1,3(4)-glucanase / lichenase-laminarinase (EC 3.2.1.6); β-glucosidase (EC 3.2.1.21);

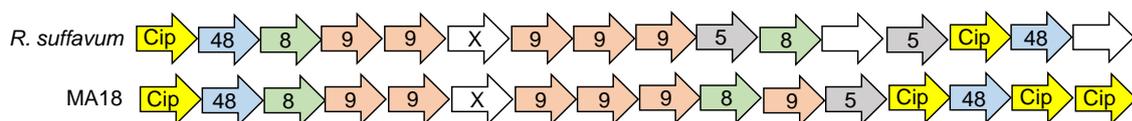


Abb. 26: Anordnung des cellulosomal Gen-Clusters von MA18^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 3. Gezeigt wird nur MA18^T nach Rettenmaier et al. (2021) im Vergleich zu *R. sufflavum* nach Dassa et al. (2017). Die Graphik für MA18^T visualisiert die Anordnung folgender Proteine lcl|CP061336.1_prot_QNU67288.1_338, _QNU67289.1_339, _QNU68702.1_340, _QNU67290.1_341, _QNU67291.1_342, _QNU67293.1_344, _QNU68703.1_345, _QNU67294.1_346, _QNU67295.1_347, _QNU67297.1_350, _QNU67298.1_352, _QNU67299.1_353, _QNU67300.1_354, _QNU67301.1_356, _QNU67302.1_357, siehe auch Tab. A 9.

Die Einteilung des damals breit gefächerten Genus *Clostridium* wurde hier bereits vorgestellt. Spezies der *Clostridium* Group I nach Dassa et al. (2017) werden in der bereits 2013 von Yutin und Galperin vorgeschlagene Reklassifizierung einiger *Clostridium* spp., inklusive bekannter cellulolytischer Vertreter, der Gattung *Ruminiclostridium* zugeteilt. Diese auf Genomsequenzanalysen basierende Umbenennung der *Clostridium* Group I zu *Ruminiclostridium* spp. wurde allerdings erst durch Zhang et al. (2018b) valide (Oren und Garrity 2019). Basierend darauf ordnet die Genomsequenz-Analyse von MA18^T diese Spezies eindeutig dem Genus *Ruminiclostridium* zu.

Einordnung in den Biogasprozess

Die Isolierung von MA18^T aus zwei unabhängigen, aber ähnlich durchgeführten Fermenterbetrieben (2017 und 2019 bei LFL-ILT) deuten auf einen Zusammenhang der Hydrolyse des Roh-Substrates (jeweils Maissilage), der Prozesstemperatur (jeweils 38 °C) und dem Auftreten von MA18^T hin. Die Arbeit von Schmidt (2019) analysierte deshalb PCR-basiert die relative Abundanz von MA18^T in Anreicherungskulturen sowie DNA und RNA des Biogasfermenters. Der spezifische Nachweis des Isolates mit den Primern F_MA18_16S und R_MA18_16S ermöglichte den Nachweis in der Anreicherungskultur MS1-GRII-GR20. 16S rRNA Amplikon-Analysen der Anreicherungskulturen (PRJNA674481 und PRJNA674617) deuteten auch auf eine relativ hohe Abundanz [22,7%; siehe Anhang „16S rRNA Amplikon, V3-V4, mit 100% Übereinstimmung zu *Ruminiclostridium herbifermentans*, MA18^T aus Analyse der Anreicherungskulturen 2019 (Schmidt 2019) “] dieser Spezies in MS1-GRII-GR20, aus der auch das Isolat MS-GRII.1 gewonnen werden konnte, hin. In allen weiteren mesophilen Anreicherungskulturen konnte das Isolat nicht spezifisch über PCR nachgewiesen werden und die 16S rRNA Amplikon-Analysen deuteten auf eine geringe relative Abundanz bzw. Abwesenheit von Spezies des Genus *Ruminiclostridium* hin (2,8-3,0% in MI-GR-II-GR20 und MS1-GR1-GS2.5GR; <0,25% in allen anderen Anreicherungen). In den 16S rRNA Amplikon-Sequenzen des Fermenterbetriebes (siehe „Bakterielle Diversität und deren transkriptionelle Aktivität in Biogasfermentern mit verschiedenen Prozessbedingungen“) konnten Spezies-spezifische zOTUs weder in DNA noch in cDNA über BLASTN Abgleich mit der 16S rRNA Gensequenz von MA18^T (MK935571) detektiert werden.

Die Anreicherung und Isolierung der Isolate MA18^T und MS-GRII.1 basierten jeweils auf dem Inokulum GR mit GR20 als Medium. Dies verdeutlicht, wie bereits in Rettenmaier et al. (2019a) beobachtet, die Bedeutung der Imitation des natürlichen Habitats, welche vor allem für den ersten Kultivierungsschritt entscheidend scheint. Im Zuge der Isolierung und Charakterisierung von MA18^T in Zusammenarbeit mit Scheitz (2019) und Kowolik (2020) wurde beobachtet, dass für eine stabile Kultivierung von MA18^T GR in geringen Mengen (1-2,5% v/v) supplementiert zu GS2 einen positiven Effekt auf die Vitalität des Isolates hat.

3.2.6 *Clostridium sartagoforme* (in Co-Kultur mit *Ruminiclostridium josui*)

Isolierung und Identifizierung

Der Organismus *Clostridium sartagoforme* wurde sowohl aus dem mesophilen Fermenterbetrieb 2017 (Isolat MA7), als auch in 2019 (Isolate MS-GR II.2 und MI-GR III.3; Schmidt (2019)) aus Anreicherungskulturen inokuliert mit GR in allen drei Medien mit Filterpapier als C-Quelle isoliert. Die Isolate MA7 (GS2), MS-GR II.2 (GR20) und MI-GR III.3 (GS2.5GR) haben >99% 16S rRNA Gensequenz Übereinstimmung zu *Clostridium sartagoforme* JCM 1413^T und können demnach eindeutig diesem Organismus zugeordnet werden. Repräsentativ wurde das Isolat MA7 weiter analysiert und die entsprechende 16S rRNA Gensequenz bei NCBI unter der Identifikationsnummer MW229081 veröffentlicht.

Nathani et al. (2016) beschreibt die erste Genomsequenz eines *C. sartagoforme* Isolates (hier: AAU1) und stellt die Rolle dieses Organismus bei der anaeroben Fermentation von Cellulose und Chitin heraus. Allerdings wurden im Genom von AAU1 keine der nach Koeck et al. (2014a) relevanten Cellulasen beschrieben. In der Arbeit von Gerbaulet (2019) wurde nach der cellulolytischen Komponente von *C. sartagoforme* geforscht. Hierbei wurde beobachtet, dass das Isolat MA7 in einer cellulolytischen (MA7c) und einer nicht cellulolytischen Form (MA7nc) vorliegen kann.

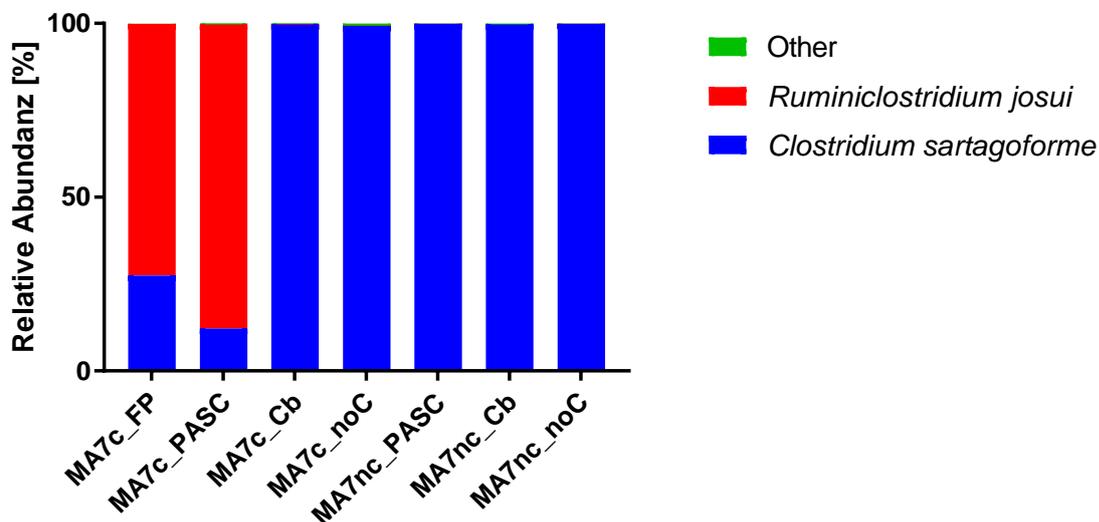


Abb. 27: Zusammenfassung der 16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4 mit DNA isoliert aus MA7c und MA7nc. Analysiert wurde MA7c und MA7nc kultiviert bei 37 °C in GS2 Medium mit verschiedenen C-Quellen (FP, 0,5%; PASC, 0,5%; Cb, 0,5% jeweils w/v oder ohne C-Quelle (noC)). Die Auswertung der Sequenzier-Daten erfolgte mit IMNGS.org (Lagkouravdos et al. 2016) für OTUs mit einer relativen Abundanz $\geq 0,0025$. Die generierten OTUs wurden zur Identifizierung auf Spezies-Ebene mit der NCBI Datenbank abgeglichen und zusätzlich über genspezifische PCR und Sanger-Sequenzierung verifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte via Rhea (Lagkouravdos et al. 2017) in R. Die Grafik wurde mit Graph Pad Prism 7 erstellt. Die Rohdaten sind unter der Identifikationsnummer PRJNA675478 bei NCBI öffentlich zugänglich.

16S rRNA Amplikon-Analysen identifizierten nach Analyse via IMNGS.org drei verschiedene OTUs mit einer relativen Abundanz $\geq 0,0025$ und Ähnlichkeiten $>99\%$ zu *C. sartagoforme*, *Ruminiclostridium cellulolyticum* und *Bacteroides vulgatus* in den Kulturen (siehe Anhang: „16S rRNA OTUs der Region V3-V4 des Isolates MA7“). Die 16S rRNA Gensequenzierung via PCR und Sanger-Sequenzierung ergab zuvor keinen Hinweis auf eine Mischkultur und identifizierte eindeutig *C. sartagoforme*. Eine Sequenzierung der GH48 Gene nach PCR mit cel48-Mix2 und Sanger-Sequenzierung mit cel48-Mix2-Rev (siehe Anhang: „GH48-Gensequenzierung MA7“) deutete auf GH48 Gene von *Ruminiclostridium josui* hin. Der Abgleich mittels BLASTN mit der NCBI Datenbank ergab einen Treffer zu AB506688.1 („Clostridium josui cipA, cel48A, cel8A, cel9A, cel9B, orfX, cel9C, cel9D, man5A, cel9E, cel5B genes for scaffolding protein, cellulase, cellulase, hypothetical proteins, mannanase, hypothetical proteins, complete cds“) mit 99,45% Sequenz-Übereinstimmung. Demnach ist MA7c eine Co-Kultur aus *C. sartagoforme* mit *Ruminiclostridium josui*, welche vor allem bei der Kultivierung mit Cellulose (FP oder PASC) zu Tage tritt (Abb. 27). Im Gegensatz dazu steht die Kultivierung mit Cellobiose, da hier der Anteil an *R. josui* in MA7c mit 0,12% relativer Abundanz sehr gering ist und dieser demnach über PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen wurde. Weitere Passagen des Isolates MA7 in Flüssig- und Festmedium in GS2 mit Cellobiose führten zu einer weiteren Reduktion von *R. josui* (0%, 0,03% bzw. 0,07% relative Abundanz in Cb, noC bzw. PASC), so dass Cellulolyse nicht mehr beobachtet werden konnte. Spontane Überführung von MA7nc zurück zu einer cellulolytischen Form wurde trotzdem in Gerbaulet (2019) beobachtet. Dies kann auf Überdauerungsformen von *R. josui*, welcher bekanntlich Sporen bilden kann (Sukhumavasi et al. 1988), welche zufällig in einer entsprechenden Menge auskeimen konnten.

Die Erkenntnis, dass MA7 keine Reinkultur aus *C. sartagoforme* ist, könnte auch für die Isolate MS-GR II.2 und MI-GR III.3 aus Schmidt (2019) zutreffen, da auch hier der FP-Abbau erst nach langer Inkubationszeit (2-3 Wochen bei 37 °C) beobachtet wurde. Dies wird auch durch die geringe Abundanz dieses Organismus in den Anreicherungskulturen mit FP als selektive C-Quelle gestützt. Nach Schmidt (2019) konnte *C. sartagoforme* spezifisch in den Anreicherungen MS-I GR20 und IS-II GS2 nachgewiesen werden. Zudem war die relative Abundanz, ermittelt über 16S rRNA Amplikonsequenzierungen nur zwischen 0-1,3%. Somit muss die tragende Rolle von *C. sartagoforme* hinsichtlich des Celluloseabbaus, wie er von Nathani et al. (2016) postuliert wurde, zumindest für den Biogasprozess angezweifelt werden.

Analyse sekretierter Proteine

Zur weiteren Überprüfung, ob *C. sartagoforme* eine Bedeutung für den Abbau von Cellulose hat, wurden die sekretierten Proteine von MA7c angezogen in biologischen Triplikaten mit den C-Quellen FP, PASC und Cellobiose, und über LC-MS/MS in Kooperation mit Dr. Christina Ludwig, BayBioMS, TU München analysiert. Zur Identifizierung der sekretierten Proteine wurden die annotierten Proteinsequenzen der Organismen *R. josui* JCM 17888^T und *C. sartagoforme* AAU1, jeweils verfügbar bei NCBI oder UniProt unter den Identifikationsnummern GCA_000526495.1 und 1202534, verwendet.

Die detektierten Proteine wurden mit der Annotation von CAZymes via dbCAN2 (siehe Anhang: Tab. A 10 und Tab. A 11) verglichen. In keiner der analysierten Bedingungen wurden CAZymes von *C. sartagoforme* in den Überstandsproteinen detektiert. Im Gegenzug konnten 30 CAZymes von *R. josui* identifiziert werden (Tab. 53). Diese 30 CAZymes waren in MA7c kultiviert mit FP ausnahmslos in ihrer relativen Abundanz signifikant erhöht im Vergleich zur Kultivierung mit Cellobiose oder ohne zusätzliche C-Quelle ($p < 0,05$). Interessanterweise waren unter diesen 30 CAZymes auch vier mögliche Cellulasen der GH Familien 5, 8 und 9. Somit bestätigte dies die aus der 16S rRNA Amplikon-Analyse entwickelte Hypothese, dass *C. sartagoforme* in der Co-Kultur MA7c keine Rolle im Abbau der Cellulose hat, jedoch den cellulolytischen Organismus *R. josui* bei der Kultivierung mit einfacher zugänglichen C-Quellen, hier Cellobiose, verdrängt. Diese Beobachtung geht Hand in Hand mit den Analysen zur Co-Kultur aus *D. raffinosedens* mit *A. thermocellus* beschrieben in 3.2.4.

Tab. 53: CAZymes von *R. josui* JCM 1788^T detektiert in den Überstandproteinen von MA7c.

Protein ID	dbCAN2 (HMMER-Annotation)	MA7c- FP1	MA7c- FP2	MA7c- FP3	T-Test [#] FP zu CB	T-Test [#] FP zu oC
WP_024832326.1	GH11(44-218)+CBM6(271-369)+CE4(394-515)	2,0E+08	2,8E+08	5,6E+08	0,016	0,016
WP_024832026.1	CBM9(249-419)+CE1(543-805)	3,5E+07	4,6E+07	5,4E+07	0,001	0,001
WP_024833512.1	CBM22(35-157)+CBM22(197-329)+GH10(360-691)+CBM9(719-891)+SLH(928-969)	1,9E+07	2,4E+07	4,6E+07	0,011	0,011
WP_024833259.1	GH43_1(10-319)	1,7E+07	3,2E+07	1,7E+07	0,005	0,005
WP_024833878.1	GH44(35-542)+CBM44(632-693)	7,1E+06	1,6E+07	9,8E+06	0,008	0,008
WP_024833394.1	GH3(106-291)	4,6E+06	6,1E+06	5,8E+06	0,000	0,000
WP_024833667.1	GH94(2-781)	3,3E+06	5,0E+06	4,7E+06	0,001	0,001
WP_024832715.1	CBM50(475-517)	3,1E+06	3,7E+06	4,9E+06	0,049	0,024
WP_024831565.1	GT35(124-650)	1,7E+06	3,2E+06	2,3E+06	0,002	0,002
WP_024832605.1	GH94(2-820)	1,5E+06	3,0E+06	3,1E+06	0,004	0,004
WP_024834442.1	GH9(53-535)+CBM3(562-650)+CBM3(739-819)	1,5E+06	6,1E+06	3,4E+06	0,027	0,027
WP_024832963.1	CBM54(192-305)	1,4E+06	2,2E+06	3,7E+06	0,011	0,011
WP_024832888.1	CE7(4-315)	1,2E+06	3,5E+06	3,8E+06	0,013	0,013
WP_024832638.1	GH43_12(11-295)	8,1E+05	8,9E+05	1,4E+06	0,003	0,003
WP_024831717.1	GH39(12-436)	7,4E+05	2,5E+06	2,7E+06	0,017	0,017
WP_024831697.1	GH8(77-398)	7,3E+05	4,2E+06	1,8E+06	0,047	0,047
WP_024833403.1	GH8(55-367)	6,7E+05	1,2E+06	9,7E+05	0,002	0,002
WP_024833189.1	GH10(42-345)	4,6E+05	2,8E+06	1,4E+06	0,043	0,043
WP_024834545.1	GH120(312-402)	4,6E+05	1,6E+05	7,8E+05	0,030	0,030
WP_024832884.1	GH3(39-279)	4,5E+05	4,8E+05	6,3E+05	0,000	0,000
WP_024831756.1	GH51(3-500)	4,0E+05	2,2E+05	6,5E+05	0,014	0,014
WP_117385193.1	GH10(80-358)	3,4E+05	1,4E+05	5,8E+05	0,023	0,023
WP_024831842.1	GH31(236-664)	3,4E+05	3,0E+05	2,4E+05	0,000	0,000
WP_024831663.1	GT5(5-477)	2,5E+05	3,1E+05	2,9E+05	0,000	0,000
WP_024832821.1	GH67(12-690)	2,4E+05	2,5E+05	4,8E+05	0,007	0,007
WP_024834501.1	GH5_2(66-320)+CBM17(353-556)+CBM28(566-751)	2,2E+05	2,8E+06	3,2E+06	0,045	0,045
WP_024833024.1	GH15(265-633)	2,0E+05	2,5E+05	2,2E+05	0,000	0,000
WP_024834090.1	GT5(9-480)	7,4E+04	9,0E+04	1,5E+05	0,006	0,006
WP_024831841.1	GH3(36-255)	6,4E+04	1,3E+05	9,7E+04	0,003	0,003
WP_024832028.1	GH10(354-777)	6,3E+04	6,5E+04	1,5E+05	0,015	0,015

[#]Der „Students T-Test“ wurde in Excel 2007 einseitig mit gleicher Varianz (Typ 2) durchgeführt. **GHs der Familie 5, 8 und 9 (Cellulasen) sind fett markiert.**

3.3 Etablierung von GH48 als molekularer Marker zur Identifizierung cellulolytischer Organismen

In den Vorarbeiten von Rettenmaier (2017) wurde das degenerative Primer-Gemisch cel48-Mix2 entwickelt (Tab. A 1), und optimale qPCR Bedingungen im Vergleich zu den Primern Cel48_490FI und Cel48_920RI, modifiziert nach Pereyra et al. (2010), wurden etabliert. Dies zusammen mit weiterführenden Arbeiten in Kooperation mit Yat Kei Lo (Praktikum, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München), Schmidt (2019) und Dr. Klaus Neuhaus, sowie Dr. Ilias Lagkourdos (beide ZIEL – Core Facility Microbiome, TU München) wurde 2020 in *Microorganisms* publiziert. Relevante Teilergebnisse aus Rettenmaier et al. (2020b) werden im Folgenden (3.3.1 GH48-Datenbank und 3.3.2 Taxonomie über GH48 Gene) beschrieben.

3.3.1 GH48-Datenbank

Das Gen der prozessiven Glucanase GH48 wurde als molekularer Marker zur Identifizierung cellulolytischer Organismen definiert, und ein Nukleotidprimer-Set für die Hochdurchsatz-Analyse von DNA und RNA wurde entwickelt. Diese Methode beinhaltet auch die taxonomische Zuordnung einzelner Nukleotidsequenzen, ähnlich wie bei den bereits etablierten molekularen Markern wie z.B. 16S rRNA Gensequenzen. Dazu wurde zunächst eine Datenbank erstellt, welche die Taxonomie, basierend auf der NCBI Datenbank, mit der GH48 Nukleotid- und Proteinsequenz sowie der 16S rRNA Gensequenz kombiniert (siehe dazu „File S1 GH48_database.xlsx“ aus Rettenmaier et al. (2020b)).

Nach Rettenmaier et al. (2020b) führt die Datenbank aus insgesamt 944 Einträgen bakterielle GH48 und 16S rRNA Gensequenzen aus 104 verschiedenen Genera bzw. 42 verschiedenen Familien der *Eubacteria* zusammen. Dabei dominieren Sequenzen der Genera *Streptomyces* und *Paenibacillus* (Tab. A 12). Dabei wurden 45 bzw. 109 Gensequenz-Paare mit identischen GH48 Gensequenzen bzw. GH48 Amplikonsequenzen festgestellt. Allerdings beinhalten alle identischen GH48 Gensequenzen Sequenzen aus verschiedenen Stämmen dergleichen Spezies. Die identischen GH48 Amplikonsequenzen (344 bp) wurden i.d.R. nur innerhalb verschiedener Spezies desselben Genus beobachtet. Damit bietet die GH48-Amplikonsequenzierung, analog zu 16S rRNA Amplikonsequenzierungen der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4, die Möglichkeit einer taxonomischen Zuordnung auf Genus-Ebene, jedoch nicht auf Spezies-Ebene.

3.3.2 Taxonomie über GH48 Gene

Zur Anwendung von GH48 Gensequenzen im Hochdurchsatz muss, neben der PCR, eine geeignete Pipeline zur Auswertung von Amplikonsequenzen bereitstehen. Entscheidend für das Clustering einzelner Reads zu OTUs ist ein genspezifischer Schwellenwert, welcher bis dato für GH48 Gensequenzen nicht bekannt war. Als Basis zur Abschätzung wurde in Rettenmaier et al. (2020b) einerseits die Korrelation von GH48 Gensequenz-Ähnlichkeiten zu 16S rRNA Gensequenz-Ähnlichkeiten zweier Organismen durch ein paarweises Alignment und Berechnung einer Distanzmatrix herangezogen. Dies war möglich, da für 16S rRNA Gensequenz-Ähnlichkeiten von Bakterien eingehende Analysen bekannt sind (siehe dazu auch 1.4.1). Demnach entsprachen nach polynomischer Modellierung für den Datensatz aus GH48 Gensequenzen, für die jeweils Vollängen 16S rRNA Gensequenzen vorhanden waren, die Grenzwerte zur taxonomischen Einordnung von 16S rRNA Gensequenzen von 95, 97 oder 99% einer GH48-Amplikon-Ähnlichkeit von respektive 80, 84 oder 88%.

Des Weiteren wurde ein Clustering Agreement für GH48 Amplikonsequenzen bestimmt. Diese Analyse bestätigte jedoch nicht die kalkulierten Ähnlichkeitswerte aus der vorangegangenen Modellierung: bei einem Grenzwert von 84% Sequenzübereinstimmung wurden nur 85% der GH48-Amplikone taxonomisch korrekt eingeordnet. Die eingehende Betrachtung, welche Sequenzen nicht korrekt eingeordnet werden konnten, deutete auf gewisse Ausreißer hin. Nach Ausschluss solcher Ausreißer konnte bei einem Grenzwert von 94% Sequenzübereinstimmung eine korrekte taxonomische Zuordnung gemacht werden.

Diese Analysen ermöglichten die Anwendung von GH48 Amplikonsequenzierungen und deren Auswertung im Hochdurchsatz und werden in darauffolgenden Kapitel zur Identifizierung cellulolytischer Bakterien angewandt.

3.4 Quantifizierung und Identifizierung cellulolytischer Bakterien im Biogasprozess über kultivierungs-unabhängige Methoden

Die Analyse cellulolytischer Organismen im Biogasprozess, hier der Vergleich von verschiedenen Fermenterzuständen, über molekularbiologische Methoden wird in dieser Arbeit über zwei Marker-Gene gelöst: GH48 zur Analyse cellulolytischer Bakterien und 16S rRNA Gene zur taxonomischen Analyse von Bakterien. Die Herangehensweise basiert, wie schon in Rettenmaier (2017) beschrieben, einerseits auf der Quantifizierung dieser Zielgene über qPCR und einer daraus folgenden Bewertung des cellulolytischen Aktivität in einem Fermenterzustand. Andererseits wird diese Analyse in dieser Arbeit auch über Amplikonsequenzierungen der beiden Marker Gene gelöst. Teil-Ergebnisse hierzu sind bereits in Rettenmaier et al. (2020b) publiziert.

Analysiert wurden die Fermenterbetriebe aus 2019 zu verschiedenen Zeitpunkten. Verglichen wurde sowohl die Betriebstemperatur (mesophil oder thermophil), als auch die Prozessstabilität (stabil oder instabil). Analog zu den Analysen, beschrieben in 3.1.1 nach Rettenmaier et al. (2019a), wurde sowohl Fermenterinhalt, hier genannt Gärrest (GR), als auch die *in sacco* Methode (IS) zur Anreicherung cellulolytischer Organismen in drei verschiedenen Medien (GR20, GS2.5GR, GS2) eingesetzt. Zusätzlich wurde im Rahmen der Masterarbeit von Schmidt (2019) aus diesen Biogasfermenterproben (GR, IS) DNA und RNA in technischen Triplikaten isoliert und diese Replikate für weitere molekularbiologische Analysen zusammengeführt. Parameter der Biogasfermenter und Zeitpunkte dieser Probenahmen sind in Tab. A 13 zusammengefasst.

Zudem wurden GH48 Amplikonsequenzierungen auch in Kooperation mit LfL, AQU durchgeführt. Die zugrundeliegende DNA und RNA Extraktion musste, aufgrund von weiterführenden Arbeiten hierzu, angepasst werden und erfolgte nach den Beschreibungen in DNA-Extraktion nach Griffiths et al. (2000) und RNA-Extraktion mit Trizol. Neben GH48 Amplikonen wurden hieraus auch 16S rRNA Amplikone der Region V3-V4 generiert und sequenziert. Die Ergebnisse hierzu sind in „Bakterielle Diversität und deren transkriptionelle Aktivität in Biogasfermentern mit verschiedenen Prozessbedingungen“ beschrieben. Die Zeitpunkte der PN sind in Tab. A 14 zusammengefasst.

3.4.1 Quantifizierung GH48 und 16S rRNA Gene in DNA

Die Quantifizierung der GH48 und 16S rRNA Genkopien in DNA wurden nach den Erkenntnissen aus Rettenmaier (2017) im Zuge der Masterarbeit von Schmidt (2019) durchgeführt und bereits in Rettenmaier et al. (2020b) veröffentlicht. Die IS Methode führte hier eindeutig zu einer Anreicherung cellulolytischer MO. Der Anteil an GH48 Genkopien zu 16S rRNA Gene ist in jeder analysierten IS Probe im Vergleich zur GR Probe des gleichen Fermenterzustandes um ein Mehrfaches erhöht und lag zwischen 1,2% in MI-IS bis 3,7% in MS2-IS (Tab. 54). Neben dieser bereits bekannten Beobachtung

korreliert der Anteil an GH48 Genen zum Anteil an 16S rRNA Genen auch mit dem Fermenterzustand. Die effizienteren Fermenterzustände MS3 und TS weisen einen geringeren Anteil an GH48 zu 16S rRNA Genkopien auf als die ineffizienteren oder instabilen Prozesse MS1, MS2 und TI. Demnach scheinen GH48 Gene, und damit cellulolytische MO, einerseits eine wichtige Rolle zu Prozessbeginn (MS1 und MS2) einzunehmen. Andererseits nimmt der Anteil bei instabilerem Betrieb im Verhältnis zu anderen Bakterien wieder zu. Daraus kann geschlossen werden, dass ein erhöhter Anteil an cellulolytischen Mikroorganismen möglicherweise zu einer Versäuerung der Biogas Fermenter führt. Zudem ist denkbar, dass cellulolytische Mikroorganismen im Vergleich zur Gesamtheit der mikrobiellen Flora im Biogas Fermenter weniger stark durch die Prozessstörung betroffen sind. Die Resultate im Rahmen dieser Arbeit deuteten unabhängig von der Prozessstabilität auf eine gleichbleibende Anzahl an GH48 Genkopien hin. Stattdessen wurde eine Variation in der Gesamtheit der mikrobiellen Population abhängig von der Probe (IS oder GR) sowie der Fermenterzustände beobachtet.

Neben der Quantifizierung in DNA erfolgten auch Experimente mit RNA. Hier erwies sich jedoch der valide Nachweis von GH48 Transkripten als schwierig, da die Anzahl oftmals unter der Detektionsgrenze lag (Schmidt 2019).

Tab. 54: Quantifizierung von GH48 und 16S rRNA in DNA nach Rettenmaier et al. (2020b), Tab. 3.

Fermenter-zustand	Probenmaterial	GH48 [Genkopien / μ l]	Standard Abweichung [Genkopien / μ l]	16S rRNA [Genkopien / μ l]	Standard Abweichung [Genkopien / μ l]	Verhältnis GH48/16S rRNA [%]
MS1	IS	$6,8 \times 10^6$	$\pm 8,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^8$	$\pm 5,1 \times 10^7$	3,1
	GR	$5,7 \times 10^6$	$\pm 1,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^8$	$\pm 1,8 \times 10^8$	0,8
MS2	IS	$2,4 \times 10^7$	$\pm 9,6 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$	$\pm 1,1 \times 10^7$	3,7
	GR	$4,8 \times 10^6$	$\pm 3,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^9$	$\pm 3,6 \times 10^8$	0,3
MS3	IS	$3,8 \times 10^6$	$\pm 1,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	$\pm 2,0 \times 10^7$	2,0
	GR	$3,6 \times 10^6$	$\pm 4,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^9$	$\pm 1,5 \times 10^8$	0,3
MI	IS	$9,1 \times 10^6$	$\pm 1,3 \times 10^4$	$7,8 \times 10^6$	$\pm 8,4 \times 10^5$	1,2
	GR	$5,4 \times 10^6$	$\pm 4,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^8$	$\pm 1,5 \times 10^7$	0,8
TS	IS	$3,4 \times 10^6$	$\pm 4,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^8$	$\pm 4,1 \times 10^7$	1,4
	GR	$2,9 \times 10^6$	$\pm 2,9 \times 10^5$	$8,0 \times 10^8$	$\pm 2,6 \times 10^8$	0,4
TI	IS	$5,8 \times 10^6$	$\pm 1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$\pm 1,4 \times 10^7$	3,5
	GR	$7,9 \times 10^6$	$\pm 8,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^9$	$\pm 6,8 \times 10^7$	0,7

Gemessen wurde jeweils in drei technischen Replikaten

3.4.2 GH48 Gene in DNA

Amplikonsequenzierungen zur Identifizierung cellulolytischer Organismen in DNA isoliert aus GR oder IS Proben des Fermenterbetriebes 2019 nach Rettenmaier et al. (2020b) detektierten insgesamt 41 verschiedenen OTUs basierend auf einem Clustering mit 94% Sequenzübereinstimmung und $\geq 0,01$ relativer Abundanz. Im Mittel wurden 17 OTUs in den einzelnen Proben nachgewiesen. Dabei wurden signifikante Unterschiede in der *Evenness* der OTUs im mesophilen bzw. thermophilen Fermenterbetrieb festgestellt ($p=0,006$; beidseitiger T-Test unter Annahme gleicher Varianz in Excel 2016). Die detaillierten Ergebnisse der α -Diversität einzelner Proben ist in Tab. 55 zusammengefasst. Interessanterweise waren 50-99% der detektierten GH48 OTUs im mesophilen Fermenterbetrieb keinem bekannten Genus zuzuordnen. Der Anteil an nicht klassifizierbarer GH48 OTUs in thermophilen Proben war hingegen nur 7-18%. Dies deutet darauf hin, dass vor allem im mesophilen Biogasprozess bis dato unbekannte Organismen für die hydrolytische Spaltung von Cellulose verantwortlich sind.

Tab. 55: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Gärrest oder *in sacco* Anreicherungen des mesophilen und thermophilen Fermenterbetriebes.

Fermenterzustand	Probenmaterial	Richness	Evenness
MS1	IS	13	0,41
	GR	19	0,43
MS2	IS	16	0,24
	GR	18	0,42
MS3	IS	11	0,35
	GR	17	0,43
MI	IS	22	0,36
	GR	17	0,40
TS	IS	19	0,20
	GR	21	0,26
TI	IS	13	0,11
	GR	14	0,33

Die DNA Extraktion, sowie die Amplifikation der Zielgene erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Schmidt (2019) und die Daten sind ebenfalls in Rettenmaier et al. (2020b) beschrieben.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. GR, Gärrest; IS, *in sacco*

Im Detail setzte sich die cellulolytische Mikrobiota in den Proben MS1, MS2 und MS3 des mesophilen, stabilen Fermenterbetriebs hauptsächlich aus unbekanntem Vertretern der Familie *Lachnospiraceae* (73,9%, 49,3% und 33,4% in IS bzw. 38,1%, 47,4% und 29,0% in GR) bzw. *Oscillospiraceae* (24,5%, 50,2% und 64,0% in IS bzw. 11,3%, 29,7% und 20,0% in GR) zusammen [Abb. 28 nach Rettenmaier et al. (2020b)]. Die GH48 OTUs detektiert im mesophilen instabilen Fermenterbetrieb wichen stark vom stabilen Betrieb ab. Hier wurden, sowohl in IS als auch GR, hauptsächlich unbekannte Vertreter der Familie *Clostridiaceae* detektiert (90,7% in IS bzw. 84,0% in GR). Dementsprechend hat sich die cellulolytische Mikrobiota vermutlich aufgrund des herbeigeführten instabilen Betriebs deutlich

verändert. Im thermophilen Betrieb dominieren GH48 OTUs des Genus *Acetivibrio*, welcher auch den bereits gut beschriebenen cellulolytischen Schlüsselorganismus *A. thermocellus* beinhaltet (Krause et al. 2008; Wirth et al. 2012). Die relative Abundanz dieses Genus variiert zwischen 60,3% in TI-GR und 91,5% in TI-IS. Zudem wurden durch die *in sacco* Anreicherung auch unbekannte Vertreter der Familie *Lachnospiraceae* im stabilen und instabilen Fermenterbetrieb mit 14,2% in TS-IS und 6,0% in TI-IS im Verhältnis zu den entsprechenden GR Proben (2,9% bzw. 0,4% für TS-GR und TI-GR) angereichert. Für GH48 OTUs des Genus *Herbinix* verhielt sich die Verteilung anders. Sowohl in mesophilen als auch thermophilen Proben wurde dieses Genus vermehrt in DNA aus GR Proben detektiert. Zum Beispiel ist die relative Abundanz dieses Genus 16,0% bzw. 19,7% in TS-GR bzw. TI-GR, jedoch nur 1,5% in TI-IS bzw. 0,1% in TS-IS. Dies korreliert mit den physiologischen Eigenschaften der beschriebenen Spezies innerhalb des Genus *Herbinix*, welche zwar als cellulolytisch, jedoch ohne Ausbildung eines Cellulosoms, und zum Teil auch als hemicellulolytisch charakterisiert sind (Koeck et al. 2015b; Koeck et al. 2016a).

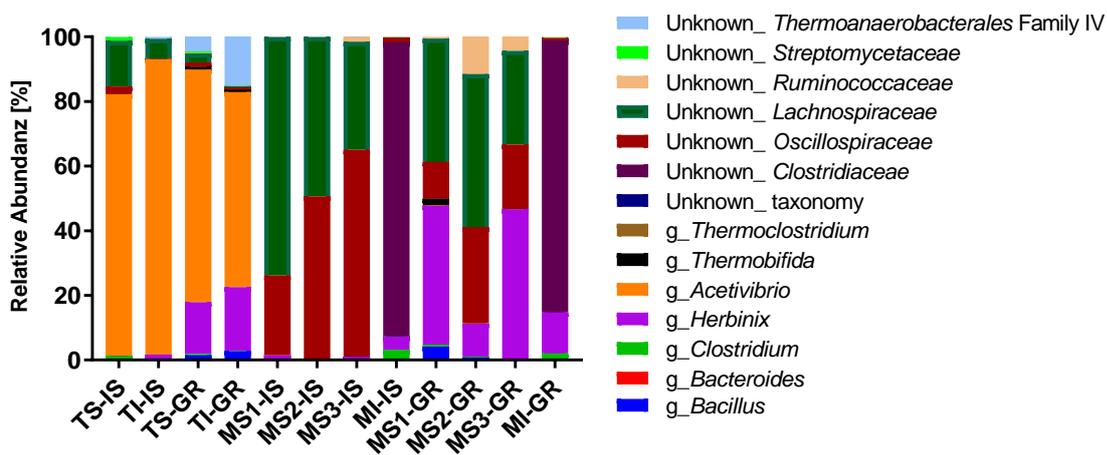


Abb. 28: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Gärrest (GR) bzw. *in sacco* Proben (IS) auf Genus-Ebene modifiziert nach Rettenmaier et al. (2020b), Figure 3. Die Abbildung wurde hinsichtlich der Taxonomie nach Tindall (2019b) abgeändert: *Hungateiclostridiaceae* = *Oscillospiraceae*; *Hungateiclostridium* = *Acetivibrio*. Die Graphik wurde der Formatierung dieser Arbeit mit Graph Pad Prism 7 angepasst. Die Roh-Daten sind unter PRJNA625239 öffentlich zugänglich.

Die Diversität der GH48-Amplikone in den einzelnen Proben, sequenziert im Rahmen der Kooperation mit LfL, AQU war unerwartet gering. In DNA wurden basierend auf einer OTU Clustering mit 94% Sequenz-Übereinstimmung und einer relativen Abundanz $\geq 0,05$ nur 5-7 genspezifische OTUs detektiert (Tab. 56). Die Verteilung dieser OTUs in den Proben der mesophilen Fermenter oder des thermophil-stabilen Prozesses lag im Mittel zwischen 0,42 für MI und 0,59 für TS. Für TI kam es im Gegensatz dazu zu einer selektiven Anreicherung einzelner OTUs (*Evenness* 0,07).

Tab. 56: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus dem mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieb.

Probe	Richness	Evenness	Mittelwert
MS-PN14-1	7	0,52	
MS-PN14-2	7	0,52	0,52
MS-PN2	6	0,51	
MI-PN19-1	7	0,37	
MI-PN19-2	6	0,39	0,42
MI-PN2	7	0,49	
TS-PN2	6	0,60	
TS-PN8-1	6	0,59	0,59
TS-PN8-2	6	0,57	
TI-PN2	6	0,09	
TI-PN8-9-1	5	0,08	0,07
TI-PN8-9-2	6	0,05	

Die DNA Extraktion, sowie die Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL.
M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

Detektiert wurden GH48 Gensequenzen der Genera *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Herbinix* und *Thermobifida*. Innerhalb der Replikate zu einem Fermenterzustand wurde eine hohe Übereinstimmung beobachtet, jedoch variierte die relative Abundanz einzelner Genera abhängig vom Zeitpunkt der PN. So werden für MS und MI zu PN2 jeweils weniger GH48-Gensequenzen von *Herbinix* detektiert (44,2% bzw. 54,1%) als im Vergleich zu PN14 bzw. PN19 (im Mittel 55,1 bzw. 85,0%). Für TS wurde eine Abnahme von GH48 OTUs des Genus *Herbinix* im Verlauf des Prozesses beobachtet. Stattdessen stieg z.B. der relative Anteil des Genus *Acetivibrio* von 24,6% (PN2) auf im Mittel 37,4% (PN8-1 und -2). Für TI wurde hingegen eine selektive Anreicherung einer einzelnen cellulolytischen Gattung, GH48 OTUs des Genus *Clostridium*, unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme beobachtet. (Abb. 29)

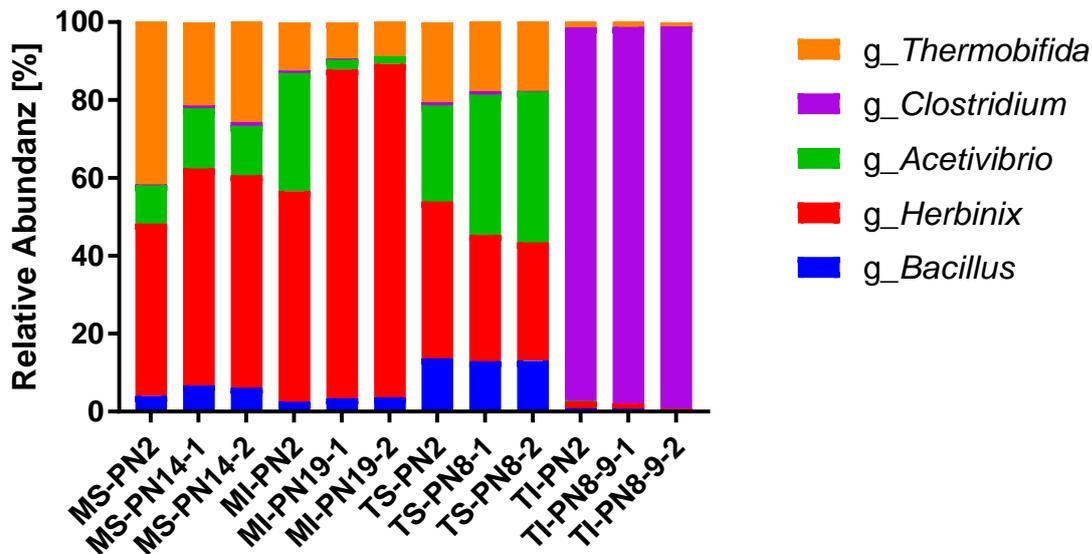


Abb. 29: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus dem mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieb auf Genus-Ebene. Die DNA-Extraktion, sowie Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL, Das OTU Clustering erfolgte auf 94% Sequenzübereinstimmung. Analysiert wurden ausschließlich genspezifische OTUs nach manuellen Abgleich mit der GH48-Datenbank und einer relativen Abundanz $\geq 0,05$. Die Roh-Daten sind unter PRJNA680694 öffentlich zugänglich.

3.4.3 GH48 Gene in RNA

Bereits die Arbeiten zur Quantifizierung von GH48 Gensequenzen [3.4.1 Quantifizierung GH48 und 16S rRNA Gene in DNA; Schmidt (2019)] stellte die Problematik der Arbeiten mit RNA heraus. GH48 Gensequenzen in cDNA nach genspezifischer reverser Transkription (RT), konnte nicht in allen Proben erfolgreich detektiert werden. Erfolgreich waren die GH48 Amplikonsequenzierungen aus RNA isoliert aus IS-Anreicherungen des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes. Dies korrelierte auch mit den Erwartungen aus der Quantifizierung von GH48-Genen, welche in DNA die selektive Anreicherung von Spezies mit GH48 Genen im Vergleich zur Gesamtzahl an bakteriellen Spezies in IS aufzeigte.

Nach RT mit cel48_920RI bzw. cel48-Mix2R wurden mit cel48-Mix2R doppelt so viele OTUs detektiert als mit cel48_920RI (Tab. 57). Dementsprechend könnte die RT, die mit einem diversen Primer-Gemisch möglicherweise noch herausfordernde Optimierung hinsichtlich der Reaktionsbedingungen benötigt, im Gegenzug aber mutmaßlich zu einer weniger starken Verzerrung der mikrobiellen Diversität cellulolytischer Organismen durch die Amplifikation der analysierten Probe führen.

Im Detail wurden OTUs der Genera *Thermoclostridium* und unbekannte Vertreter der Familie *Clostridiaceae* ausschließlich nach RT mit cel48-Mix2R detektiert. Zudem stieg der relative Anteil von OTUs des Genus *Acetivibrio* von im Mittel 0,02% nach RT mit cel48_920RI zu 34% nach RT mit cel48-Mix2R. Der relative Anteil an OTU Sequenzen unbekannter Taxonomie nach RT mit cel48-Mix2R (0,02%) nahm im Vergleich zu RT mit cel48_920RI (2,37-6,90%) ab (Abb. 30). Dies deutet darauf hin,

dass eine RT mit cel48-Mix2R deutliche Vorteile hinsichtlich der realen transkriptionellen Aktivität cellulolytischer Organismen haben könnte, woraufhin im Weiteren die RT ausschließlich mit cel48-Mix2R durchgeführt wurde, jedoch ist eine Verzerrung der mikrobiellen Diversität durch die Nukleinsäure-Extraktion sowie Amplifikationsschritte in keinem der beschriebenen Fälle auszuschließen.

Tab. 57: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus *in sacco* Proben des mesophilen Fermenterbetriebes.

Probe	Richness	Evenness
MS1-IS_cel48_920RI	9	0,51
MS2-IS_cel48_920RI	10	0,32
MS2-IS_cel48-Mix2R	20	0,49

Die RNA Extraktion, sowie die genspezifische RT mit nachfolgender Amplifikation der Zielgene erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Schmidt (2019).

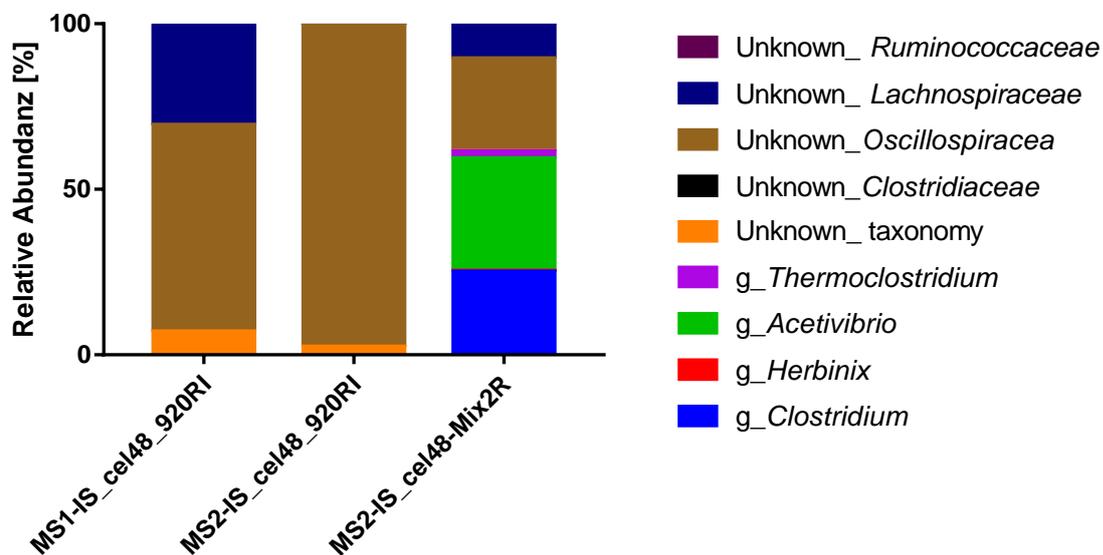


Abb. 30: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA isoliert aus *in sacco* Proben des mesophilen Fermenterbetriebes auf Genus-Ebene nach Schmidt (2019), Abbildung 19. Das OTU Clustering erfolgte auf 94% Sequenzübereinstimmung. Analysiert wurden ausschließlich genspezifische OTUs nach manuellen Abgleich mit der GH48-Datenbank und einer relativen Abundanz $\geq 0,01$. Die Roh-Daten sind unter PRJNA680699 öffentlich zugänglich. Die Graphik wurde der Formatierung dieser Arbeit mit Graph Pad Prism 7 angepasst.

In RNA isoliert am LfL, AQU konnten nach RT mit cel48_Mix2R für MI, TS und TI keine GH48-Gensequenzen amplifiziert werden. Dies verdeutlicht erneut die Problematik der Nukleinsäure-Extraktion und Amplifikation vor allem für RNA Proben. Aus den Sequenzierungen für MS konnten 3-4 genspezifische OTUs mit $\geq 0,05$ relativer Abundanz assembliert werden (Tab. 58). Die Ergebnisse deuten auf eine hohe transkriptionelle Aktivität des Genus *Acetivibrio* hin (Abb. 31), welcher zuvor auch bereits in DNA detektiert wurde. Dieses Ergebnis ist jedoch kritisch zu betrachten, da die hohe relative Abundanz sowohl aufgrund der RNA-Extraktionsmethode als auch der RT basieren könnte. Zudem deckt sich dieses Ergebnis nur teilweise mit den Erkenntnissen aus Schmidt (2019), welche nach RT mit cel48-Mix2R zwar ebenfalls transkriptionelle Aktivität des Genus *Acetivibrio* feststellen konnten, jedoch nicht in so hoher relativer Abundanz.

Tab. 58: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus dem mesophil-stabilen Fermenterbetrieb.

Probe	Richness	Evenness
MS-PN14-1	4	0.06
MS-PN14-2	4	0.03
MS-PN3	3	0.08

Die RNA Extraktion, sowie die genspezifische RT mit nachfolgender Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL.

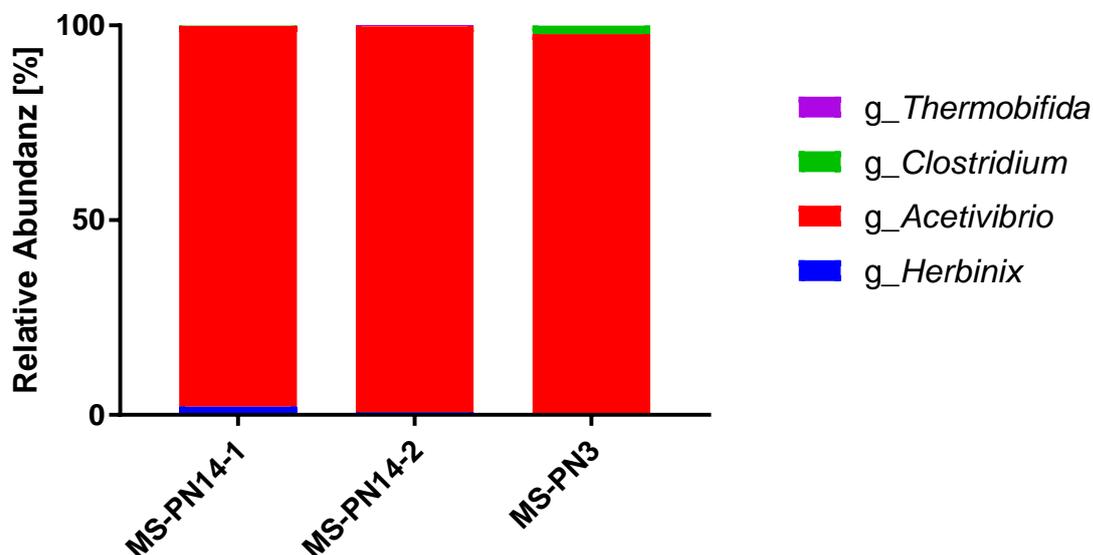


Abb. 31: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus dem mesophil-stabilen Fermenterbetrieb auf Genus-Ebene. Die RNA-Extraktion, RT, sowie die Amplifikation der Zielgene erfolgte durch Bernhard Munk, LfL. Das OTU Clustering erfolgte auf 94% Sequenzübereinstimmung. Analysiert wurden ausschließlich genspezifische OTUs nach manuellen Abgleich mit der GH48-Datenbank und einer relativen Abundanz $\geq 0,05$. Die Roh-Daten sind unter PRJNA680694 öffentlich zugänglich.

Diskussion

4.1 Bakterielle Gemeinschaft in Biogasanlagen

4.1.1 Identifizierung bakterieller Taxa über kultivierungsunabhängige Methoden

Sequenziermethoden der zweiten und dritten Generation ermöglichen die Erfassung mikrobieller Lebensgemeinschaften auf molekularer Ebene. Hierbei ist vor allem von Vorteil, dass auch bis dato nicht-kultivierbare Organismen detektiert werden können. Diese kultivierungsunabhängigen Analysen ermöglichen eine Bewertung der mikrobiellen Gemeinschaften entweder zum Vergleich verschiedener natürlicher Habitats (siehe „4.1.2 Diversität (cellulolytischer) Bakterien, sowie deren Abundanz und Anpassung an Prozessbedingungen“) oder aber der Effizienz der Isolierung von gezielt neuartigen Organismen (siehe „4.1.3 Anreicherung, Identifizierung und Isolierung cellulolytischer Bakterien“).

16S rRNA Amplikone

In dieser Arbeit erfolgten Amplikonsequenzierungen zur Identifizierung bakterieller Taxa im natürlichen Habitat, dem Biogasfermenter, sowie nach gezielter Anreicherung cellulolytischer Lebensgemeinschaften. Angewandt wurden 16S rRNA Amplikonsequenzierung der variablen Regionen 3 und 4. Die Analyse von 16S rRNA Gensequenzen bietet aufgrund der weit verbreiteten Anwendung in der wissenschaftlichen Gemeinschaft eine gute Grundlage zur Beschreibung bakterieller Gemeinschaften. Hierzu sind neben gepflegten Referenzdatenbanken [hier: RDP (Cole et al. 2014), SILVA (Quast et al. 2012)] auch eine Vielzahl wissenschaftlicher Artikel verfügbar (926 Treffer in 2020 zu „16S rRNA amplicon“ in PubMed.gov; abgerufen am 04.12.2020). Die Auswahl einiger variabler Regionen des 16S rRNA Gens ermöglicht die Sequenzierung im Hochdurchsatz und die Klassifizierung auf Genus-, jedoch nicht auf Spezies-Ebene. Die Arbeiten von Johnson et al. (2019) zeigten, dass zur Klassifizierung auf Spezies Ebene die 16S rRNA Gensequenz in Volllänge nötig ist. Aufgrund der stärker herausfordernden Sequenzierungs- und Assemblierungstechnologien sind hierzu („16S rRNA amplicon full length“) erst 15 Artikel in PubMed.gov erschienen (Stand 04.12.2020). Dabei hat bereits die Auswahl der variablen Region des Zielgens (hier: 16S rRNA, V3-V4), einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse. Lloyd et al. (2018) beobachteten eine deutliche Reduktion unbekannter Taxa in Sequenzierdaten nach PCR-Amplifikation im Vergleich zu Metagenom-Daten. Auch Vrieze (2020) diskutiert die Vergleichbarkeit von Amplikonsequenzierungen insbesondere in Bezug auf den Biogasprozess. Neben vielen anderen Faktoren ist zum Beispiel auch die Auswahl der Primer entscheidend (Fischer et al. 2016; Fouhy et al. 2016). Deshalb wurde in dieser Arbeit zuvor etablierte Primersets (Tab. 27) zur Analyse der 16S rRNA Gensequenzen mit einer Vielzahl an Referenzdaten verwendet.

Nicht-kultivierbare Bakterien

Der Anteil an mikrobiellen Lebensformen, die unter Laborbedingungen nicht angezogen werden können, gleicht, wie in Mohr (2018) am Beispiel der *Myxobacteria* getitelt, einem Eisberg-Paradoxon. Kultivierungsunabhängige 16S rRNA Gensequenzanalysen zeigten, dass ein Großteil der natürlich vorkommenden Bakterien bis dato nicht kultiviert und demnach nicht charakterisiert sind (Lloyd et al. 2018). Deshalb nehmen in der aktuellen Forschung kultivierungsunabhängige Methoden zur Beschreibung komplexer Lebensgemeinschaften in natürlichen Habitaten eine entscheidende Rolle ein. In DNA und RNA der in dieser Arbeit analysierten Biogasfermenter konnten 81,3% +/- 3% bzw. 80% +/- 6% der detektierten 16S rRNA zOTUs in DNA bzw. RNA nicht bis auf Genus-Ebene zugeordnet werden. Somit bestätigt sich auch in dieser Arbeit das weiterhin geltende Eisberg-Paradoxon. Zudem verdeutlichte der Vergleich von Sequenzierungen des mesophilen Fermenterbetriebes mit DNA oder RNA auf Phylum-Ebene, dass Bakterien unbekannter Taxonomie transkriptionell aktiv sind und demnach eine wichtige, funktionelle Rolle in der mikrobiellen Lebensgemeinschaft einnehmen könnten. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Lloyd et al. (2018), welche eine höhere relative Abundanz unkultivierter Bakterien und Archaeen im Metatranskriptom im Vergleich zum Metagenom detektierten. In cellulolytischen Anreicherungskulturen war der Anteil an zOTUs unbekannter Genera im Vergleich zum Biogasfermenter zum Teil bereits deutlich reduziert und stützt demnach die Behauptung, dass ein Großteil der unbekanntes Bakterien im Biogasfermenter unter Laborbedingungen nicht angezogen werden kann (Lloyd et al. 2018). Für Anreicherungen aus MS3 lag der Anteil unbekannter Genera bei im Mittel bei 40%, variierte jedoch stark (16 bis 86%). Der höchste Anteil wurden in GR-GR20-II und IS-GR20-I beobachtet. In thermophilen Anreicherungen wurden im Mittel 58% der zOTUs nicht auf Genus-Ebene klassifiziert. Auch hier wurden starke Schwankungen (13 bis 88%) beobachtet. Der höchste Anteil wurde in GR-GS2.5GR-I und IS-GR20-I beobachtet. Dies verdeutlicht erneut die Beobachtungen aus Rettenmaier et al. (2019a), welche die Imitation des natürlichen Habitats, hier durch Verwendung des GR20 Mediums, als entscheidend zum Erhalt der mikrobiellen Diversität einer komplexen Mikrobiota herausstellten. Trotzdem konnte auch durch die Verwendung dieses Mediums, welches direkt aus dem natürlichen Habitat erstellt wurde, möglicherweise durch die absichtliche und gezielte Selektion cellulolytischer Lebensgemeinschaften nicht alle im Biogasfermenter detektierten Phyla unter Laborbedingungen erhalten bleiben.

Mikrobielle Diversität

Der direkte Vergleich der zOTUs detektiert in DNA und RNA des mesophil-stabilen oder thermophil-stabilen Fermenterbetriebes zu den Anreicherungen aus ebendiesen Fermentern zeigte eine Reduktion in der mikrobiellen Diversität aufgrund der Kultivierung. Aus 14 Phyla konnten in mesophilen Anreicherungen fünf erhalten bleiben und zusätzlich einmalig in GR-GS2.5GR-I das Phylum *Fibrobacteres* detektiert werden. Für thermophile Anreicherungen wird, unabhängig von der Anreicherungs-Strategie, eine noch stärkere Reduktion auf ein einziges, dominierendes Phylum (*Firmicutes*) beobachtet. In dieser Arbeit zielten die Anreicherungen jedoch nicht auf den 100%-igen Erhalt der mikrobiellen Gemeinschaft des Biogasfermenters ab, sondern sollten gezielt cellulolytische Taxa anreichern. Somit könnte die selektive C-Quelle eine gewollte Reduktion der bakteriellen Gemeinschaft herbeigeführt haben. Auch Chaudhary et al. (2019) konnten trotz einer neu-entwickelten Kultivierungsmethoden zur Anreicherung und Isolierung bakterieller Gemeinschaften in deren natürlichem Habitat eine deutlich Reduktion der detektierten Phyla des natürlichen Habitats (hier: 15 bekannte und 16 unbekannte Phyla) zu erfolgreich isolierten Organismen (hier vier verschiedenen Phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*) beobachten.

4.1.2 Diversität (cellulolytischer) Bakterien, sowie deren Abundanz und Anpassung an Prozessbedingungen

Neben der bakteriellen Gemeinschaft in Biogasanlagen wurden in dieser Arbeit gezielt cellulolytische Bakterien analysiert. Hierzu erfolgte die Analyse analog zu 16S rRNA Gensequenzanalysen mit einem für diese Gruppe an Bakterien ausgewählten funktionellen Leitgens (GH48).

Quantifizierung via qPCR

Neben der Identifizierung einzelner Taxa ist auch die Abundanz und transkriptionelle Aktivität abhängig von den Prozessparametern, insbesondere zur Bewertung der cellulolytischen Kapazität, interessant. Diese Fragestellung muss nicht zwangsläufig über Amplikonsequenzierungen gelöst werden, sondern kann, wie auch in dieser Arbeit, über qPCR beantwortet werden. Die Quantifizierung der bakteriellen 16S rRNA und GH48 Gensequenzen zeigte auf, dass in allen IS Proben ein höherer Anteil an GH48-Modulsequenzen im Vergleich zu 16S rRNA Genkopien detektiert wurde. Somit war die selektive Anreicherung cellulolytischer Organismen über die etablierte IS-Methode wie erwartet erfolgreich (Mohamed und Chaudhry 2008; Koeck et al. 2016b; Rettenmaier et al. 2019a). Interessanterweise war der Anteil an GH48-Modulsequenzen in GR zu den Fermenterzuständen MS1, MI und TI im Vergleich zu MS2, MS3 und TS höher. Dies deutet darauf hin, dass cellulolytische Bakterien zu Beginn eines Fermenterbetriebes (MS1) einen höheren Stellenwert einnehmen als in effizient - ablaufenden Prozessphasen (MS2, MS3 und TS). Zudem scheinen cellulolytische Bakterien entweder im Vergleich zur Gesamtheit der Bakterien nicht so stark von Prozessstörungen (hier durch

Versäuerung) betroffen zu sein, oder aber korrelieren mit der ansteigenden Fütterungsrate und damit mehr verfügbarer Cellulose im Fermenter. (Rettenmaier et al. 2020b)

Die insgesamt sehr geringe Abundanz der GH48 Gene im Verhältnis zu den 16S rRNA Genkopien (0,3-3,7%) verdeutlicht, wie in Rettenmaier et al. (2020b) diskutiert, die Notwendigkeit eines spezifischen molekularen Markers zur Analyse spezifischer funktioneller Gruppen an Mikroorganismen. Zur Bewertung der mikrobiellen Zusammensetzung zu einzelnen Fermenterzuständen wurden deshalb in dieser Arbeit neben 16S rRNA auch GH48 Amplikonsequenzierungen mit DNA und RNA Proben in Zusammenhang gesetzt.

Amplikonsequenzierungen mit DNA

Die bakterielle Gemeinschaft, identifiziert über 16S rRNA Amplikone der Region V3-V4 in DNA, setzte sich aus im Mittel 170 bzw. 127 zOTUs für den mesophilen bzw. thermophilen Biogasprozess zusammen. Dies entspricht den Erwartungen aus früheren Arbeiten, welche ebenfalls eine Reduktion der Diversität auf Genus-Ebene in thermophilen gegenüber mesophilen Biogasanlagen beobachteten (Moset et al. 2015; Sekiguchi et al. 1998).

Auch in GH48 Amplikonsequenzierungen wurde eine etwas höhere Diversität für den mesophilen Prozess beobachtet. Insgesamt wurden im Mittel 7 bzw. 6 Gen-spezifische OTUs, mesophil bzw. thermophil, unabhängig von der Prozessstabilität detektiert. Für die Gesamtheit der Bakterien wurde aber eine Reduktion der Diversität vom stabilen zum instabilen Prozess beobachtet. Goux et al. (2015) zeigten für einen mesophilen Fermenterbetrieb, dass ähnlich wie in dieser Arbeit unabhängig von der Prozessstabilität die Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* dominierten. Eine Reduktion der bakteriellen Diversität wurde bei Goux et al. (2015) jedoch nicht beobachtet.

Wie bereits erwähnt dominierte das Phylum *Firmicutes* die bakterielle Gemeinschaft zu allen Prozessbedingungen, aber vor allem den thermophilen Fermenterbetrieb. Ebenfalls wurden 6 der 7 GH48-OTUs diesem Phylum zugeordnet. Die 16S rRNA zOTUs des Phylum *Firmicutes* setzten sich vor allem aus zOTUs der Klasse *Clostridia* oder unbekannter Taxonomie zusammen. Dies korreliert mit der Zusammenfassung bakterieller Gemeinschaften nach Hassa et al. (2018), welche *Clostridia* und *Bacilli* als abundante Klassen des Phylum *Firmicutes* in Biogasanlagen beschreibt. Zudem wurden, wenn auch nur in geringer relativer Abundanz in allen analysierten Proben, aber vor allem im mesophilen Fermenterbetrieb, 16S rRNA zOTUs der Familie *Lachnospiraceae* detektiert. Diese Familie beinhaltet auch den Genus *Herbinix*, welcher nach den Beschreibungen von Koeck et al. (2015b) und Koeck et al. (2016a) vor allem bei thermophilen Prozessbedingungen eine tragende Rolle für den Abbau von pflanzlicher Biomasse haben könnte. Dies wurde in dieser Arbeit auch durch die Identifikation von GH48-OTUs des Genus *Herbinix* in hoher relativer Abundanz in DNA isoliert aus GR, sowohl für den mesophilen als auch thermophilen Biogasprozess, unterstützt.

Zur Klasse der *Clostridia* zählen auch Spezies des Genus *Acetivibrio* (früher: *Clostridium*). GH48-OTUs dieser Taxonomie wurden, aus DNA isoliert am LfL-AQU, vor allem für den mesophilen Prozess detektiert. Zudem nahm die relative Abundanz für MI im Verlauf der Probenahmen (siehe dazu Tab. A 14) von PN2 zu PN19-1 oder -2 ab. Im Gegensatz dazu dominierte dieses Genus die cellulolytische Gemeinschaft insbesondere in DNA isoliert aus TS-IS oder TI-IS, aber auch TS-GR und TI-GR. Für den mesophilen Prozess wurden stattdessen vermehrt GH48-OTUs unbekannter Genera innerhalb der gleichen Familie (*Oscillospiraceae*) detektiert. Die höhere relative Abundanz des Genus in TS-IS und TI-IS war zu erwarten, da die Vertreter des Genus *Acetivibrio*, wie z.B. *A. thermocellus* = *C. thermocellum* nach Koeck et al. (2014b), bekannt für den effizienten Celluloseabbau vor allem bei thermophilen Bedingungen sind.

Interessanterweise wurden GH48-Gensequenzen des nach Barka et al. (2015) als aerob beschriebenen Genus *Thermobifida*, Phylum *Actinobacteria* in allen Proben detektiert, obwohl der Biogasfermenter strikt anaerob betrieben wurde. Die relative Abundanz dieses Genus schwankte zwischen 1% (TI-PN8-9-2) und 42% (MS-PN2). Auch in DNA isoliert aus GR oder IS zu jeweils anderen Zeitpunkten derselben Fermenterbetriebe konnten zum Teil GH48-OTUs des Genus *Thermobifida* nachgewiesen werden. Die relative Abundanz schwankte zwischen 0% (MS2-IS) bis 2% (MS1-GR). Zudem wurden mit bis zu 1% relativer Abundanz in TS-IS auch GH48-OTUs der Familie *Streptomycetaceae*, Phylum *Actinobacteria* detektiert. Jedoch traten in diesen Proben keine 16S rRNA zOTUs des Phylum *Actinobacteria* auf. Dieses Phylum besteht hauptsächlich aus aeroben, aber auch fakultativ anaeroben Vertretern (Barka et al. 2015). Trotzdem wurden auch in den Arbeiten von Senés-Guerrero et al. (2019) zu anaeroben Biogasfermentern *Actinobacteria* in einem relativen Anteil von 12-32% in der mikrobiellen Gemeinschaft detektiert. Dies deutet darauf hin, dass dieses Phylum möglicherweise auch eine Bedeutung hinsichtlich des Celluloseabbaus im anaeroben Biogasprozess haben könnte. Erkenntnisse aus verschiedenen Co-Kultivierungen stützen die Möglichkeit des Synergismus aerober und anaerober Organismen (Du et al. 2020). Um dies eindeutig zu klären müssen die Vertreter der GH48 OTUs im Einzelnen isoliert und phänotypisch charakterisiert werden. Jedoch war die in dieser Arbeit angewandte Isolierungsstrategie der anaeroben Kultivierung möglicherweise nicht passend für diese Organismen. Andererseits ist auch denkbar, dass diese GH48 OTUs aufgrund einer PCR-basierten Verzerrung der abgebildeten cellulolytischen Gemeinschaft unter den angewendeten Analysemethoden auftraten.

In DNA isoliert aus GR oder IS wurde insgesamt eine höhere Diversität der cellulolytischen Bakterien beobachtet als in den Ergebnissen in DNA aus GR isoliert am LfL-AQU. Im Mittel wurden 17 verschiedene GH48-OTUs in den einzelnen Proben detektiert. Dies entspricht einer fast dreifachen Erhöhung der α -Diversität im Vergleich zu DNA isoliert aus GR am LfL-AQU. Ein Grund für diese Abweichung könnten die Probenlagerung, sowie die Nukleinsäure-Extraktions-Methoden sein. Identisch vorgegangen wurde jeweils für die Amplifikation und Sequenzierung der Zielgene, sowie der nachfolgenden bioinformatischen und statistischen Auswertung. Die DNA Isolierung aus GR oder IS Proben erfolgte zeitnah nach der PN aus dem Biogasfermenter ohne explizite Probenlagerung. Zudem wurde hier ein möglichst vollständiger Zellaufschluss durch beat-beating (2x20 s bei 5 m/s) erreicht. Im Gegensatz dazu erfolgte die DNA-Isolierung am LfL-AQU nach Lagerung des GR in RNAlater und einer sequenziellen Zell-Lyse über beat-beating (jeweils 5 s bei 6 m/s), um eine möglichst hochmolekulare DNA für weiterführende Metagenomsequenzierungen zu erlangen. Diese Differenz in der Probenlagerung und Extraktion kann im Zusammenhang mit Erfahrungen aus anderen Arbeiten (Albertsen et al. 2015; Choo et al. 2015; Lebuhn et al. 2016) durchaus zu der Differenz in der Diversität der detektierten GH48-Gensequenzen geführt haben. Zudem deutet die nicht vollständige Klassifizierung bis auf Genus-Level der GH48-OTUs aus GR oder IS darauf hin, dass vor allem im mesophilen Biogasfermenter ein hoher Anteil an cellulolytischen Bakterien unbekannt ist. Der Anteil unbekannter Genera in 16S rRNA zOTUs war hingegen unabhängig von der Betriebstemperatur gleichbleibend hoch. Insgesamt wurde in dieser Arbeit ein höherer Anteil unbekannter bakterieller Genera detektiert als von Hassa et al. (2018) zusammengefasst [14-41% nach Stolze et al. (2015) und Maus et al. (2016) im Vergleich zu 81,3% +/- 3% in dieser Arbeit]. Dies könnte auf eine verbesserte Auflösung durch die angewandte Methodik in der Detektion unbekannter Bakterien im Biogasprozess hindeuten.

Amplikonsequenzierungen mit RNA

In RNA wurde ähnlich zu den Ergebnissen in DNA eine höhere Diversität in der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft im mesophilen Fermenterbetrieb im Vergleich zum thermophilen Fermenterbetrieb detektiert. Allerdings wurde keine Reduktion in der Diversität durch Prozessinstabilität für den thermophilen Betrieb beobachtet. Die statistische Auswertung zwischen den einzelnen mikrobiellen Gemeinschaften fasst in beiden angewandten Methoden, gezielte β -Diversitäts-Analyse und *de novo clustering*, jeweils die zOTUs detektiert in DNA und RNA eines Fermenterbetriebes in eine Gruppe zusammen. Durch die höhere Diversität im mesophilen Fermenterbetrieb war auch wie erwartet der Unterschied, herbeigeführt durch die Prozessinstabilität, höher als im Vergleich zur Differenz der mikrobiellen Gemeinschaft im thermophilen Fermenterbetrieb.

Am Beispiel des Phylums *Thermotogae* ist herauszustellen, dass auch in DNA wenig abundante Spezies transkriptionell aktiv erscheinen und dementsprechend eine tragende Rolle im Biogasprozess haben könnten. Allerdings wurde hier die erhöhte relative Abundanz in RNA für den thermophil-instabilen Prozess detektiert. Somit könnten Spezies dieses Phylums entweder zur Instabilität beigetragen haben, oder im Vergleich zur restlichen Mikrobiota weniger sensitiv auf die Störung reagiert haben. Ergebnisse von anderer Seite detektierten 16S rRNA OTUs des Phylum *Thermotogae* auch in DNA und RNA aus thermophil-betriebenen Biogasanlagen (Hassa et al. 2018; Maus et al. 2016). Bisher deutete dies allerdings auch bei erhöhter *organic loading rate* nicht auf eine Prozessinstabilität durch diese Bakterien hin (Barros et al. 2017).

Für GH48 OTUs in RNA wird erneut die Problematik der Amplikonsequenzierungen deutlich. Durch die Anwendung des neuen Primer-Mixes cel48-Mix2 nach Rettenmaier et al. (2020b) kann es zu einer PCR-geschuldeten Verzerrung der relativen Abundanz aktiver cellulolytischer Bakterien kommen. Dies ist in Arbeiten mit RNA gravierender als im Vergleich zu Arbeiten mit DNA, da durch die genspezifische RT ein weiterer Amplifikationsschritt hinzukommt. Dieser kann nachfolgend, wie in „4.1.1 Identifizierung bakterieller Taxa über kultivierungsunabhängige Methoden“ bereits diskutiert, für einen noch stärkeren „Primer-Bias“ sorgen. Die Ergebnisse der Amplikonsequenzierungen in RNA der IS-Proben von MS1 und MS2 verdeutlichen dies. Hier wurden für die genspezifische RT zwei verschiedene reverse Primer verwendet. Die Anwendung des diverseren Primer-Mix cel48-Mix2R resultierte in einer, im Hinblick auf die Ergebnisse der 16S rRNA Amplikonsequenzierungen, realistischeren Zusammensetzung der cellulolytischen Gemeinschaft. Die detektierten Genera (*Acetivibrio*, *Clostridium*, *Herbinix* und *Thermoclostridium*) oder Familien (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* und *Clostridiaceae*) spielten auch in der Gesamtheit der bakteriellen Mikrobiota des analysierten Biogasfermenters eine Rolle. Aufgrund der geringen Abundanz der GH48 Gensequenzen in der Gesamtheit der extrahierten Nucleinsäuren (siehe „Quantifizierung via qPCR“) ist die Amplifikation aus RNA mit einem Primer-Gemisch jedoch herausfordernd (Rettenmaier et al. 2020b). In RNA der Fermenterbetriebe MI, TS und TI könnten weder in GR noch in IS Proben genspezifische Amplikate generiert werden. Zudem verdeutlichen die Ergebnisse der GH48 Gensequenzen in RNA des mesophil-stabilen Betriebes erneut die Problematik der Nucleinsäure-Extraktion. Wie bereits beschrieben könnte die veränderte Methodik hier zu einer signifikanten Reduktion der detektierten GH48 OTUs geführt haben.

4.1.3 Anreicherung, Identifizierung und Isolierung cellulolytischer Bakterien

Ein Ziel dieser Arbeit war die selektive Anreicherung, Identifizierung und Isolierung noch nicht beschriebener cellulolytischer Bakterien aus Biogasfermentern, um weiterführend ein verbessertes Verständnis der Hydrolyse organischer Biomasse zu erlangen. Hierzu erfolgte eine Selektion hinsichtlich der Verwertung kristalliner Cellulose in Form von FP. Cellulolytische Anreicherungskulturen wurden seriell verdünnt und jeweils die höchste cellulolytische Verdünnungsstufe molekularbiologisch mittels 16S rRNA Amplikonsequenzierung, und in Schmidt (2019) z.T. auch über GH48-Amplikonsequenzierungen, analysiert. Die Zeit der Inkubation variierte abhängig von der Geschwindigkeit der Cellulolyse, da deutlicher FP-Abbau (>50%) garantierte, dass auch cellulolytische Mikroorganismen metabolisch aktiv waren. Chaudhary et al. (2019) diskutierten, dass eine verlängerte Inkubationszeit, sowie, ähnlich zu GR20-Medium in dieser Arbeit, Erd-Extrakt zusammen mit kommerziellen Medien positiven Einfluss auf die Isolierung neuartiger Taxa hat. Der hohe Anteil an zOTUs unbekannter Genera [siehe „4.1.2 Diversität (cellulolytischer) Bakterien, sowie deren Abundanz und Anpassung an Prozessbedingungen“] deutet darauf hin, dass die in dieser Arbeit gewählte Anreicherungsmethode durchaus zu neuartigen Isolaten führen kann. Zudem zeigten die Arbeiten von Kurm et al. (2019), dass sowohl abundante als auch wenig-abundante Organismen aus der mikrobiellen Lebensgemeinschaft isoliert werden können.

Insgesamt wurden mesophil Spezies der Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* bzw. thermophil ausschließlich *Firmicutes* angereichert. Basierend auf der GH48-Datenbank nach Rettenmaier et al. (2020b) sind GH48 Gene vor allem in den Phyla *Actinobacteria* (680) und *Firmicutes* (213) vertreten und nur wenig abundant bei *Bacteroidetes* (27). Organismen des Phylums *Actinobacteria* waren in den Biogasfermenterproben nicht vertreten. Somit war die selektive Anreicherung der Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* zu erwarten. Die Analysen von Schmidt (2019) zeigten, dass darunter auch neuartige cellulolytische Vertreter waren.

In dieser Arbeit werden zwei neuartige mesophile cellulolytische Spezies (MA18^T und N2K1^T) beschrieben, welchen nachfolgend den Genera *Ruminiclostridium* bzw. *Acetivibrio* (beide Familie *Oscillospiraceae*) zugeordnet werden konnten (Rettenmaier et al. 2019b; Rettenmaier et al. 2021). Zudem wurden in Rettenmaier (2017) aus dem mesophilen Fermenterbetrieb in 2017 die cellulolytischen Spezies *R. cellobioparum* (mesophil) und *A. thermocellus*, *H. hemicellulosilytica*, *A. clariflavus* und *T. stercorarium* (thermophil) isoliert. Schmidt (2019) isolierte zudem *Cellulosilyticum lentocellum* (mesophil), sowie erneut *A. thermocellus* und *H. hemicellulosilytica* (beide thermophil) aus den Fermenterbetrieben in 2019. Schon in den Arbeiten von Koeck (2016) wurden, wie auch in dieser Arbeit, ausschließlich cellulolytische Bakterien des Phylums *Firmicutes* isoliert.

Die GH48 Amplikonsequenzierungen in DNA isoliert aus GR oder IS der Fermenterbetriebe in 2019 identifizierten GH48 Gensequenzen des Genus *Thermoclostridium* nur in sehr geringer relativer Abundanz (max. 0,05% in MS1-GR). Dies verdeutlicht erneut, dass Organismen mit sehr geringer relativer Abundanz, hier *T. stercorarium*, isoliert werden können. Diese wenig abundante Organismen sind nicht zwangsläufig unbedeutende Begleitflora, sondern können durchaus eine zwar spezialisierte jedoch tragende Rolle in der mikrobiellen Gemeinschaft haben (Kurm et al. 2019). Aufgrund der physiologischen Eigenschaften der thermophilen Spezies *T. stercorarium* (Madden 1983) ist jedoch die Relevanz von *Thermoclostridium* spp. für den Celluloseabbau in mesophilen Biogasfermentern fraglich. Zudem war dieses Genus in den Sequenzierungen der DNA isoliert aus GR am LfL-AQU nicht repräsentiert. Dominierend waren stattdessen die Genera *Herbinix* (Familie *Lachnospiraceae*), *Acetivibrio* (Familie *Oscillospiraceae*) oder *Clostridium* (Familie *Clostridiaceae*) in beiden Sequenzierungen, sowie unbekannte Genera dieser Familien in der Sequenzierung mit DNA isoliert aus GR oder IS. Die gewonnenen Isolate (Tab. 44) deckten somit einen Großteil dieser über GH48 Amplikonsequenzierung identifizierten Taxa ab. Nicht isoliert wurden Vertreter des Genus *Bacillus*, *Thermobifida* oder *Bacteroides*. Die angewandte Isolierungsstrategie der strikt anaeroben Kultivierung könnte ungeeignet für Spezies dieser Genera gewesen sein, obwohl die GH48 Amplikonsequenzierungen ausgewählter Anreicherungskulturen nach Schmidt (2019) einmalig jeweils GH48 OTUs des Genus *Bacteroides* (MS-GR-I-GR20) detektierten. Allerdings deuten die Sequenzierungen mit RNA darauf hin, dass diese Genera in den analysierten Proben transkriptionell nicht aktiv waren. Somit ist denkbar, dass Spezies dieser Genera für den Celluloseabbau zu den analysierten Zeitpunkten (hier nur mesophil-stabil) keine tragende Rolle gespielt haben.

4.2 Charakterisierung neuartiger Bakterien

4.2.1 Bedeutung vergleichender Charakterisierungen

Tindall et al. (2010) gaben einen Leitfaden zur Charakterisierung neuartiger prokaryotischer Taxa vor. Die Notwendigkeit dieser Standards wird auch in dieser Arbeit deutlich. Herauszustellen ist vor allem die vergleichende Charakterisierung unter identischen Laborbedingungen. In dieser Arbeit wurde N2K1^T als neuartige Spezies valide beschrieben (Rettenmaier et al. 2019b). Weiterführend wurde jedoch gezeigt, dass N2K1^T nicht wie beschrieben ausschließlich die C-Quellen Cellulose und Cellobiose metabolisiert, sondern unspezifisch auch mit Xylose als einzige C-Quellen proliferieren kann. Verändert zu den Experimenten aus Rettenmaier et al. (2019b) wurde einzig die Konzentration der eingesetzten C-Quellen. Dies verdeutlicht, dass zu beobachtende physiologische Eigenschaften eines neuartigen Organismus stark von den spezifischen Kultivierungsbedingungen abhängen. Im Fall von N2K1^T sind deshalb, ähnlich wie für die beiden nächstverwandten Spezies *A. thermocellus* und *A. straminisolvens*, Cellulose und Cellobiose die bevorzugten C-Quellen. Die Verwertung der Pentose Xylose scheint

vielmehr nur über unspezifischen Transport in die Zelle von statten zu gehen. Ähnliches wurde in anderen Arbeiten auch für *A. thermocellus* beobachtet. Charakterisierungen verschiedener *A. thermocellus* Stämme deuteten auf eine nicht präferierte Verwertung der C-Quelle Glucose hin (Freier et al. 1988; Ng und Zeikus 1982). Diese Verwertung ist, ähnlich wie im Fall von N2K1^T für Xylose, ineffizient (Ng und Zeikus 1982).

Die Beobachtungen zur morphologischen Beschreibung des neuartigen Taxons MD1 verdeutlicht ebenfalls die Notwendigkeit vergleichender Charakterisierungen. Verschiedene mikroskopische Aufnahmen zeigten eine stark variable Zellmorphologie abhängig von den Kultivierungsbedingungen. Demnach sind diese mikroskopischen Aufnahmen einzig Momentaufnahmen und geben bei nicht ausreichender Investigation gegebenenfalls ein falsches Bild über die Morphologie des neuartigen Taxons. Auch beobachtete Di Bello (2020) verschiedene Zellformen von MD1 und der beiden nächstverwandten Organismen *M. sibirica* DSM 26468^T und *A. torta* DSM 100431^T abhängig vom verwendeten Medium. Jedoch gestaltet sich die Durchführung vergleichender Charakterisierungen für neuartige Vertreter eines potentiell neuen Genus (hier MD1) oder neuer Familien schwierig, da die Auswahl der Referenzstämmen bereits eine Herausforderung ist und zu einer Verzerrung der experimentellen Daten führen kann. Zudem müssen für diese zum Teil stark verschiedenen Organismen einheitliche Laborbedingungen festgelegt werden, bei denen alle zu analysierenden Organismen gut proliferieren können. Dies bietet zwar die Möglichkeit, basierend auf Experimenten unter gleichen Bedingungen, Abgrenzungen hinsichtlich physiologischer Eigenschaften zu ziehen, könnte aber als Nebeneffekt zu einem verzerrten Bild hinsichtlich der Physiologie des neuen Taxons führen. Deshalb ist neben der vergleichenden Charakterisierung die investigative Forschung zu den optimalen Wachstumsbedingungen eines neuartigen Taxons relevant. Hinweise, welche diese sein könnten, können einerseits aus den Bedingungen im natürlichen Habitat oder der Isolierungsmethode gewonnen werden. Andererseits können auch Hinweise aus der funktionellen Analyse der Genomsequenz, sofern vorhanden, herangezogen werden. Relevant für eine valide Vorhersage dieser genomsequenzbasierten Eigenschaften ist jedoch wiederum eine gute Referenzdatenlage.

4.2.2 Bedeutung genomsequenzbasierter Daten

Die Bedeutung von Genomsequenz-Information zur Isolierung und Charakterisierung neuartiger Taxa wird in dieser Arbeit auch am Beispiel MD1 deutlich. Dieser neuartige Organismus wurde gezielt nach der funktionellen Analyse der Genomsequenz, assembliert aus dem Multi-Genom von S4MN4, isoliert. Die funktionelle Analyse vereinfachte die Auswahl einer selektiven C-Quelle und erlaubte damit die Vereinzelung dieses Organismus aus der Mischkultur. Die funktionelle Analyse einer Genomsequenz hinsichtlich allgemeiner Stoffwechselwege (hier KEGG (Ogata et al. 1999)) oder spezifizierter Enzymausstattungen (hier: dbCAN2 (Zhang et al. 2018a)) ermöglicht eine vorläufige Abschätzung der

Eigenschaften und Relevanz eines Isolates in einem bestimmten Habitat. Zudem ist für die Nutzung spezifischer Enzyme aus der Umwelt nicht zwangsläufig ein Isolat in Reinkultur notwendig. Funktionelle Screenings, Charakterisierungen von Enzymen oder komparative Studien können auch allein basierend auf DNA-Sequenz-Informationen durchgeführt werden (Armstrong et al. 2019; Bohra et al. 2019; Strazzulli et al. 2020).

Die Assemblierung and Annotation von Genomen aus metagenomischen Sequenzierungen, sogenannte MAGs, wird aufgrund der wachsenden technologischen Möglichkeiten zunehmend bedeutender. Die Studie von Campanaro et al. (2020) assemblierte aus 134 öffentlich zugänglichen Datensätzen 1.635 MAGs verschiedener Bakterien oder Archaeen. Diese MAGs können weiterführend zur genaueren metabolischen Analyse bakterieller Gemeinschaften, wie z.B. der Analyse einzelner Stoffwechselwege über KEGG, oder auch zur Identifikation einzelner Taxa in einem Metagenom herangezogen werden. In dieser Arbeit konnte basierend auf der ersten Genomsequenz der Spezies *D. raffinosedens* (hier: Isolat 249c-K6) ein MAG aus dem Datensatz von Campanaro et al. (2020) eindeutig dieser Spezies zugeordnet werden (Rettenmaier et al. 2020c). Dies verdeutlicht, dass MAGs eine gute Grundlage zur Genomsequenz-Analyse eines komplexen Habitats ist, die eindeutige Zuordnung dieser metagenomischen Sequenzen jedoch valide Referenzdaten wie z.B. die Genomsequenzen aus Reinisolaten benötigt.

Die taxonomische Klassifizierung von MAGs ist im Hochdurchsatz über das *Genome Taxonomy Database Toolkit* möglich (Chaumeil et al. 2019), welches eine Verbesserung zu z.B. MiGA (Rodriguez-R et al. 2018) bieten soll. Dieses Toolkit wird zweimal im Jahr aktualisiert, um neuen Genome der NCBI Datenbank einzufügen, und basiert auf der Taxonomie über *relative evolutionary divergence* nach Parks et al. (2018), sowie auf ANI-Berechnungen zur Abgrenzung auf Spezies-Ebene (Konstantinidis und Tiedje 2005). Allerdings beinhaltet diese Datenbank neben Genomen aus isolierten Taxa auch MAGs oder SAGs (engl.: *single-amplified genomes*). Der Anteil dieser nicht isolierten, und demnach auch nicht charakterisierten, Genomsequenzen beträgt auf Genus-Ebene >50% (<https://gtdb.ecogenomic.org/stats>; abgerufen am 09.12.2020). Fraglich ist, wie sinnvoll eine taxonomische Zuordnung bis auf Genus oder Spezies-Ebene ist, wenn keinerlei experimentelle physiologische Eigenschaften zu diesen Taxa verfügbar sind. Die Beschreibung neuartiger Taxa sollte eine Kombination von phänoptischen und genotypischen Charakteristika sein. Solche Datenbanken bieten demnach eine Grundlage, um ausschließlich erste Einschätzungen hinsichtlich der Taxonomie und weiterführend der möglichen Eigenschaften und deren Bedeutung eines Organismus in einem natürlichen Habitat zu treffen.

Diese genomsequenzbasierten Einstufungen ersetzen demnach nicht die physiologische Charakterisierung neuartiger Isolate, können aber dazu genutzt werden, um gezielte Isolierungen und

Charakterisierungen neuartiger Taxa mit in einem größeren Zusammenhang interessanter physiologischer Eigenschaften durchzuführen. Im Umkehrschluss sollte jedoch auch für jedes gewonnene und charakterisierte Taxon eine Genomsequenz in größtmöglicher Qualität zum Standard einer Spezies oder Genus-Charakterisierung sein und muss gegebenenfalls auch die nächstverwandten Taxa inkludieren. Erst die Kombination aus Genotyp und Phänotyp gibt ein umfassendes Bild über das beschriebene neuartige Taxon. Dies verdeutlichte die fehlende Genomsequenz zu *M. sibirica* DSM 26468^T, die die taxonomische Klassifizierung von MD1 erschwerte.

4.2.3 Abgrenzung neuartiger Taxa auf Spezies oder Genus-Ebene

Die Identifizierung prokaryotischer Taxa benötigt verschiedene Grenzwerte zur Klassifizierung. Insbesondere die Abgrenzung auf Spezies- oder Genus-Ebene über Sequenzabgleiche war in dieser Arbeit entscheidend. Hierzu wurde das wohl bekannteste und etablierte Markergen, die bakterielle 16S rRNA, ob in Volllänge oder in spezifischen Regionen (hier V3-V4), mit Analysen basierend auf der kompletten Genomsequenz kombiniert. 16S rRNA Gensequenzanalysen ermöglichen aufgrund der guten Referenzgrundlage (z.B. EZbiocloud (Yoon et al. 2017), NCBI 16S RefSeq (O'Leary et al. 2016), RDP (Cole et al. 2014), SILVA (Quast et al. 2012)) eine schnelle Klassifizierung eines bakteriellen Taxons. Trotz der guten Datenlage unterliegt auch diese Möglichkeit der Klassifizierung einer gewissen Variabilität. So sind die vorgeschlagenen Grenzwerte von 95% bzw. 97% 16S rRNA Gensequenzidentität nach Tindall et al. (2010) längst durch neuere Studien, wie z.B. von Johnson et al. (2019), überholt, jedoch gibt es keine „allgemeingültigen“ Grenzwerte nach denen (Re-)Klassifizierungen vorgenommen werden. Stattdessen treten ganzheitliche Analysen der Genomsequenz in den Vordergrund. Bereits Tindall et al. (2010) stellten die Notwendigkeit der Validierung der 16S rRNA basierten Taxonomie heraus und schlugen DNA-DNA bzw. DNA-RNA Hybridisierungen vor. Aufgrund der stetig steigenden bioinformatischen Möglichkeiten erfolgte in dieser Arbeit die ganzheitliche Analyse der Genomsequenz einerseits über *in silico* berechnete ANI-Werte (Konstantinidis und Tiedje 2005). Andererseits erfolgte zusätzlich die Berechnung phylogenetischer Bäume, sowohl basierend auf 16S rRNA Gensequenzen [hier nach der *Maximum Likelihood* Methode (Felsenstein 1981)], als auch über den Vergleich von 92 bakteriellen *core* Genen nach Na et al. (2018). Die Kombination dieser Methoden ermöglichte die valide Klassifizierung der neuartigen cellulolytischen Spezies N2K1^T und MA18^T. In beiden Fällen gab die Analyse der kompletten Genomsequenz wichtige Hinweise zur Identifizierung der nächstverwandten Spezies innerhalb des Genus und ermöglichte somit auch eine zielgerichtete Abgrenzung der neuartigen Isolate zu diesen Spezies (Rettenmaier et al. 2019b; Rettenmaier et al. 2021).

Entscheidend für den Erfolg dieser Analysen sind jedoch eine vollständige Referenzdatenbank sowie eine valide Klassifizierung. Für die Genera *Acetivibrio* (N2K1^T) und *Ruminiclostridium* (MA18^T) war,

möglicherweise aufgrund der Relevanz einzelner Vertreter dieser Genera für biotechnologische Prozesse (Tian et al. 2016; Lin et al. 2015; Ren et al. 2019; Orita et al. 2017), für jede valide beschriebene Spezies eine Genomsequenz vorhanden. Anzahl und Qualität dieser Genomsequenzen variierte jedoch (Tab. 48). Am Beispiel des Isolates MD1 aus dieser Arbeit wird deutlich, dass die valide Klassifizierung mit weniger verfügbaren Referenzdaten problematisch wird. Basierend auf der 16S rRNA Gensequenzanalyse (paarweises Alignment oder Phylogenie) konnte MD1 als neuer Genus innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* abgegrenzt werden. Phylogenetische Analysen der kompletten Genomsequenz bestätigten die 16S rRNA Phylogenie für Spezies mit verfügbaren Genomsequenzen. Jedoch fehlte zum Zeitpunkt der Analysen die Genomsequenz von *M. sibirica*, dem potentiell nächstverwandten Organismus, und erschwerte somit eine eindeutige Klassifizierung.

Neben den bereits erwähnten Methoden wurde im Fall von MD1 auch ein weiterer Grenzwert, der zur Abgrenzung auf Genus-Ebene geeignet sein soll, angewandt. Der POCP-Wert nach Qin et al. (2014) wurde bereits zur Unterscheidung des diversen Taxon *Clostridium* cluster III angewandt (Zhang et al. 2018b). Der POCP-Wert von MD1 zu *A. torta* DSM100431^T beträgt 50,58% und liegt demnach sehr nah an dem vorgeschlagenen Grenzwert von 50% (Qin et al. 2014). Bereits die Reklassifizierungen von Zhang et al. (2018b) führten zu einigen Kontroversen hinsichtlich der Gruppierung der *Clostridium* cluster III Spezies in vier verschiedene Genera, insbesondere der Reklassifizierung von *Herbivorax saccincola* zu *Hungateiclostridium saccincola* (nachfolgend *Acetivibrio saccincola* (Tindall 2019b)) mit 16S rRNA Gensequenz-Übereinstimmungen von 93,5-94,5% zu allen anderen Spezies innerhalb des Genus bzw. POCP-Werten >54% mit Ausnahme von *A. cellulolyticus* (POCP = 45%). Demnach widerspricht diese Taxonomie allen aktuell vorgeschlagenen Grenzwerten (<95% 16S rRNA Identität und POCP <50% zur Abgrenzung auf Genus-Ebene) und verdeutlicht die Notwendigkeit, dass neben diesen Berechnungen physiologische Daten als Grundlagen zur Beschreibung eines neuartigen prokaryotischen Taxons unabdingbar sind, welche auch bei der Benennung (re-)klassifizierter Taxa nicht außer Acht gelassen werden sollten.

4.2.4 Reinkulturen, Co-Kulturen oder Mischisolate

In dieser Arbeit wurden neben Reinkulturen auch vermehrt bakterielle Co-Kulturen isoliert und charakterisiert. Die Analyse der Cellulose-Hydrolyse für die Co-Kultur 253c-K6 aus *D. raffinosedens* und *A. thermocellus* zeigten die Möglichkeiten bakteriellen Zusammenspiels für die Hydrolyse pflanzlicher Biomasse auf (Rettenmaier et al. 2020c). Die Analysen der Mischkultur S4MN4 bestätigt, dass eine Co-Kultur im Vergleich zu Reinisolaten (hier N2K1^T und MD1) ein höheres Potential zur Hydrolyse diverser Polysaccharide hat. Im Gegensatz zu S4MN4 konnte die Reinkultur N2K1^T Xylan nicht für Wachstum nutzen, obwohl N2K1^T über eine diverse CAZyme Ausstattung verfügt, die unter anderem putative Vertreter der GH10 und GH11 mit putativer Xylanase-Aktivität beinhaltet (Tab. A 4). Für MD1 in Reinkultur wurde Wachstum nur für lösliche C-Quellen beobachtet. Die 16S rRNA Amplikonsequenzierungen bestätigen, dass die Mischkultur in ihrer bakteriellen Zusammensetzung anpassungsfähig an die zur Verfügung stehende C-Quelle ist. Zudem wird deutlich, dass ähnlich zu den Beobachtungen der Co-Kultur 253c-K6 saccharolytische Organismen relativ gesehen einen bedeutend hohen Anteil in einer Mischkultur haben. Im Fall S4MN4 dominierten zum Teil auch asacharolytische Organismen (*C. jeddahense*, S1).

Kreuzfütterungsprozesse sind bei cellulolytischen Organismen bereits bekannt. Zhang und Lynd (2005) beschrieben für *A. thermocellus* detailliert die Sekretion von Glucose bei Wachstum auf Cellulose oder Cellodextrinen, die in dieser Arbeit auch für MA18^T beobachtet wurde. Die Analysen zu *C. sartagoforme* Isolaten (MA7c und MA7nc) bestätigen, dass ein sehr geringer Anteil eines cellulolytischen Vertreters (hier: *R. josui*) bereits zu Cellulolyse-Hydrolyse führen kann und über einen Kreuzfütterungsprozess ähnlich zu 253c-K6 der saccharolytische Organismus (hier: *C. sartagoforme*) den cellulolytischen verdrängt.

Bereits Freier et al. (1988) diskutierten, dass viele Spezies-Charakterisierungen basierend auf kontaminierten Kulturen bzw. Misch- oder Co-Kulturen entstanden sind, was möglicherweise in früheren Zeiten mangels verfügbarer Methoden zur Identifizierung zustande kam. Deshalb wird in dieser Arbeit postuliert, dass die als cellulolytisch beschriebene Spezies *C. sartagoforme* (Zhang et al. 2015; Nathani et al. 2016) in Reinkulturen nicht in der Lage ist, kristalline Cellulose zu hydrolysieren. Die Analysen der sekretierten Proteine im Kulturüberstand von MA7c und MA7nc aus dieser Arbeit bestätigen diese Hypothese. Zudem identifizierte Nathani et al. (2016) keine Cellulasen der Familien GH5, GH8, GH9 oder GH48 im Genom von *C. sartagoforme* AAU1.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit zusammen mit anderen Arbeiten zu bakteriellen Co-Kulturen (Wang et al. 2016; Theiri et al. 2019; Froese et al. 2019) verdeutlichen, dass für biotechnologische Anwendungen, hier am Beispiel der Verwertung von Lignocellulose, oftmals ein bakterielles Konsortium vorteilhaft ist. Multi-Spezies Isolate, wie z.B. S4MN4, können auch ohne die Identifizierung

und Charakterisierung der einzelnen Organismen ähnlich wie bei den Arbeiten von Kinet et al. (2015) biotechnologisch eingesetzt werden. Der Erfolg könnte jedoch limitiert sein. Für eine gezielte Entwicklung bakterieller Co-Kulturen bleibt das Verständnis des Metabolismus jeder einzelnen beteiligten Spezies entscheidend. Neben der Stamm-Charakterisierung anhand klassischer Mikrobiologie können Genomsequenzanalysen, wie z.B. von *Thermoanaerobacter* spp. durch Verbeke et al. (2013), entscheidende Informationen zur Entwicklung von Designer-Co-Kulturen mit dem Ziel der verbesserten Ausbeute (hier Biokraftstoffe aus Lignocellulose) geben. Beides wurde in dieser Arbeit für neuartige Isolate (N2K1^T, MA18^T und MD1) durchgeführt und bietet daher eine gute Grundlage für weiterführende Arbeiten.

4.3 Schlussfolgerung

Die Kombination der mikrobiologischen Arbeiten mit molekularbiologischen und bioinformatischen Methoden zur Beschreibung cellulolytischer Spezies in Biogasfermentern ermöglichte nicht nur ein umfassendes Bild über die bakterielle Gemeinschaft dieses Habitats, sondern lieferte auch Erkenntnisse zur interdisziplinären Zusammenarbeit (Mikrobiologie und Bioinformatik). Eine valide Auswertung und Interpretation bioinformatischer Daten komplexer Mikrobiome oder auch Reinisolaten ist zumeist nicht ohne mikro- und molekularbiologische Experimente möglich. Im Gegenzug erleichtern bioinformatische Daten das Design der Experimente indem sequenzbasierte Vorhersagen als Grundlage herangezogen werden können. Der massive Anstieg verfügbarer Referenzdaten erleichtert die Auswahl von Sequenzinformationen, die zur Auswertung herangezogen werden können. Weiterführend werden diese Referenzdatenbanken am besten in Kombination mit mikro- und molekularbiologischen Daten eine Grundlage zur biotechnologischen Anwendung dieser Informationen bieten.

Ausblick

Das Habitat Biogasfermenter ist auch weiterhin eine interessante Ressource zur Isolierung neuartiger Mikroorganismen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten fokussierten sich auf Bakterien, die an der Hydrolyse von Pflanzenmaterial beteiligt sind und deshalb im Hinblick auf die Erzeugung erneuerbarer Energien von großem wirtschaftlichem und wissenschaftlichem Interesse sind.

Insbesondere die gezielte Identifizierung von GH48 Gensequenzen als Indikator für cellulolytische Bakterien zeigte, dass auch weiterhin noch ein großes Potential für die Isolierung cellulolytischer Vertreter neuer Genera oder Familien besteht. Die Isolierung, Charakterisierung und Genomsequenzierung dieser Celluloseverwerter kann neben dem Biogasprozess auch noch für andere biotechnologische Zwecke genutzt werden. Anderweitig ist die gezielte Identifizierung von CAZymes in Metagenomen und Metatranskriptom Daten denkbar um detaillierte Schlüsse über vorhandene Kohlenhydrat-Verwerter sowie deren transkriptionelle Aktivität zu ziehen. Sequenziermethoden der zweiten und dritten Generation ermöglichen die Assemblierung langer Nukleinsäurefragmenten auch aus komplexen Proben, wodurch die Zuordnung von Sequenzinformation zu einem Taxon vereinfacht wird. Weiterführend ist demnach die gezielte Isolierung und Charakterisierung basierend aus der Vorhersage physiologischer Eigenschaften gewonnen aus metagenomischen Sequenzinformationen (z.B. MAGs), ähnlich zu den Erfahrungen der Isolierung von MD1 in dieser Arbeit, denkbar. Es muss jedoch bedacht werden, dass die taxonomische und funktionelle Klassifizierung von Sequenzinformation abhängig von der zugrundeliegenden Datenbank ist. Demnach ist die Klassifizierung und funktionelle Annotation von MAGs nur als Grundlage zur weiteren Isolierung und Charakterisierung neuer Gattungen anzuwenden oder sollten bei fehlenden Referenzdaten vorsichtig interpretiert werden.

Auch haben die Ergebnisse zu den einzelnen Isolaten dieser Arbeit gezeigt, dass auch neue Isolate innerhalb eines bekannten Genus mit bereits charakterisierten Spezies interessante Eigenschaften haben können. Konkret spielte das bakterielle Isolat N2K1^T eine entscheidende Rolle bei der Hydrolyse kristalliner Cellulose in der Mischkultur S4MN4. Des Weiteren deutete die Analyse eines Gen-Clusters aus cellulosomalen Komponenten von MA18^T auf eine besonders große Cellulosom-Ausstattung hin. MA18^T hat entsprechend die genetischen Voraussetzungen, Cellulose effektiv zu hydrolysieren. Daneben bietet die Charakterisierung neuer Genera, hier möglicherweise MD1, einen großen Mehrwert an Wissen über die bakterielle Gemeinschaft in der Biogasanlage. Neue Methoden können bei der Isolierung neuartiger Bakterien helfen. Dementsprechend ist eine zielgerichtete Isolierung neuer Genera z.B. über *fluorescence-activated cell scanning* (FACS) vorstellbar. Die wachsende Menge an Metagenom und Metatranskriptom Daten bietet zur Entwicklung gezielter Sonden eine geeignete Grundlage.

Physiologische Tests zur kompletten Beschreibung neuer Arten bieten eine valide Möglichkeit weiterführende Erkenntnisse zu z.B. Sequenzinformationen bereit zu stellen. Dies kann jedoch nur bei Organismen, die unter Laborbedingungen proliferieren, durchgeführt werden. Deshalb sind neben der zielgerichteten Isolierung auch die Kultivierbarkeit und langfristige Aufrechterhaltung vitaler Zellen entscheidend. Hierzu müssen die Kultivierungsmethoden stetig weiterentwickelt werden. Diese sollten sich aus den Erfahrungen dieser Arbeit möglichst nahe am natürlichen Habitat orientieren. Weiterführend kann und muss die Interaktion einzelner Spezies in Mischkulturen oder natürlichen Habitaten näher untersucht werden. Zur biotechnologischen Anwendung neuartiger Isolate bietet die Charakterisierung solcher Mischkulturen eine geeignete Grundlage. Gezielte Analysen von Anreicherungen, Misch- und Co-Kulturen aus bekannten oder unbekanntem Spezies ist basierend auf den Erkenntnissen dieser sowie anderer Arbeiten eine vielversprechende Methode, um neuartige, biotechnologisch nutzbare Organismen oder Enzyme nach Möglichkeit zu identifizieren, zu isolieren und zu charakterisieren. Jedoch müssen angewandte Studien zielgerichtet für eine spezifische Einsatzmöglichkeit durchgeführt werden. Die Erkenntnisse zur Interaktion zweier oder mehrerer Spezies, hier 253c-K6 bzw. S4MN4, hinsichtlich der Hydrolyse von Pflanzenbiomassen sind erste Schritte in diese Richtung. Ob, und wie, eine Co-Kultur mit biotechnologischer Relevanz eingesetzt werden kann, muss jedoch weiter investigiert werden.

Literaturverzeichnis

- Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; van den Beek, M.; Bouvier, D.; Cech, M. et al.** (2018): The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research* 46 (W1), W537-W544. DOI: 10.1093/nar/gky379.
- Akinosho, H.; Yee, K.; Close, D.; Ragauskas, A.** (2014): The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in chemistry* 2, S. 66. DOI: 10.3389/fchem.2014.00066.
- Albertsen, M.; Karst, S. M.; Ziegler, A. S.; Kirkegaard, R. H.; Nielsen, P. H.** (2015): Back to Basics--The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PloS one* 10 (7), e0132783. DOI: 10.1371/journal.pone.0132783.
- Almagro Armenteros, J. J.; Tsirigos, K. D.; Sønderby, C. K.; Petersen, T. N.; Winther, O.; Brunak, S. et al.** (2019): SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology* 37 (4), S. 420–423. DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z.
- Álvarez, C.; Reyes-Sosa, F. M.; Díez, B.** (2016): Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology* 9 (2), S. 149–156. DOI: 10.1111/1751-7915.12346.
- Angelidaki, I.; Karakashev, D.; Batstone, D. J.; Plugge, C. M.; Stams, A. J. M.** (2011): Biomethanation and its potential. *Methods in enzymology* 494, S. 327–351. DOI: 10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0.
- Antoni, D.; Zverlov, V. V.; Schwarz, W. H.** (2007): Biofuels from microbes. *Applied microbiology and biotechnology* 77 (1), S. 23–35. DOI: 10.1007/s00253-007-1163-x.
- Aramaki, T.; Blanc-Mathieu, R.; Endo, H.; Ohkubo, K.; Kanehisa, M.; Goto, S.; Ogata, H.** (2020): KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics (Oxford, England)* 36 (7), S. 2251–2252. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz859.
- Armenta, S.; Moreno-Mendieta, S.; Sánchez-Cuapio, Z.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R.** (2017): Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules. *Proteins* 85 (9), S. 1602–1617. DOI: 10.1002/prot.25327.
- Armstrong, Z.; Liu, F.; Kheirandish, S.; Chen, H.-M.; Mewis, K.; Duo, T. et al.** (2019): High-Throughput Recovery and Characterization of Metagenome-Derived Glycoside Hydrolase-Containing Clones as a Resource for Biocatalyst Development. *mSystems* 4 (4). DOI: 10.1128/mSystems.00082-19.
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S. et al.** (2012): SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19 (5), S. 455–477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

- Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P. et al. (2015):** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 80 (1), S. 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.
- Barros, V. G. d.; Duda, R. M.; Vantini, J. d. S.; Omori, W. P.; Ferro, M. I. T.; Oliveira, R. A. d. (2017):** Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. *Bioresource technology* 244 (Pt 1), S. 371–381. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.106.
- Berry, D.; Ben Mahfoudh, K.; Wagner, M.; Loy, A. (2011):** Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and environmental microbiology* 77 (21), S. 7846–7849. DOI: 10.1128/AEM.05220-11.
- Besser, J.; Carleton, H. A.; Gerner-Smidt, P.; Lindsey, R. L.; Trees, E. (2018):** Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24 (4), S. 335–341. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.013.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) (27.12.2020):** Biogas. Online verfügbar unter <https://www.fnr.de/nachwachsende-rohstoffe/bioenergie/biogas>, zuletzt geprüft am 05.03.2021.
- Blom, J.; Albaum, S. P.; Doppmeier, D.; Pühler, A.; Vorhölter, F. J.; Zakrzewski, M.; Goesmann, A. (2009):** EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC bioinformatics* 10. DOI: 10.1186/1471-2105-10-154.
- Bohra, V.; Dafale, N. A.; Purohit, H. J. (2019):** Understanding the alteration in rumen microbiome and CAZymes profile with diet and host through comparative metagenomic approach. *Archives of microbiology* 201 (10), S. 1385–1397. DOI: 10.1007/s00203-019-01706-z.
- Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. (2004):** Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical journal* 382 (Pt 3), S. 769–781. DOI: 10.1042/BJ20040892.
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bröker, J. (2019):** Charakterisierung der Enzymausstattung von *Clostridium stercorarium* für den vollständigen Abbau von Hemicellulosen. Unter Mitarbeit von W. Liebl. München: Universitätsbibliothek der TU München.

Brown, R. M. (2004): Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 42 (3), S. 487–495. DOI: 10.1002/pola.10877.

Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D. H. (2015): Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods* 12 (1), S. 59–60. DOI: 10.1038/nmeth.3176.

Bundesamt für Wirtschaft und Energie (2017): Gesetz für den Ausbau erneuerbarer Energien. EEG. Online verfügbar unter http://www.gesetze-im-internet.de/eeg_2014/__1.html, zuletzt geprüft am 27.12.2020.

Bundesnetzagentur (2019): EEG in Zahlen 2019. Online verfügbar unter https://www.bundesnetzagentur.de/DE/Sachgebiete/ElektrizitaetundGas/Unternehmen_Institutionen/ErneuerbareEnergien/ZahlenDatenInformationen/zahlenunddaten-node.html, zuletzt geprüft am 27.12.2020.

Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T. L. (2009): BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10 (1), S. 1–9. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421.

Campanaro, S.; Treu, L.; Rodriguez-R, L. M.; Kovalovszki, A.; Ziels, R. M.; Maus, I. et al. (2020): New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. *Biotechnology for biofuels* 13, S. 25. DOI: 10.1186/s13068-020-01679-y.

Chaudhary, D. K.; Khulan, A.; Kim, J. (2019): Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Scientific reports* 9 (1), S. 6666. DOI: 10.1038/s41598-019-43182-x.

Chaumeil, P.-A.; Mussig, A. J.; Hugenholtz, P.; Parks, D. H. (2019): GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics (Oxford, England)*. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz848.

Cheng, Y.; Shi, Q.; Sun, R.; Liang, D.; Li, Y.; Jin, W.; Zhu, W. (2018): The biotechnological potential of anaerobic fungi on fiber degradation and methane production. *World journal of microbiology & biotechnology* 34 (10). DOI: 10.1007/s11274-018-2539-z.

Chinga-Carrasco, G. (2011): Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale research letters* 6 (1), S. 417. DOI: 10.1186/1556-276X-6-417.

Choo, J. M.; Leong, L. E. X.; Rogers, G. B. (2015): Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific reports* 5, S. 16350. DOI: 10.1038/srep16350.

- Chun, J.; Oren, A.; Ventosa, A.; Christensen, H.; Arahal, D. R.; da Costa, M. S. et al.** (2018): Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (1), S. 461–466. DOI: 10.1099/ijsem.0.002516.
- ChunLab Inc.** (2017): 16S rRNA and 16S rRNA Gene. **EZBioCloud**. Online verfügbar unter <https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>, zuletzt aktualisiert am 20.02.2019, zuletzt geprüft am 03.03.2021.
- Claassen, P. A. M.; van Lier, J. B.; Lopez Contreras, A. M.; van Niel, E. W. J.; Sijtsma, L.; Stams, A. J. M. et al.** (1999): Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied microbiology and biotechnology* 52 (6), S. 741–755. DOI: 10.1007/s002530051586.
- Cole, J. R.; Wang, Q.; Fish, J. A.; Chai, B.; McGarrell, D. M.; Sun, Y. et al.** (2014): Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D633-42. DOI: 10.1093/nar/gkt1244.
- Compton, S. J.; Jones, C. G.** (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151 (2), S. 369–374. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90190-3.
- Costa, R.; Götz, M.; Mrotzek, N.; Lottmann, J.; Berg, G.; Smalla, K.** (2006): Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS microbiology ecology* 56 (2), S. 236–249. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2005.00026.x.
- Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R. A.; Olsen, J. V.; Mann, M.** (2011): Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research* 10 (4), S. 1794–1805. DOI: 10.1021/pr101065j.
- Dassa, B.; Borovok, I.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Lamed, R.; Bayer, E. A.; Moraïs, S.** (2017): Pan-Cellulosomics of Mesophilic *Clostridia*: Variations on a Theme. *Microorganisms* 5 (4). DOI: 10.3390/microorganisms5040074.
- Di Bello, L.** (2020): Physiologische und genomische Charakterisierung von Isolat MD1, Vertreter eines neuen Genus innerhalb der Familie *Lachnospiraceae*. Unveröffentlichte Bachelorarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Dische, Z.** (1962): General color reactions. In: *Methods Carbohydrate Chemistry* (1), S. 477–479.
- Dror, T. W.; Morag, E.; Rolider, A.; Bayer, E. A.; Lamed, R.; Shoham, Y.** (2003): Regulation of the cellulosomal CelS (cel48A) gene of *Clostridium thermocellum* is growth rate dependent. *Journal of bacteriology* 185 (10), S. 3042–3048. DOI: 10.1128/jb.185.10.3042-3048.2003.
- Du, Y.; Zou, W.; Zhang, K.; Ye, G.; Yang, J.** (2020): Advances and Applications of *Clostridium* Co-culture Systems in Biotechnology. *Frontiers in microbiology* 11, S. 560223. DOI: 10.3389/fmicb.2020.560223.

- Edgar, R. C.** (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Edgar, R. C.** (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (19), S. 2460–2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar, R. C.** (2013): UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 10 (10), S. 996–998. DOI: 10.1038/nmeth.2604.
- Edgar, R. C.** (2016): UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing 13. DOI: 10.1101/081257.
- Edgar, R. C.** (2018): Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics (Oxford, England)* 34 (14), S. 2371–2375. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty113.
- Edgar, R. C.; Haas, B. J.; Clemente, J. C.; Quince, C.; Knight, R.** (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (16), S. 2194–2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381.
- Europäisches Parlament und Rat** (05.06.2009): 2009/28/EG. Online verfügbar unter eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:140:0016:0062:DE:PDF, zuletzt geprüft am 27.12.2020.
- Euzéby, J. P.** (1997): List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (2), S. 590–592. DOI: 10.1099/00207713-47-2-590.
- Evans, P. N.; Boyd, J. A.; Leu, A. O.; Woodcroft, B. J.; Parks, D. H.; Hugenholtz, P.; Tyson, G. W.** (2019): An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature reviews. Microbiology* 17 (4), S. 219–232. DOI: 10.1038/s41579-018-0136-7.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.** (09.11.2020): Biogasanlagen produzieren Strom flexibel und bedarfsgerecht. Stromeinspeisung folgt zuverlässig der Residuallast und den Strompreisen. Online verfügbar unter <https://biogas.fnr.de/biogas-nutzung/stromerzeugung/stand-der-flexibilisierung-von-biogasanlagen>, zuletzt geprüft am 20.12.2020.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.** (2011): Schema einer landwirtschaftlichen Biogasanlage. Hg. v. FNR (abb 172). Online verfügbar unter <https://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/schema-einer-landwirtschaftlichen-biogasanlage.html>, zuletzt geprüft am 05.03.2021.

- Felsenstein, J.** (1981): Evolutionary Trees From Gene Frequencies And Quantitative Characters: Finding Maximum Likelihood Estimates. *Evolution; international journal of organic evolution* 35 (6), S. 1229–1242. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1981.tb04991.x.
- Felsenstein, J.** (1985): Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution; international journal of organic evolution* 39 (4), S. 783–791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- Finn, R. D.; Clements, J.; Eddy, S. R.** (2011): HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* 39 (Web Server issue), W29-37. DOI: 10.1093/nar/gkr367.
- Fischer, M. A.; Güllert, S.; Neulinger, S. C.; Streit, W. R.; Schmitz, R. A.** (2016): Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Frontiers in microbiology* 7, S. 1297. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01297.
- Fouhy, F.; Clooney, A. G.; Stanton, C.; Claesson, M. J.; Cotter, P. D.** (2016): 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC microbiology* 16 (1), S. 123. DOI: 10.1186/s12866-016-0738-z.
- Freier, D.; Mothershed, C. P.; Wiegel, J.** (1988): Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and environmental microbiology* 54 (1), S. 204–211. DOI: 10.1128/AEM.54.1.204-211.1988.
- Froese, A.; Schellenberg, J.; Sparling, R.** (2019): Enhanced depolymerization and utilization of raw lignocellulosic material by co-cultures of *Ruminiclostridium thermocellum* with hemicellulose-utilizing partners. *Canadian journal of microbiology* 65 (4), S. 296–307. DOI: 10.1139/cjm-2018-0535.
- Fukuda, K.; Ogawa, M.; Taniguchi, H.; Saito, M.** (2016): Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH* 38 (3), S. 223–232. DOI: 10.7888/juoeh.38.223.
- Gawad, C.; Koh, W.; Quake, S. R.** (2016): Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature reviews. Genetics* 17 (3), S. 175–188. DOI: 10.1038/nrg.2015.16.
- Gerbaulet, M.** (2019): Heterologe Produktion und Charakterisierung von Glycosidhydrolasen aus neu isolierten cellulolytischen Isolaten. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Gilbert, H. J.; Knox, J. P.; Boraston, A. B.** (2013): Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current Opinion in Structural Biology* 23 (5), S. 669–677. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.05.005.

- Gilmore, S. P.; Henske, J. K.; O'Malley, M. A.** (2015): Driving biomass breakdown through engineered cellulosomes. *Bioengineered* 6 (4), S. 204–208. DOI: 10.1080/21655979.2015.1060379.
- Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R.** (2010): Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource technology* 101 (13), S. 4775–4800. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Gold, N. D.; Martin, V. J. J.** (2007): Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *Journal of bacteriology* 189 (19), S. 6787–6795. DOI: 10.1128/JB.00882-07.
- Goris, J.; Konstantinidis, K. T.; Klappenbach, J. A.; Coenye, T.; Vandamme, P.; Tiedje, J. M.** (2007): DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 1), S. 81–91. DOI: 10.1099/ijs.0.64483-0.
- Goux, X.; Calusinska, M.; Lemaigre, S.; Marynowska, M.; Klocke, M.; Udelhoven, T. et al.** (2015): Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for biofuels* 8, S. 122. DOI: 10.1186/s13068-015-0309-9.
- Griffiths, R. I.; Whiteley, A. S.; O'Donnell, A. G.; Bailey, M. J.** (2000): Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and environmental microbiology* 66 (12), S. 5488–5491. DOI: 10.1128/aem.66.12.5488-5491.2000.
- Gruninger, R. J.; Puniya, A. K.; Callaghan, T. M.; Edwards, J. E.; Youssef, N.; Dagar, S. S. et al.** (2014): Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS microbiology ecology* 90 (1), S. 1–17. DOI: 10.1111/1574-6941.12383.
- Haft, D. H.; DiCuccio, M.; Badretdin, A.; Brover, V.; Chetvernin, V.; O'Neill, K. et al.** (2018): RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic acids research* 46 (D1), D851-D860. DOI: 10.1093/nar/gkx1068.
- Hassa, J.; Maus, I.; Off, S.; Pühler, A.; Scherer, P.; Klocke, M.; Schlüter, A.** (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Applied microbiology and biotechnology* 102 (12), S. 5045–5063. DOI: 10.1007/s00253-018-8976-7.
- Henrissat, B.; Davies, G.** (1997): Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7 (5), S. 637–644. DOI: 10.1016/S0959-440X(97)80072-3.

- Himmel, M. E.; Ding, S.-Y.; Johnson, D. K.; Adney, W. S.; Nimlos, M. R.; Brady, J. W.; Foust, T. D.** (2007): Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science (New York, N.Y.)* 315 (5813), S. 804–807. DOI: 10.1126/science.1137016.
- Hirano, K.; Kurosaki, M.; Nihei, S.; Hasegawa, H.; Shinoda, S.; Haruki, M.; Hirano, N.** (2016): Enzymatic diversity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome is crucial for the degradation of crystalline cellulose and plant biomass. *Scientific reports* 6, S. 35709. DOI: 10.1038/srep35709.
- Huptas, C.; Scherer, S.; Wenning, M.** (2016): Optimized Illumina PCR-free library preparation for bacterial whole genome sequencing and analysis of factors influencing *de novo* assembly. *BMC research notes* 9, S. 269. DOI: 10.1186/s13104-016-2072-9.
- International Code of Nomenclature of Prokaryotes** (2019). In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (1A), S1-S111.
- International Union of Pure and Applied Chemistry** (2009): IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Unter Mitarbeit von M. Nič, J. Jiráť, B. Košata, A. Jenkins und A. McNaught.
- Johnson, E. A.; Madia, A.; Demain, A. L.** (1981): Chemically Defined Minimal Medium for Growth of the Anaerobic Cellulolytic Thermophile *Clostridium thermocellum*. *Applied and environmental microbiology* 41 (4), S. 1060–1062. DOI: 10.1128/AEM.41.4.1060-1062.1981.
- Johnson, J. S.; Spakowicz, D. J.; Hong, B.-Y.; Petersen, L. M.; Demkowicz, P.; Chen, L. et al.** (2019): Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications* 10 (1), S. 5029. DOI: 10.1038/s41467-019-13036-1.
- Juretschko, S.; Timmermann, G.; Schmid, M.; Schleifer, K. H.; Pommerening-Röser, A.; Koops, H. P.; Wagner, M.** (1998): Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and environmental microbiology* 64 (8), S. 3042–3051. DOI: 10.1128/AEM.64.8.3042-3051.1998.
- Kanehisa, M.; Sato, Y.; Morishima, K.** (2016): BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of molecular biology* 428 (4), S. 726–731. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Kanokratana, P.; Wongwilaiwalin, S.; Mhuantong, W.; Tangphatsornruang, S.; Eurwilaichitr, L.; Champreda, V.** (2018): Characterization of cellulolytic microbial consortium enriched on Napier grass using metagenomic approaches. *Journal of bioscience and bioengineering* 125 (4), S. 439–447. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.014.

Kato, S.; Haruta, S.; Cui, Z. J.; Ishii, M.; Yokota, A.; Igarashi, Y. (2004): *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (Pt 6), S. 2043–2047. DOI: 10.1099/ij.s.0.63148-0.

Kinet, R.; Destain, J.; Hiligsmann, S.; Thonart, P.; Delhalle, L.; Taminiau, B. et al. (2015): Thermophilic and cellulolytic consortium isolated from composting plants improves anaerobic digestion of cellulosic biomass: Toward a microbial resource management approach. *Bioresource technology* 189, S. 138–144. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.010.

Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. (2005): Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44 (22), S. 3358–3393. DOI: 10.1002/anie.200460587.

Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F. O. (2013): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 41 (1), e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.

Klingl, A.; Moissl-Eichinger, C.; Wanner, G.; Zweck, J.; Huber, H.; Thomm, M.; Rachel, R. (2011): Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Archives of microbiology* 193 (12), S. 867–882. DOI: 10.1007/s00203-011-0720-y.

Koeck, D. E. (2016): Isolierung und Charakterisierung von cellulolytischen Bakterien aus der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Biogasanlagen. Dissertation. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Koeck, D. E.; Hahnke, S.; Zverlov, V. V. (2016a): *Herbinix luporum* sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (10), S. 4132–4137. DOI: 10.1099/ijsem.0.001324.

Koeck, D. E.; Koellmeier, T.; Zverlov, V. V.; Liebl, W.; Schwarz, W. H. (2015a): Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. *Systematic and applied microbiology* 38 (6), S. 424–432. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.06.005.

Koeck, D. E.; Ludwig, W.; Wanner, G.; Zverlov, V. V.; Liebl, W.; Schwarz, W. H. (2015b): *Herbinix hemicellulosilytica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (Pt_8), S. 2365–2371. DOI: 10.1099/ij.s.0.000264.

- Koeck, D. E.; Mechelke, M.; Zverlov, V. V.; Liebl, W.; Schwarz, W. H.** (2016b): *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via *in sacco* enrichments from a lab-scale biogas reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (11), S. 4458–4463. DOI: 10.1099/ijsem.0.001374.
- Koeck, D. E.; Pechtl, A.; Zverlov, V. V.; Schwarz, W. H.** (2014a): Genomics of cellulolytic bacteria. *Current opinion in biotechnology* 29, S. 171–183. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.07.002.
- Koeck, D. E.; Zverlov, V. V.; Liebl, W.; Schwarz, W. H.** (2014b): Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Systematic and applied microbiology* 37 (5), S. 311–319. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.05.006.
- Kollmann, J.** (2021): Glykolyse: Übersicht, Reaktionen und Energiebilanz. Hg. v. Georg Thieme Verlag KG. Online verfügbar unter https://viamedici.thieme.de/lernmodul/547091/subject/biochemie/kohlenhydrate/stoffwechsel/glykolyse+%C3%BCbersicht+reaktionen+und+energiebilanz#_85FDAD44_3EBC_4687_A159_9F2438166C7F, zuletzt geprüft am 20.01.2021.
- Konstantinidis, K. T.; Tiedje, J. M.** (2005): Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (7), S. 2567–2572. DOI: 10.1073/pnas.0409727102.
- Kowolik, M.-L.** (2020): Charakterisierung einer neuen, aus einem Biogas- Fermenter isolierten Art der Gattung *Ruminiclostridium*. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Krause, L.; Diaz, N. N.; Edwards, R. A.; Gartemann, K.-H.; Krömeke, H.; Neuweger, H. et al.** (2008): Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of biotechnology* 136 (1), S. 91–101. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.06.003.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K.** (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K.** (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33 (7), S. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- Kurm, V.; van der Putten, W. H.; Hol, W. H. G.** (2019): Cultivation-success of rare soil bacteria is not influenced by incubation time and growth medium. *PloS one* 14 (1), e0210073. DOI: 10.1371/journal.pone.0210073.

- Kurtz, S.; Phillippy, A.; Delcher, A. L.; Smoot, M.; Shumway, M.; Antonescu, C.; Salzberg, S. L.** (2004): Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome biology* 5 (2). DOI: 10.1186/gb-2004-5-2-r12.
- Kuyenkendall, L. D.; ROY, M. A.; O'NEILL, J. J.; DEVINE, T. E.** (1988): Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38 (4), S. 358–361. DOI: 10.1099/00207713-38-4-358.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T.** (2017): Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 5, e2836. DOI: 10.7717/peerj.2836.
- Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T.** (2016): IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific reports* 6, S. 33721. DOI: 10.1038/srep33721.
- Lagkouvardos, I.; Kläring, K.; Heinzmann, S. S.; Platz, S.; Scholz, B.; Engel, K.-H. et al.** (2015): Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Molecular nutrition & food research* 59 (8), S. 1614–1628. DOI: 10.1002/mnfr.201500125.
- Lamed, R.; Bayer, E. A.** (1988): The Cellulosome of *Clostridium thermocellum*. In: Allen I. Laskin (Hg.): *Advances in Applied Microbiology*, Bd. 33: Academic Press, S. 1–46. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70203-X.
- Lebuhn, M.; Derenkó, J.; Rademacher, A.; Helbig, S.; Munk, B.; Pechtl, A. et al.** (2016): DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 3 (1). DOI: 10.3390/bioengineering3010007.
- Lebuhn, M.; Hanreich, A.; Klocke, M.; Schlüter, A.; Bauer, C.; Pérez, C. M.** (2014a): Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe* 29. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.04.006.
- Lebuhn, M.; Munk, B.; Effenberger, M.** (2014b): Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energ Sustain Soc* 4 (1), S. 849. DOI: 10.1186/2192-0567-4-10.
- Leis, B.; Held, C.; Andreeßen, B.; Liebl, W.; Graubner, S.; Schulte, L.-P. et al.** (2018): Optimizing the composition of a synthetic cellulosome complex for the hydrolysis of softwood pulp: identification of the enzymatic core functions and biochemical complex characterization. *Biotechnol Biofuels* 11, S. 220. DOI: 10.1186/s13068-018-1220-y.

- Leis, B.; Held, C.; Bergkemper, F.; Dennemarck, K.; Steinbauer, R.; Reiter, A. et al.** (2017): Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity. *Biotechnol Biofuels* 10, S. 240. DOI: 10.1186/s13068-017-0928-4.
- Lin, P. P.; Mi, L.; Morioka, A. H.; Yoshino, K. M.; Konishi, S.; Xu, S. C. et al.** (2015): Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metabolic engineering* 31, S. 44–52. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.07.001.
- Liu, T.; Sun, L.; Müller, B.; Schnürer, A.** (2017): Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. *Bioresource technology* 245, S. 768–777. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.213.
- Liu, Y.; Yu, P.; Song, X.; Qu, Y.** (2008): Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (12), S. 2927–2933. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.04.004.
- Lloyd, K. G.; Steen, A. D.; Ladau, J.; Yin, J.; Crosby, L.** (2018): Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *mSystems* 3 (5). DOI: 10.1128/mSystems.00055-18.
- Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.** (2014): The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D490-5. DOI: 10.1093/nar/gkt1178.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S.** (2002): Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 66 (3), S. 506–577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
- Ma, S.; Huang, Y.; Wang, C.; Fan, H.; Dai, L.; Zhou, Z. et al.** (2017): *Defluviitalea raffinosedens* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, saccharolytic bacterium isolated from an anaerobic batch digester treating animal manure and rice straw. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (5), S. 1607–1612. DOI: 10.1099/ijsem.0.001664.
- Madden, R. H.** (1983): Isolation and Characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., Cellulolytic Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33 (4), S. 837–840. DOI: 10.1099/00207713-33-4-837.
- Mäkelä, M. R.; Donofrio, N.; Vries, R. P. de** (2014): Plant biomass degradation by fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B* 72, S. 2–9. DOI: 10.1016/j.fgb.2014.08.010.
- Maus, I.; Koeck, D. E.; Cibis, K. G.; Hahnke, S.; Kim, Y. S.; Langer, T. et al.** (2016): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis

complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for biofuels* 9, S. 171. DOI: 10.1186/s13068-016-0581-3.

Miao, T.; Gao, S.; Jiang, S.; Kan, G.; Liu, P.; Wu, X. et al. (2014): A method suitable for DNA extraction from humus-rich soil. *Biotechnology letters* 36 (11), S. 2223–2228. DOI: 10.1007/s10529-014-1591-5.

Miller, G. L. (1959): Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31 (3), S. 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.

Miller, L. T. (1982): Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of clinical microbiology* 16 (3), S. 584–586. DOI: 10.1128/JCM.16.3.584-586.1982.

Mohamed, R.; Chaudhry, A. S. (2008): Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition research reviews* 21 (1), S. 68–81. DOI: 10.1017/S0954422408960674.

Mohr, K. I. (2018): Diversity of *Myxobacteria*-We Only See the Tip of the Iceberg. *Microorganisms* 6 (3). DOI: 10.3390/microorganisms6030084.

Moset, V.; Poulsen, M.; Wahid, R.; Højberg, O.; Møller, H. B. (2015): Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. *Microbial biotechnology* 8 (5), S. 787–800. DOI: 10.1111/1751-7915.12271.

Na, S.-I.; Kim, Y. O.; Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Baek, I.; Chun, J. (2018): UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 56 (4), S. 280–285. DOI: 10.1007/s12275-018-8014-6.

Narihiro, T.; Kamagata, Y. (2016): Anaerobic Cultivation. In: Marylynn V. Yates, Cindy H. Nakatsu, Robert V. Miller und Suresh D. Pillai (Hg.): *Manual of Environmental Microbiology*, Bd. 94. Washington, DC, USA: ASM Press, 2.1.2-1-2.1.2-12. DOI: 10.1128/9781555818821.ch2.1.2.

Nathani, N. M.; Duggirala, S. M.; Bhatt, V. D.; Patel, A. K.; Kothari, R. K.; Joshi, C. G. (2016): Correlation between genomic analyses with metatranscriptomic study reveals various functional pathways of *Clostridium sartagoforme* AAU1, a buffalo rumen isolate. *Journal of Applied Animal Research* 44 (1), S. 498–507. DOI: 10.1080/09712119.2015.1091346.

NCBI Resource Coordinators (2018): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* 46 (D1), D8-D13. DOI: 10.1093/nar/gkx1095.

Ng, T. K.; Zeikus, J. G. (1982): Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of bacteriology* 150 (3), S. 1391–1399. DOI: 10.1128/JB.150.3.1391-1399.1982.

- Ogata, H.; Goto, S.; Sato, K.; Fujibuchi, W.; Bono, H.; Kanehisa, M.** (1999): KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research* 27 (1), S. 29–34. DOI: 10.1093/nar/27.1.29.
- O'Leary, N. A.; Wright, M. W.; Brister, J. R.; Ciufu, S.; Haddad, D.; McVeigh, R. et al.** (2016): Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research* 44 (D1), D733-45. DOI: 10.1093/nar/gkv1189.
- Oren, A.; Garrity, G. M.** (2019): Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 10 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (1), S. 10–12. DOI: 10.1099/ijsem.0.003107.
- Oren, A.; Garrity, G. M.** (2020): Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 69, part 12 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (3), S. 1447–1449. DOI: 10.1099/ijsem.0.003992.
- Orita, T.; Sakka, M.; Kimura, T.; Sakka, K.** (2017): Recombinant cellulolytic or xylanolytic complex comprising the full-length scaffolding protein RjCipA and cellulase RjCel5B or xylanase RjXyn10C of *Ruminiclostridium josui*. *Enzyme and microbial technology* 97, S. 63–70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.021.
- Otieno, D. O.; Ahring, B. K.** (2012): The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate research* 360, S. 84–92. DOI: 10.1016/j.carres.2012.07.017.
- Ozbayram, E. G.; Kleinstaub, S.; Nikolausz, M.; Ince, B.; Ince, O.** (2017): Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. *Anaerobe* 46. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.03.013.
- Özpinar, Ö.; Özkan, M.** (2007): Cellulose degradation and glucose accumulation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 under different cultural conditions. *Ann. Microbiol.* 57 (3), S. 395–400. DOI: 10.1007/BF03175079.
- Pace, N. R.** (2009): Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 73 (4), S. 565–576. DOI: 10.1128/MMBR.00033-09.
- Pang, J.; Hao, M.; Li, Y.; Liu, J.; Lan, H.; Zhang, Y. et al.** (2018): Consolidated Bioprocessing Using *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Co-culture for Enhancing Ethanol Production from Corn Straw. *BioResources* 13 (4). DOI: 10.15376/biores.13.4.8209-8221.

- Parks, D. H.; Chuvochina, M.; Chaumeil, P.-A.; Rinke, C.; Mussig, A. J.; Hugenholtz, P.** (2020): A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nature biotechnology* 38 (9), S. 1079–1086. DOI: 10.1038/s41587-020-0501-8.
- Parks, D. H.; Chuvochina, M.; Waite, D. W.; Rinke, C.; Skarshewski, A.; Chaumeil, P.-A.; Hugenholtz, P.** (2018): A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature biotechnology* 36 (10), S. 996–1004. DOI: 10.1038/nbt.4229.
- Parte, A. C.** (2014): LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D613-6. DOI: 10.1093/nar/gkt1111.
- Parte, A. C.** (2018): LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (6), S. 1825–1829. DOI: 10.1099/ijsem.0.002786.
- Parte, A. C.; Sardà Carbasse, J.; Meier-Kolthoff, J. P.; Reimer, L. C.; Göker, M.** (2020): List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (11), S. 5607–5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.
- Pauly, M.; Keegstra, K.** (2008): Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54 (4), S. 559–568. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x.
- Pereyra, L. P.; Hiibel, S. R.; Prieto Riquelme, M. V.; Reardon, K. F.; Pruden, A.** (2010): Detection and quantification of functional genes of cellulose- degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Applied and environmental microbiology* 76 (7), S. 2192–2202. DOI: 10.1128/AEM.01285-09.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; La Rubia, T. de; Martínez, J.** (2002): Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 5 (2), S. 53–63. DOI: 10.1007/s10123-002-0062-3.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G. von; Nielsen, H.** (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8 (10), S. 785–786. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- Petti, C. A.** (2007): Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44 (8), S. 1108–1114. DOI: 10.1086/512818.
- Pinheiro, B. A.; Gilbert, H. J.; Sakka, K.; Sakka, K.; Fernandes, V. O.; Prates, J. A. M. et al.** (2009): Functional insights into the role of novel type I cohesin and dockerin domains from *Clostridium thermocellum*. *The Biochemical journal* 424 (3), S. 375–384. DOI: 10.1042/BJ20091152.

- Price, M. N.; Dehal, P. S.; Arkin, A. P.** (2010): FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one* 5 (3), e9490. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.
- Qin, Q.-L.; Xie, B.-B.; Zhang, X.-Y.; Chen, X.-L.; Zhou, B.-C.; Zhou, J. et al.** (2014): A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *Journal of bacteriology* 196 (12), S. 2210–2215. DOI: 10.1128/JB.01688-14.
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P. et al.** (2012): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research* 41 (D1), D590-D596. DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- Quince, C.; Walker, A. W.; Simpson, J. T.; Loman, N. J.; Segata, N.** (2017): Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology* 35 (9), S. 833–844. DOI: 10.1038/nbt.3935.
- Raman, B.; Pan, C.; Hurst, G. B.; Rodriguez, M.; McKeown, C. K.; Lankford, P. K. et al.** (2009): Impact of pretreated Switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis. *PloS one* 4 (4), e5271. DOI: 10.1371/journal.pone.0005271.
- Rappé, M. S.; Giovannoni, S. J.** (2003): The uncultured microbial majority. *Annual review of microbiology* 57. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090759.
- Reitmeier, S.; Kiessling, S.; Clavel, T.; List, M.; Almeida, E. L.; Ghosh, T. et al.** (2020a): Arrhythmic Gut Microbiome Signatures for Risk Profiling of Type-2 Diabetes. SSRN Electronic Journal. DOI: 10.2139/SSRN.3546243.
- Reitmeier, S.; Kiessling, S.; Neuhaus, K.; Haller, D.** (2020b): Comparing Circadian Rhythmicity in the Human Gut Microbiome. *STAR Protocols*, S. 100148. DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100148.
- Ren, Z.; You, W.; Wu, S.; Poetsch, A.; Xu, C.** (2019): Secretomic analyses of *Ruminiclostridium papyrosolvans* reveal its enzymatic basis for lignocellulose degradation. *Biotechnology for biofuels* 12, S. 183. DOI: 10.1186/s13068-019-1522-8.
- Rettenmaier, R.** (2017): Identifizierung von Schlüsselorganismen des Celluloseabbaus in mesophilen Biogasanlagen. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Rettenmaier, R.; Duerr, C.; Neuhaus, K.; Liebl, W.; Zverlov, V. V.** (2019a): Comparison of sampling techniques and different media for the enrichment and isolation of cellulolytic organisms from biogas fermenters. *Systematic and applied microbiology* 42 (4), S. 481–487. DOI: 10.1016/j.syapm.2019.05.002.

Rettenmaier, R.; Gerbault, M.; Liebl, W.; Zverlov, V. V. (2019b): *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, cellulolytic and spore-forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (11), S. 3567–3573. DOI: 10.1099/ijsem.0.003663.

Rettenmaier, R.; Kowollik, M.-L.; Klingl, A.; Liebl, W.; Zverlov, V. (2021): *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., a mesophilic and moderately thermophilic cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a lab-scale biogas fermenter fed with maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. DOI: 10.1099/ijsem.0.004692.

Rettenmaier, R.; Liebl, W.; Zverlov, V. V. (2020a): *Anaerosphaera multitolerans* sp. nov., a salt-tolerant member of the family *Peptoniphilaceae* isolated from a mesophilically operated biogas fermenter fed with maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (2). DOI: 10.1099/ijsem.0.003903.

Rettenmaier, R.; Lo, Y. K.; Schmidt, L.; Munk, B.; Lagkouvardos, I.; Neuhaus, K. et al. (2020b): A Novel Primer Mixture for GH48 Genes: Quantification and Identification of Truly Cellulolytic Bacteria in Biogas Fermenters. *Microorganisms* 8 (9). DOI: 10.3390/microorganisms8091297.

Rettenmaier, R.; Neuhaus, K.; Liebl, W.; Zverlov, V. V. (2019c): Draft Genome Sequence of *Anaerosphaera* sp. Strain GS7-6-2, a Coccal Bacterium Isolated from a Biogas-Related Environment. *Microbiology resource announcements* 8 (17). DOI: 10.1128/MRA.00205-19.

Rettenmaier, R.; Schneider, M.; Munk, B.; Lebuhn, M.; Jünemann, S.; Sczyrba, A. et al. (2020c): Importance of *Defluviitalea raffinosedens* for Hydrolytic Biomass Degradation in Co-Culture with *Hungateiclostridium thermocellum*. *Microorganisms* 8 (6). DOI: 10.3390/microorganisms8060915.

Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.; Peplies, J. (2016): JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (6), S. 929–931. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv681.

Rodriguez-R, L. M.; Gunturu, S.; Harvey, W. T.; Rosselló-Mora, R.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R.; Konstantinidis, K. T. (2018): The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of *Archaea* and *Bacteria* at the whole genome level. *Nucleic acids research* 46 (W1), W282-W288. DOI: 10.1093/nar/gky467.

Romano, N.; Gioffré, A.; Sede, S. M.; Campos, E.; Cataldi, A.; Talia, P. (2013): Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. *Current microbiology* 67 (2), S. 138–147. DOI: 10.1007/s00284-013-0345-2.

Rudi, K.; Skulberg, O. M.; Larsen, F.; Jakobsen, K. S. (1997): Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions

V6, V7, and V8. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), S. 2593–2599. Online verfügbar unter <https://aem.asm.org/content/63/7/2593>.

Saha, B. C. (2003): Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 30 (5), S. 279–291. DOI: 10.1007/s10295-003-0049-x.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Scheitz, K. (2019): Charakterisierung cellulolytischer Enzymsysteme mesophiler Bakterien aus einer NAWARO Biogasanlage. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Scheller, H. V.; Ulvskov, P. (2010): Hemicelluloses. *Annual review of plant biology* 61, S. 263–289. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.

Schink, B. (1997): Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 61 (2), S. 262–280.

Schleifer, K. H.; Kandler, O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. In: *Bacteriological reviews* 36 (4), S. 407–477.

Schmidt, L. (2019): Isolierung und Quantifizierung mesophiler und thermophiler Schlüsselorganismen des Celluloseabbaus in einem NAWARO Biogasfermenter. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Schneider, M. (2019): Mikrobielle und physiologische Charakterisierung von thermophilen, cellulolytischen Konsortien. Unveröffentlichte Masterarbeit. **Technische Universität München**, Freising. Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Schnürer, A. (2016): Biogas Production: Microbiology and Technology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 156, S. 195–234. DOI: 10.1007/10_2016_5.

Schumann, P. (2011): Peptidoglycan Structure. In: *Taxonomy of Prokaryotes*, Bd. 38: Elsevier (Methods in Microbiology), S. 101–129. DOI: 10.1016/B978-0-12-387730-7.00005-X.

Schuster, J. A.; Klingl, A.; Vogel, R. F.; Ehrmann, M. A. (2019): Polyphasic characterization of two novel *Lactobacillus* spp. isolated from blown salami packages: Description of *Lactobacillus halodurans* sp. nov. and *Lactobacillus salsicarnum* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* 42 (6), S. 126023. DOI: 10.1016/j.syapm.2019.126023.

Schwarz, W. H. (2001): The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* 56 (5-6), S. 634–649. DOI: 10.1007/s002530100710.

- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Sytsubo, K.; Ohashi, A.; Harada, H.; Nakamura, K.** (1998): Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 9), S. 2655–2665. DOI: 10.1099/00221287-144-9-2655.
- Senés-Guerrero, C.; Colón-Contreras, F. A.; Reynoso-Lobo, J. F.; Tinoco-Pérez, B.; Siller-Cepeda, J. H.; Pacheco, A.** (2019): Biogas-producing microbial composition of an anaerobic digester and associated bovine residues. *MicrobiologyOpen* 8 (9), e00854. DOI: 10.1002/mbo3.854.
- Sheng, P.; Huang, J.; Zhang, Z.; Wang, D.; Tian, X.; Ding, J.** (2016): Construction and Characterization of a Cellulolytic Consortium Enriched from the Hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae. *International journal of molecular sciences* 17 (10). DOI: 10.3390/ijms17101646.
- Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M.** (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols* 1 (6), S. 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
- Sjöling S., Stafford W., Cowan D. A.** (2006): Soil metagenomics: exploring and exploiting the soil microbial Gene pool. In: van Elsas D., Trevors J.T., Jansson J.K., Nannipieri P. (Hg.): *Modern Soil Microbiology*, 409-434. 2. Aufl. Boca Raton: CRC Press.
- Stagnati, L.; Soffritti, G.; Lanubile, A.; Busconi, M.** (2017): Comparison of six methods for the recovery of PCR-compatible microbial DNA from an agricultural biogas plant. *Applied microbiology and biotechnology* 101 (9), S. 3907–3917. DOI: 10.1007/s00253-017-8152-5.
- Stevenson, D. M.; Weimer, P. J.** (2005): Expression of 17 genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during fermentation of cellulose or cellobiose in continuous culture. *Applied and environmental microbiology* 71 (8), S. 4672–4678. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4672-4678.2005.
- Stolze, Y.; Zakrzewski, M.; Maus, I.; Eikmeyer, F.; Jaenicke, S.; Rottmann, N. et al.** (2015): Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnology for biofuels* 8, S. 14. DOI: 10.1186/s13068-014-0193-8.
- Strazzulli, A.; Cobucci-Ponzano, B.; Iacono, R.; Giglio, R.; Maurelli, L.; Curci, N. et al.** (2020): Discovery of hyperstable carbohydrate-active enzymes through metagenomics of extreme environments. *The FEBS journal* 287 (6), S. 1116–1137. DOI: 10.1111/febs.15080.
- Sukhumavasi, J.; Ohmiya, K.; Shimizu, S.; Ueno, K.** (1988): *Clostridium josui* sp. nov., a Cellulolytic, Moderate Thermophilic Species from Thai Compost. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38 (2), S. 179–182. DOI: 10.1099/00207713-38-2-179.

- Sun, L.; Liu, T.; Müller, B.; Schnürer, A.** (2016): The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests. *Biotechnol Biofuels* 9 (1), S. 1–20. DOI: 10.1186/s13068-016-0543-9.
- Sun, L.; Müller, B.; Westerholm, M.; Schnürer, A.** (2014): Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *Journal of biotechnology* 171, S. 39–44. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.016.
- Tamura, K.; Nei, M.** (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10 (3), S. 512–526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Tatusova, T.; DiCuccio, M.; Badretdin, A.; Chetvernin, V.; Nawrocki, E. P.; Zaslavsky, L. et al.** (2016): NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research* 44 (14), S. 6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
- Theiri, M.; Chadjaa, H.; Marinova, M.; Jolicoeur, M.** (2019): Combining chemical flocculation and bacterial co-culture of *Cupriavidus taiwanensis* and *Ureibacillus thermosphaericus* to detoxify a hardwood hemicelluloses hydrolysate and enable acetone-butanol-ethanol fermentation leading to butanol. *Biotechnology progress* 35 (2), e2753. DOI: 10.1002/btpr.2753.
- Tian, L.; Papanek, B.; Olson, D. G.; Rydzak, T.; Holwerda, E. K.; Zheng, T. et al.** (2016): Simultaneous achievement of high ethanol yield and titer in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for biofuels* 9, S. 116. DOI: 10.1186/s13068-016-0528-8.
- Tindall, B. J.** (2019a): Replacement of the illegitimate genus name *Hungateiclostridium* Zhang et al. 2018 in *Hungateiclostridium mesophilum* Rettenmaier et al. 2019 by *Acetivibrio* Patel et al. 1980, creating *Acetivibrio mesophilus* (Rettenmaier et al. 2019). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (12), S. 3967–3968. DOI: 10.1099/ijsem.0.003810.
- Tindall, B. J.** (2019b): The names *Hungateiclostridium* Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium thermocellum* (Viljoen et al. 1926) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium cellulolyticum* (Patel et al. 1980) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium aldrichii* (Yang et al. 1990) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium alkalicellulosi* (Zhilina et al. 2006) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium clariflavum* (Shiratori et al. 2009) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium straminisolvens* (Kato et al. 2004) Zhang et al. 2018 and *Hungateiclostridium saccincola* (Koeck et al. 2016) Zhang et al. 2018 contravene Rule 51b of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes and require replacement names in the genus *Acetivibrio* Patel et al. 1980. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (12), S. 3927–3932. DOI: 10.1099/ijsem.0.003685.

- Tindall, B. J.; Rosselló-Móra, R.; Busse, H.-J.; Ludwig, W.; Kämpfer, P.** (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (Pt 1), S. 249–266. DOI: 10.1099/ij.s.0.016949-0.
- Tipu, H. N.; Shabbir, A.** (2015): Evolution of DNA sequencing. In: *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 25 (3), S. 210–215.
- Tyanova, S.; Temu, T.; Cox, J.** (2016): The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols* 11 (12), S. 2301–2319. DOI: 10.1038/nprot.2016.136.
- UniProt Consortium** (2019): UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research* 47 (D1), D506–D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049.
- van Dyk, J. S.; Pletschke, B. I.** (2012): A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30 (6), S. 1458–1480. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.
- Verbeke, T. J.; Zhang, X.; Henrissat, B.; Spicer, V.; Rydzak, T.; Krokhin, O. V. et al.** (2013): Genomic evaluation of *Thermoanaerobacter* spp. for the construction of designer co-cultures to improve lignocellulosic biofuel production. *PLoS one* 8 (3), e59362. DOI: 10.1371/journal.pone.0059362.
- Volynets, B.; Ein-Mozaffari, F.; Dahman, Y.** (2017): Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis* 6 (1), S. 1–22. DOI: 10.1515/gps-2016-0017.
- Vrieze, J. de** (2020): The next frontier of the anaerobic digestion microbiome: From ecology to process control. *Environmental Science and Ecotechnology* 3, S. 100032. DOI: 10.1016/j.ese.2020.100032.
- Wang, M.; Zhao, Q.; Li, L.; Niu, K.; Li, Y.; Wang, F. et al.** (2016): Contributing factors in the improvement of cellulosic H₂ production in *Clostridium thermocellum*/*Thermoanaerobacterium* co-cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 100 (19), S. 8607–8620. DOI: 10.1007/s00253-016-7776-1.
- Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R.** (2007): Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* 73 (16), S. 5261–5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07.
- Wick, R. R.; Judd, L. M.; Gorrie, C. L.; Holt, K. E.** (2017): Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology* 13 (6), e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Winand, R.; Bogaerts, B.; Hoffman, S.; Lefevre, L.; Delvoeye, M.; van Braekel, J. et al.** (2019): Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of

Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International journal of molecular sciences* 21 (1). DOI: 10.3390/ijms21010298.

Wirth, R.; Kovács, E.; Maróti, G.; Bagi, Z.; Rákhely, G.; Kovács, K. L. (2012): Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for biofuels* 5, S. 41. DOI: 10.1186/1754-6834-5-41.

Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. In: *Microbiological Reviews* 51 (2), S. 221–271.

Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4576–4579.

Wolf, Y. I.; Rogozin, I. B.; Grishin, N. V.; Koonin, E. V. (2002): Genome trees and the tree of life. *Trends in genetics : TIG* 18 (9), S. 472–479. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02744-0.

Wood, T. M. (1988): Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. In: *Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose*, Bd. 160: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 19–25. DOI: 10.1016/0076-6879(88)60103-0.

Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. (2017): Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (5), S. 1613–1617. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755.

Yousuf, A.; Pirozzi, D.; Sannino, F. (2020): Fundamentals of lignocellulosic biomass. In: Abu Yousuf, Domenico Pirozzi und Filomena Sannino (Hg.): *Lignocellulosic biomass to liquid biofuels*. London: Academic Press, S. 1–15. DOI: 10.1016/B978-0-12-815936-1.00001-0.

Yutin, N.; Galperin, M. Y. (2013): A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore-formers and other misplaced clostridia. *Environmental microbiology* 15 (10), S. 2631–2641. DOI: 10.1111/1462-2920.12173.

Zhang, H.; Yohe, T.; Le Huang; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z. et al. (2018a): dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research* 46 (W1), W95-W101. DOI: 10.1093/nar/gky418.

Zhang, J.-N.; Li, Y.-H.; Zheng, H.-Q.; Fan, Y.-T.; Hou, H.-W. (2015): Direct degradation of cellulosic biomass to bio-hydrogen from a newly isolated strain *Clostridium sartagoforme* FZ11. *Bioresource technology* 192, S. 60–67. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.05.034.

Zhang, X.; Tu, B.; Dai, L.-R.; Lawson, P. A.; Zheng, Z.-Z.; Liu, L.-Y. et al. (2018b): *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and

reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new *Hungateiclostridiaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (10), S. 3197–3211. DOI: 10.1099/ijsem.0.002966.

Zhang, Y.-H. P.; Lynd, L. R. (2005): Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20), S. 7321–7325. DOI: 10.1073/pnas.0408734102.

Zverlov, V. V.; Kellermann, J.; Schwarz, W. H. (2005a): Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *PROTEOMICS* 5 (14), S. 3646–3653. DOI: 10.1002/pmic.200401199.

Zverlov, V. V.; Koeck, D. E.; Schwarz, W. H. (2015): The Role of Cellulose-Hydrolyzing Bacteria in the Production of Biogas from Plant Biomass. In: Birgit Kamm (Hg.): *Microorganisms in Biorefineries*, Bd. 26. Berlin, Heidelberg: Springer (Microbiology Monographs, Volume 26), S. 335–361. DOI: 10.1007/978-3-662-45209-7_12.

Zverlov, V. V.; Schantz, N.; Schwarz, W. H. (2005b): A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiology Letters* 249 (2), S. 353–358. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.06.037.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₃₀	Absorption bei 230 nm
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
ANI	engl.: <i>Average nucleotide identity</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLASTP	engl.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> für Aminosäuresequenzen (Proteine)
BLASTN	engl.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> für Nukleinsäuresequenzen
CAA	Casamino Acids
CAZymes	engl.: <i>Carbohydrate-active enzymes</i>
Cip	engl.: <i>cellulosome-integrating protein</i>
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMA	Dimethyl-Acetal
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige (engl.: <i>double strand</i>) DNA
DTT	Dithiothreitol
EEG	Erneuerbare Energie Gesetz
engl.	englisch
FAME	engl.: <i>fatty acid methyl ester</i>
GC	Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
GH	Glycosid-Hydrolase
GHF	Glycosid-Hydrolase-Familie
GR	Gärrest
gsi	engl.: <i>Gene Support Index</i>
i.d.R.	in der Regel
IMNGS	engl.: <i>Integrated Microbial Next Generation Sequencing</i>
IS	<i>in sacco</i>
IUPAC	engl.: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC-MS/MS	engl.: <i>Liquid-Chromatography Tandem Mass spectrometry</i>
LPSN	engl.: <i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MAG	engl.: <i>metagenome-assembled genome</i>
MDS	engl.: <i>Multi-Dimensional Scaling</i>
MI	Mesophil-instabil
MQ	Reinstwasser
MS	Massenspektroskopie; mesophil-stabil
Nm ³	Normkubikmeter (Volumeneinheit für Gase mit Bezug auf definierte Umgebungsbedingungen)
OTU	engl.: <i>Operational taxonomic unit</i>
PAGE	engl.: <i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)

PE	engl.: <i>paired-end</i>
PEG	Polyethylenglykol
PGAP	engl.: <i>Prokaryotic Genome Annotation Pipeline</i>
PN	Probenahme
POCP	engl.: <i>Percentage of conserved proteins</i>
PROKKA	engl.: <i>Prokaryotic genome annotation</i>
qPCR	quantitative PCR
RIN	engl.: <i>RNA integrity number</i>
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription
SAG	engl.: <i>single-amplified genome</i>
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	engl.: <i>Scanning Electron Microscope</i>
ssDNA	einzelsträngige (engl.: <i>single strand</i>) DNA
SSU	engl.: <i>small subunit</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
t _{FM}	Tonnen Frischmasse
TI	thermophil-instabil
TS	thermophil-stabil
UBCG	engl.: <i>Up-to-date Bacterial Core Genes</i>
zOTU	zero-radius OTU

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bestandteile von Maissilage in Bayern, Deutschland entnommen aus Lebuhn et al. (2014b), Table 2.	14
Tab. 2: Ungefähre Zusammensetzung von Maisstroh und Maiskolben in % Trockenmasse, entnommen aus Bröker (2019), Tabelle 1.1.....	15
Tab. 3: Übersicht aller GHF mit potentieller Exoglukanase-Aktivität nach CAZy.org, Stand 02.01.2021 (Lombard et al. 2014).	22
Tab. 4: Verwendete Geräte oder Verbrauchsmittel und deren Hersteller.	31
Tab. 5: Verwendete Kits, Enzyme, Plasmide und Längenstandards und deren Hersteller.	32
Tab. 6: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.	33
Tab. 7: Verwendete Kohlenhydrate und deren Hersteller.	34
Tab. 8: Zusammensetzung 10x PBS-Puffer.	35
Tab. 9: Zusammensetzung 50x TAE-Puffer.	35
Tab. 10: Zusammensetzung Zell-Lysepuffer.	35
Tab. 11: Zusammensetzung 10x MOPS Puffer.	35
Tab. 12: Zusammensetzung DNSA-Lösung.	35
Tab. 13: Zusammensetzung der DC-Färbelösung.	35
Tab. 14: Zusammensetzung des 4x Auftragspuffers für die SDS-PAGE.	35
Tab. 15: Pipettierschema der Gele für die SDS-PAGE.	36
Tab. 16: Zusammensetzung des Lauf-, Sammel- und Trenngelpuffers der SDS-PAGE.	36

Tab. 17: Kaliumphosphatpuffer, 240 mM, pH 8.....	36
Tab. 18: Zusammensetzung GS2 Medium.....	37
Tab. 19: Zusammensetzung der 100x GS2-Salzlösung.	38
Tab. 20: Zusammensetzung GS2_CAA Medium.	38
Tab. 21: Zusammensetzung GR20-Medium.	38
Tab. 22: Zusammensetzung Glycerin-Lösung.....	38
Tab. 23: Zusammensetzung LB-Medium.....	39
Tab. 24: Verwendete Mikroorganismen und deren Bezugsquelle.....	39
Tab. 25: Eingesetzte Puffersysteme.	42
Tab. 26: Gemessene und eingestellte pH-Werte vor und nach dem Autoklavieren.	43
Tab. 27: Verwendete Primer.	49
Tab. 28: Reaktionsansatz der RT.	53
Tab. 29: 25 µl Ansatz der 16S-rRNA-PCR.....	53
Tab. 30: Temperaturprofil der 16S-rRNA-PCR.....	53
Tab. 31: Temperaturprofil der GH48-PCR.	54
Tab. 32: 25 µl Ansatz der GH48-PCR.	54
Tab. 33: Temperaturprofil der GH48-qPCR.	55
Tab. 34: Temperaturprofil der 16S-qPCR.	55
Tab. 35: qPCR Ansatz.....	55
Tab. 36: Software.	58
Tab. 37: Datenbanken.	59
Tab. 38: α -Diversität aller Anreicherungskulturen nach Rettenmaier et al. (2019a), Tab. 1.....	63
Tab. 39: Durchschnittliche relative Abundanz unbekannter Familien oder Genera nach Rettenmaier et al. (2019a), Tab. 2.....	63
Tab. 40: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung in DNA des mesophilen und thermophilen Fermenterbetriebes.	64
Tab. 41: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung mit RNA isoliert aus den mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieben.....	66
Tab. 42: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung von DNA isoliert aus Anreicherungskulturen des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes.....	68
Tab. 43: α -Diversität der 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Anreicherungskulturen des thermophil-stabilen Fermenterbetriebes.....	70
Tab. 44: Zusammenfassung interessanter Reinkulturen, sowie Mischisolate isoliert im Rahmen dieser Doktorarbeit zusammen mit studentischen Arbeiten.	73
Tab. 45: Vergleich der Illumina-Sequenzierungen von S4MN4_FP und S4MN4_PASC.....	77
Tab. 46: Analyse sekretierter Proteine von S4MN4.....	78
Tab. 47: „Cellulasen“ detektiert in den sekretierten Proteinen von S4MN4.....	80
Tab. 48: ANI-Werte, bestimmt über jspecies.org (Richter et al. 2016), der Genomsequenz von N2K1 ^T (RLII01.1) zu 12 anderen Genomen.....	83

Tab. 49: Berechnung des POCP von MD1 zu <i>A. torta</i> FH052 ^T	91
Tab. 50: Zelluläre Fettsäuren (>5%) von MD1 kultiviert in GS2 Medium + 0,5% (w/v) Cellobiose, pH 7.1 nach 24 h bei 40 °C.....	92
Tab. 51: BLASTP Analyse der CAZymes mit Signalpeptid, identifiziert über dbCAN2 (Zhang et al. 2018a), von MD1.....	93
Tab. 52: Abundante GH-Familien, vorhergesagt für Isolat MA18 ^T via dbCAN2 (Zhang et al. 2018a), und deren mögliche Enzymklassen nach Lombard et al. (2014).....	100
Tab. 53: CAZymes von <i>R. josui</i> JCM 17888 ^T detektiert in den Überstandproteinen von MA7c.....	105
Tab. 54: Quantifizierung von GH48 und 16S rRNA in DNA nach Rettenmaier et al. (2020b), Tab. 3..	109
Tab. 55: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Gärrest oder <i>in sacco</i> Anreicherungen des mesophilen und thermophilen Fermenterbetriebes.....	110
Tab. 56: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus dem mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieb.....	112
Tab. 57: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus <i>in sacco</i> Proben des mesophilen Fermenterbetriebes.....	114
Tab. 58: α -Diversität der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus dem mesophil-stabilen Fermenterbetrieb.....	115

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema einer landwirtschaftlichen Biogasanlage.....	13
Abb. 2: Struktur von Lignocellulose Yousuf et al. (2020), Figure 1.....	15
Abb. 3: Biologische und metabolische Prozesse der anaeroben Fermentation von organischer Biomasse, modifiziert nach Zverlov et al. (2015), Figure 2.....	16
Abb. 4: Mikrobielle Gemeinschaften exemplarischer Biogasanlagen (thermophil und mesophil) nach Hassa et al. (2018), Figure 2.....	18
Abb. 5: Ausschnitt der vereinfachte schematische Darstellung des Cellulosoms von <i>C. thermocellum</i> , modifiziert nach Raman et al. (2009), Figure 1.....	23
Abb. 6: Schema bakterieller Ribosomen und des 16S rRNA Gens mit verschiedenen Primerbindestellen nach Fukuda et al. (2016), Figure 1.....	25
Abb. 7: Bakteriell 16S rRNA Gen mit variablen Regionen, V1 bis V9, Primerbindestellen und mögliche Sequenziermethoden.....	26
Abb. 8: Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA.....	65
Abb. 9: Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit RNA.....	66
Abb. 10: <i>Multidimensional-Scaling</i> (MDS) der β -Diversitäts-Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung, identifiziert mittels 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA und RNA (cDNA) isoliert aus den mesophilen oder thermophilen Fermenterbetrieben.....	67
Abb. 11: Relative Abundanz einzelner Familien, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus cellulolytischer Anreicherungskulturen des mesophil-stabilen Fermenterbetriebes MS3.....	69

Abb. 12: Relative Abundanz einzelner Genera, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus cellulolytischen Anreicherungskulturen des thermophil-stabilen Fermenterbetriebs TS.....	71
Abb. 13: Zusammenfassung der Relative Abundanz einzelner Phyla, ermittelt über 16S rRNA, Region V3-V4, Amplikonsequenzierung.....	72
Abb. 14: Zusammenfassung der 16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4, von DNA isoliert aus S4MN4 auf Genus-Ebene.	76
Abb. 15: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von N2K1 ^T	81
Abb. 16: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 <i>up-to-date bacterial core genes</i> in Genomsequenzen, von N2K1 ^T	82
Abb. 17: Analyse zur Substrat-Verwertung von N2K1 ^T via DNSA.....	85
Abb. 18: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von MD1.	89
Abb. 19: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 <i>up-to-date bacterial core genes</i> in Genomsequenzen, von MD1.....	90
Abb. 20: Zellmorphologie von MD1.	91
Abb. 21: Charakterisierung von <i>D. raffinosedens</i> in Co-Kultur mit <i>A. thermocellus</i> nach Rettenmaier et al. (2020c).....	94
Abb. 22: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 <i>up-to-date bacterial core genes</i> in Genomsequenzen, von <i>D. raffinosedens</i> 249c-K6 nach Rettenmaier et al. (2020c), Figure 1.....	95
Abb. 23: Phylogenetischer Baum, basierend auf 16S rRNA Gensequenz Analysen, von MA18 ^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 1.	97
Abb. 24: Phylogenetischer Baum, basierend auf 92 <i>up-to-date bacterial core genes</i> in Genomsequenzen, von MA18 ^T	98
Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von MA18 ^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 5 B) und C).	99
Abb. 26: Anordnung des cellulosomal Gen-Clusters von MA18 ^T nach Rettenmaier et al. (2021), Figure 3.....	100
Abb. 27: Zusammenfassung der 16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4 mit DNA isoliert aus MA7c und MA7nc.....	102
Abb. 28: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus Gärrest (GR) bzw. <i>in sacco</i> Proben (IS) auf Genus-Ebene modifiziert nach Rettenmaier et al. (2020b), Figure 3.....	111
Abb. 29: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit DNA isoliert aus dem mesophilen und thermophilen Fermenterbetrieb auf Genus-Ebene.	113
Abb. 30: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA isoliert aus <i>in sacco</i> Proben des mesophilen Fermenterbetriebes auf Genus-Ebene nach Schmidt (2019), Abbildung 19.....	114
Abb. 31: Zusammenfassung der GH48 Amplikonsequenzierung mit RNA (cDNA) isoliert aus dem mesophil-stabilen Fermenterbetrieb auf Genus-Ebene.....	115

Co-Betreuung Studentischer Arbeiten

Im Folgenden sind alle im Rahmen dieser Doktorarbeit angeleiteten studentischen Arbeiten, durchgeführt am Lehrstuhl für Mikrobiologie, aufgelistet. Relevante Ergebnisse dieser studentischen Arbeiten werden in dieser Arbeit mit Erlaubnis der Studierenden und Zitation der entsprechenden Arbeit erneut präsentiert oder diskutiert.

Art der Arbeit	Name	Titel
Masterarbeit	Kristina Scheitz	Charakterisierung cellulolytischer Enzymsysteme mesophiler Bakterien aus einer NAWARO Biogasanlage
	Martin Gerbaulet	Heterologe Produktion und Charakterisierung von Glycosidhydrolasen aus neu isolierten cellulolytischen Isolaten
	Martina Schneider	Mikrobielle und physiologische Charakterisierung von thermophilen, cellulolytischen Konsortien
	Larissa Schmidt	Isolierung und Quantifizierung mesophiler und thermophiler Schlüsselorganismen des Celluloseabbaus in einem NAWARO Biogasfermenter
	Marie-Louise Kowollik	Charakterisierung einer neuen, aus einem Biogas-Fermenter isolierten Art der Gattung <i>Ruminiclostridium</i>
Bachelorarbeit	Carina Dürr	Charakterisierung thermophiler, cellulolytischer Mikroorganismen aus einer mit nachwachsenden Rohstoffen betriebenen Biogasanlage
	Luca Di Bello	Physiologische und genomische Charakterisierung von Isolat MD1, Vertreter eines neuen Genus innerhalb der Familie <i>Lachnospiraceae</i>
Forschungspraktikum	Kristina Scheitz	Charakterisierung von <i>Bacillus licheniformis</i> -Isolaten aus einer mesophilen Biogasanlage
	Martin Gerbaulet	Charakterisierung des cellulolytischen Systems von N2K1, einem mesophilen Bakterium isoliert aus einer NAWARO Biogasanlage
	Yat Kei Lo	Glycosyl Hydrolase Family 48 As a Molecular Marker For Identification Of True Cellulolytic Bacteria
	Johanna Streubel	Charakterisierung des Isolates MD1, ein neuer Vertreter innerhalb der Familie <i>Lachnospiraceae</i>

Wissenschaftliche Kooperationen

Diese Arbeit beinhaltet wissenschaftliche Kooperationen mit folgenden Personen und Ihren Instituten.

Art der Kooperation	Leitung	Institution
Betrieb und Beprobung Biogas Fermenter	Bernhard Munk	Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT) und Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (AQU), Landesamt für Landwirtschaft (LfL), Freising
Next-Generation-Sequencing	Dr. Klaus Neuhaus	ZIEL – Core Facility Microbiome, Technische Universität München, Freising
Elektronenmikroskopie	Prof. Dr. Andreas Klingl	Lehrstuhl für pflanzliche Entwicklungsbiologie und Elektronenmikroskopie, Ludwig-Maximilian-Universität München, Planegg-Martinsried
Massenspektroskopie	Dr. Christina Ludwig	Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS), Technische Universität München, Freising
Annotation von <i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>	Dr. Vincent Lombard	CNRS - Aix-Marseille Universität, AFMB UMR 7257 Case 932, AFMB, Marseille, Frankreich

Datenspeicherung in öffentlichen Datenbanken

In dieser Arbeit wurden Sequenzier-Daten bei NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) öffentlich hingelegt und werden im Folgenden zusammengefasst.

Identifikationsnummer	Beschreibung	Art der Sequenzierung	Verknüpfte Identifikationsnummern	Verknüpfte Publikation
PRJNA591875	Genome sequencing and assembly of <i>Defluviitalea raffinosedens</i> strain 249c-K6		<ul style="list-style-type: none"> • GCA_009765695.1 • WSLF00000000 • SAMN13390157 • <i>Defluviitalea raffinosedens</i> 224116 • SRR10673227 	Rettenmaier et al. (2020c)
PRJNA504539	<i>Anaerosphaera multitolerans</i> strain: GS7-6-2 Genome sequencing and assembly		<ul style="list-style-type: none"> • GCA_004006535.1 • RLIH00000000 • SAMN10397725 • NCBI:txid 2487351 • SRR8641363 	Rettenmaier et al. (2020a) Rettenmaier et al. (2019c)
PRJNA504010	<i>Hungateiclostridium mesophilum</i> strain:N2K1 Genome sequencing and assembly	Genomsequenzierung eines Isolates	<ul style="list-style-type: none"> • GCA_004102745.1 • RLII00000000 • SAMN10395150 • NCBI:txid 2487273 • SRR8752195 	Rettenmaier et al. (2019b)
PRJNA505952	<i>Ruminiclostridium herbifermentans</i> MA18 ^T isolate:MA18-P1 Genome sequencing and assembly		<ul style="list-style-type: none"> • GCA_005473905.2 • CP061336.1 • SAMN10417326 • NCBI:txid 2488810 • SRR8749746 	Rettenmaier et al. (2021)
PRJNA646883	Genome Sequencing of isolate MD1, a novel member within the family <i>Lachnospiracea</i>		<ul style="list-style-type: none"> • GCA_014174405.1 • JACEGA000000000 • SAMN15567581 • NCBI:txid2755051 • SRR12278975 	Diese Arbeit

Identifikationsnummer	Beschreibung	Art der Sequenzierung	Verknüpfte Identifikationsnummern	Verknüpfte Publikation
PRJNA516126	16S rRNA amplicon sequencing of enrichment cultures out of a lab-scale biogas fermenter	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRX5550281-SRX5550304 • SAMN10782817-SAMN10782840 	Rettenmaier et al. (2019a)
MK431704-MK431733	Cultured prokaryotic 16S rRNA / 16S pure isolates th.cult.analysis	16S rRNA Amplifikation mit den Primern 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	
PRJNA625239	Raw sequence reads of metagenomic GH48 genes	Amplikonsequenzierung bakterieller GH48 Gene	<ul style="list-style-type: none"> • SRX8115354-SRX8115365 • SAMN14595678-SAMN14595689 	Rettenmaier et al. (2020b)
PRJNA680699	Bacterial GH48 genes in RNA of biogas fermenters	Amplikonsequenzierung bakterieller GH48 Gene	<ul style="list-style-type: none"> • SRX9572690-SRX9572692 • SAMN14595680; SAMN14595682 	Diese Arbeit
MT350287	Cultured prokaryotic 16S rRNA / <i>Defluviitalea raffinosedens</i> , 249c-K6, full 16S rRNA gene	16S rRNA Gensequenz assembliert aus der Genomsequenz und Sanger-Sequenzierung nach Amplifikation mit 616F und 630R	-	Rettenmaier et al. (2020c)
MN744427	<i>Defluviitalea raffinosedens</i> strain 249c-K6D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA Amplifikation 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	
PRJEB37872	-	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V6-V8	<ul style="list-style-type: none"> • SAMEA6837522-SAMEA6837537 • ERX4118236-ERX4118251 	
PRJNA672848	16S rRNA Amplicon sequencing of mixed isolate S4MN4	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR12959967-SRR12959972 • SAMN16579858-SAMN16579867 	Diese Arbeit
MK138668	Cultured prokaryotic 16S rRNA / 16S GS7-6-2 ^T	16S rRNA Amplifikation mit 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	Rettenmaier et al. (2020a)
MK138666	Cultured prokaryotic 16S rRNA / 16S N2K1 ^T	16S rRNA Amplifikation mit 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	Rettenmaier et al. (2019b)
MK935571	Cultured prokaryotic 16S rRNA / MA18 ^T	16S rRNA Amplifikation mit 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	Rettenmaier et al. (2021)

Identifikationsnummer	Beschreibung	Art der Sequenzierung	Verknüpfte Identifikationsnummern	Verknüpfte Publikation
MW180938	Cultured prokaryotic 16S rRNA / <i>Lachnospiraceae</i> bacterium MD1	16S rRNA Amplifikation mit 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung über 616F und 16S_MD1	-	Diese Arbeit
MW229081	Cultured prokaryotic 16S rRNA / MA7	16S rRNA Amplifikation mit 616F und 630R und anschließender Sanger-Sequenzierung	-	Diese Arbeit
PRJNA672905	S4MN4 Raw sequence reads	Roh-Daten der PacBio und Illumina-Sequenzierung des Mischisolates S4MN4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR12990413-SRR 12990415 • SAMN16579858 • SAMN16579867 	Diese Arbeit
PRJNA674481	16S rRNA Amplicon Sequencing of thermophilic, cellulolytic enrichment cultures from biogas fermenters	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR12983455-SRR12983478 • SAMN16657685-SAMN16657708 	Diese Arbeit
PRJNA674617	16S rRNA Amplicon Sequencing of mesophilic, cellulolytic enrichment cultures from biogas fermenters	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR12983886-SRR12983915 • SAMN16663132-SAMN16663167 	Diese Arbeit
PRJNA675478	16S rRNA Amplicon Sequencing of isolate MA7	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR13011616-SRR13011622 • SAMN16708844-SAMN16708850 	Diese Arbeit
PRJNA680694	Raw sequence reads of GH48 genes in DNA and RNA from biogas fermenters	Amplikonsequenzierung bakterieller GH48 Gene	<ul style="list-style-type: none"> • SRR13168257-SRR13168271 • SAMN16911704-SAMN16911718 	Diese Arbeit
PRJNA682319	Raw sequence reads of bacterial 16S rRNA, V3-V4, in DNA of biogas fermenters	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SRR13189624-SRR13189635 • SAMN16911704-SAMN16911715 	Diese Arbeit
PRJNA682384	Raw sequence reads of bacterial 16S rRNA, V3-V4, in RNA of biogas fermenters	Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA, Region V3-V4	<ul style="list-style-type: none"> • SAMN16911716-SAMN16911718; • SAMN16987134-SAMN16987142 	Diese Arbeit

Hinterlegung neuartiger Isolate in internationalen Stammsammlungen

In dieser Arbeit wurde mit den Stammsammlungen in Deutschland (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), Spanien (Spanish Type Culture Collection (CECT), Valencia, Spanien) und Japan (Japan Collection of Microorganisms (JCM), Ibaraki, Japan) zusammengearbeitet. Alle hinterlegten Isolate sind im Folgenden zusammengefasst.

Isolat ID	Organismus	Stammsammlung	Identifikationsnummer
N2K1 ^T	<i>Acetivibrio mesophilus</i>	DSMZ	DSM 107956 ^T
		CECT	CECT 9704 ^T
MD1	Neuartiger Organismus innerhalb der Familie <i>Lachnospiracea</i>	DSMZ	DSM 110715
		JCM	JCM 39125
MA18 ^T	<i>Ruminiclostridium herbifermentans</i>	DSMZ	DSM 109966 ^T
		JCM	JCM 39124 ^T
GS7-6-2 ^T	<i>Anaerosphaera multitolerans</i>	DSMZ	DSM 107952 ^T
		CECT	CECT 9705 ^T

Nukleinsäuresequenzen

>S4MN4-3-1_16S rRNA

TTAATAAGCAGAAGTTTTTCGGATGGAAGCTTATTAACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGGGTAACTGC
CTTACACAGGGGGATAACAGCCGGAAACGGTTGCTAATACCGCATAAGCATAACAGNGCNGCATGNNNNNGTGTGA
AAAGATTTATCGGTGTAAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGCGACGAT
CAGTAGCCGGCTTGAGAGAGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTTCGGTATGTAAAG
CTCTATCAGCAGGGACGATAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGGGGCAAGCGTTTACTCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGTAAGTCAGGTGTGAA
AGCCCCGGGCTCAACCCCGGGATTGCACTTGAACCTATCAAAGTAGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAAATTCCTAG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACCTGACGTTG
AGGCTCGAAAGCGTNGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGT
TGGGGTCCATAAGGACTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCCCCTGACCGGTCCGTAACGGGACCTTTCTTCGGGACAGGGGAGACAGGTGGTGCATG
GTTGTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTAGCCAGC
AGGTAANNCTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGACTACAAAGAGAAGCAAAGCTGTGAAGTGGAGCAAAAT
CTCAAAAAGGTCATCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAG
ATCAGAATGCTGTGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGATATGCC
GAAGTCAGTGACCCAACCGTAAGGAGGGAGCTGCCGAAGGTGGAGCCAATGACTGGG

>S4MN4-3-2_16S rRNA

CGGANTAAGAGAGAAGCTTGCTTAGCTCTTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGAGTAACCTGCCTTTC
AGAGGGGGATAACGTTCTGAAAAGAACGCTAATACCGCATGATATATCGGAGCTGCATGGCTCTGGTATCAAAGG
AGCAATCCGCTGAAAGATGGACTCGCGTCCGATTAGCCAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGCGACGATCGG
TAGCCGGGTTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GGATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAATGCCGCGTGAGGGGAAGACGGTCTTCGGATTGTAAACCTC
TGTCTTGGTGAAGATAATGACGGTAGCCAAGGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGTGCCTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGGCGTGAAAGC
TGTGGGCTTAACCCACAAATTGCGTTCGAAACTGGAAGGCTTGAGTGAAGTAGAGGTAGGCGGAATTTCCCGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGGCTTTAACTGACGCTGAGG
CACGAAAGCATGGGTAGCAANCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAANCATGATTACTAGGTGTGGG
GGTCTGACCCCTTCCGTGCCGGARWNWACACNATAAGTAATCCNCMTGGGGAGTACGGNMRNRSNTKGAACCT
CAAASRAAKTGACGGGRSSCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTNTAATTNGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGNCATCCAACCTAACGAGGCAGAGATGCNTTAGGTGCCNTTCGGGGAAAAGTTGAGACAGGTGGTGCATGG
TTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTGATTAGTTGCTACGC
AAGAGCACTNTAATCAGANNGCCGTTGACAAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGCTAACAGAGGGAAGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCAAACCCCAAA
AGCGATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACCCGCTACATGAAGTTGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCCGGTAATACCCGAAGCCAA
TAGTCTAACCGCAAGGGGGACGTTGTGCAAGGTAGGATTGGCGACTGGGGNAGTNGT

>S1_16S rRNA

GTCGAACGGAGTAAGAGAGAAGCTTGCTTAGCTCTTACTTAGTGCCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGTAACCTG
CCTTTCAGAGGGGATAACGTTCTGAAAAGAACGCTAATACCGCATGATATATCGGAGCTGCATGGCTCTGGTAT
CAAAGGAGCAATCCGCTGAAAGATGGACTCGCGTCCGATTAGCCAGTTGGCGGGTAAAGGCCACCAAAAGCGAC
GATCGGTAGCCGGGTTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGGATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAATGCCGCTGAGGGAAAGACGGTCTTCGGATTGTA
AACCTCTGTCCTTGGTGAAGATAATGACGGTAGCCAAGGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAGGGTGGCTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGGCGT
GAAAGCTGTGGGCTTAACCCACAAATTGCGTTCGAAACTGGAAGGCTTGAGTGAAGTAGAGGTAGGCGGAATTCC
CGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGGCTTTAACTGACG
CTGAGGCACGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAGG
TGTGGGGGGTCTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACACAATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCAACCTAACGAGGCAGAGATGCATTAGGTGCCCTTCGGGGAAAAGTTGAGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTGTGATTAGTTG
CTACGCAAGAGCACTCTAATCAGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGCTAACAGAGGGAAGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCAAACC
CCAAAAGCGATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACCCGCTACATGAAGTTGGAATTGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCCGGTAATACCCGA
AGCCAATAGTCTAACCGCAAGGGGGACGTTGTCTGAAGGTAGGATTGGCGACTGGGGTGAAGTC

>MS-GR11.2_16S rRNA

ACTTcACCCCAATCGCTGACCCTACCTTAGGTCGCTGCCTCCCTTACGGGTTAGCTCACGAACTTTGGGTATTGC
CAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGGACATTTCTGATTCGCGATTA
CTAGCAACTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACAAGTTTTTAAGTTTAGCTCCA
CCTTGGCGTATTGCATCTTTTTGTACTTGCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGACATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTACATCCACCTTCCCTCCCGGTTAACCCGGGAGTCTTGCTAGAGTGTCAACTTAATGGTAGCAACTAA
CAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCT
GTCTTCCTGTCCCCGAAGGGACTTCCCTCGATTAAGAGTAATTCAGGAGATGTCAAGTCTAGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGA
CCGTAATCCCCAGGCGGAATACTTAATGCGTTTTGCGGCGGCACAGAGGTCATGACAACCCCTACACCTAGTATTC
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTAC
AGTCCAGAGAGTCGCTTCCGCACTGGTGTCTTCTAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCAC
TCTCCTCTCCTGCACTCTAGACTTCCAGTTTGAAATGCAGCACCCAAGTTGAGCCCGGGTATTTACATCTCACT
TAAAAATCCGCTACGCTCC

>TS-IS-1.2_16S rRNA

GGCTCCTTGTTACGACTTCCCCAGTCATCGGCTCCACCTTCGGCAGCTCCCTCCTTACGGTTGGGTCACTGACT
TCGGGCATTTCCGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTCACCGGACATGCTG
ATTCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGTGCAGTTGCAGACTACAATCCGAACTGGGATGGCCTTTTTG
GGATTTGCTCACCTTACAGGGTGCCTCCCTTTGTAGCCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGTCCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTATCCCCGCTTCCCTCCAGGTTATCCCTGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCAACTTTAC
TTGCTGGCTACTAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCTCCATTGTCCCGAAGGAAAGGTCCGGTTAAGGACCGGTCAATGGGATGTCAAGGCCTG
GTAAGGTTCTTGCAGTGTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCACTTTCGCAACGTACTCCCCAGGTGGAATACTTAATGCGTTTTGCGACGGCACCGAAGAGCTTTTGTCTCC
CGACACCTAGTATTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGC
CTCAGTGTGAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTA
CACTAGGAATTCACCTTACCTCTCCTGCACCTAGCAAACAGTTTCAAATGCAATCCCGGAGTTGAGCCCCGGG
CTTTACATCTGACTTGACTTGCCACCCACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTACG
TATTACCGCGCTGCTGGCACGTAATTAGCCGGGGCTTCTTAGTCAGGTACCGTCATTTTCTTCCCTGCTGAAGA
AGCTTTACcTACCGAAATACTTCTTCACTcacGCGGGGTCCCTTCATCAGGGTTT

>TS-IS-II_16S rRNA

GGCTACCTTGTACGACTTCCCCCAGTCATCGGCTCCACCTTCGGCAGCTCCCTCCCTTTCGGGTGGGTCACTG
ACTTCGGGCATTTCCGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATG
CTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGGGACGGCTTTT
TTGGGATTCGCTCACCTTCGCAGGGTCGCTTCCCTTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGTCCATA
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCCTCCAGGTTGTCCCTGGCAGTCTCCCTAGAGTCCCCACCCG
AAGTGCTGGCTACTAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAACCATGCACCACCTGTCTCCATTGTCCCGAAGGAAAGGTCCGGTTAAGGACCGGTCAATGGGATGTCAAGGCC
TGGAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATACTTAATGCGTTTTCGACGGCACCGAAGGTCTTTTGACC
CCCGACACCTAGTATTTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTTCGA
GCCTCAGTGTGAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCCGC
TACACTAGGAATTCACCTTACCTCTCCTGCACTCTAGCAAAAACAGTTTTCAAATGCAGTCCCGGAGTTGAGCCCCG
GGCTTTTACATCTGACTTGTCTTCGCCACCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAATTCCGGATAACGCTTGCCCCCTA
CGTATTACCGCGGCTGCTGGAACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAGTCAGGTACCGTCATCTTCTTCCCTGGTGAAA
GAGCTTTACGTACCGAAATACTTCTTTCATTTCAGGGGGTTCGCTGCATNNGGGTTTCCCCCATTGGGCAATATT

16S rRNA Amplikonsequenzierung, Region V3-V4, S4MN4: OTUs mit Übereinstimmung zu Isolaten

>OTU_1

GGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATT
TCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGGTGCTGCGGTA
AGTCAGATGTGAAAACCCGGGGCTCAACTCCGGGACTGCATTTGAAACTATCGAACTAGAGTGCAGGAGAGGTAA
GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT
GTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTTG

>OTU_6

GGGGGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGGGGAAAGCCTGATGCAGCAATGCCGCGTGAGGGAAGACGGTCT
TCGGATTGTAAACCTCTGTCTTGGTGAAGATAATGACGGTAGCCAAGGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGTGCAGTAGGCGGCTTTTFA
AGTCGGGCGTGAAGCTGTGGGCTTAACCCACAAATTGCGTTTCGAAACTGGAAGGCTTGAGTGAAGTAGAGGTAG
GCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGGCT
TTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTTG

>OTU_11

GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGAAGAAGGCCT
TCGGGTTGTAAACTTCTTTGATTGGGGACGAAGAAAGTACTGTACCCAAAAACAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGTGTAGGCGGGTGA
CCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAACTCCGGCGCTGCATCTGAAACTGGACATCTTGAGTGTCTGGAGAGG
AAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTTG
ACAGTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTTG

>OTU_31

GGGAGGCTGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATT
TCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGACGATAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAGGGTA
AGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGATTCGATTTGAAACTATCCGACTAGAGTGCAGGAGAGGTAA
GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT
GTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTTG

>OTU_523

GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGTATT
TCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAATACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTGCGGTA
AGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGACTGCATTTGAAACTGTGCAACTAGAGTGCAGGAGGGGTAA
GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT
GTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTTG

Proteinsequenzen S4MN4 detektiert im Sekretom nach Textsuche „Cellulo“ / „Cellulase“

>MHPJIEBC_10548 Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (reducing end) CelS
MVKSRKISILLAIAMLVSIMIPSTALAGPIKAPTGGTSYEDLFLEFYDMIKDPRNGYFSSDEGIPYHSIETLIV
EAPDYGHVTTSEAFSYYIWLEAMYQFTGDWSGVKESWQVMEDWIIIPDSTEQPGMAMYSNPSPATYAAEHDDPKY
YPSELMFDSVRVGTDPHNDLTSAYGPDMYLMHWLMDVDNWNWYGFGTGTRATFINTFQRGEQESAWETIPHSIEE
FKYGGPNGFLDLFTKDKSYSKQWRYTNAPDAEARAIQAAYWANKWAKEQ GKASTLSSVVTKATKMGDFLRNDMFD
KYFMKIGAQDKTPGTGYDSAHYLMAWYTSWGGGIGSQAWKIGASHIHFGYQNPQAWINATQSEFAPKSSNGKK
DWTTSLDRQIEFYQWLQSAEGAIAGGATNSWKGRYEKYPAGKSTFYGMAYVPHVYADPGSNEWFGMQCWSMQRM
MDLYLESGDSRIEPLVRKWAEWAMSEVKLYEDGTFAIPSNLGSWGEPTWTGKYTGPNLHVTVNTYGTDLGVAG
SLANALATYAAATRKGWGLDTRARDMAAELVNRAWYNYCEEGKGVVTEEARGDYKRFFSQEVFVPAGWSGTMPN
GDKIQPGVKFIDIRSKYKQDPDYNKVYQAYQRGEDPVLNYHRFWHEVDLAVGMGVLATYFPELTYQIPGEGGPGN
DPTYGDCNEDGKVTSTDLTILKRYLLKMDVKINLENADVNRDGVKVTSTDATILKRFLTKI IKELPL
>MHPJIEBC_11610 Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase
MNFRTKICAAIVFTIVLSMMLPSVVFATKDNASHLPPYGNLLYERIFDEGLCFPWHTCEDSGGKCQFQVVDVPG
QSGNRAFRLTVLDPGQNKWSVQMRHRGITLEQGHTYKIKFTVWADKACRVYVKIGQMGEPEYAEYWNWNPNFVSV
AGGQKLTVEETFTMDKPTDDTCEFTFHVGGELAAGVPYNIYLLDDVSLYDASYTKPPVAAILPEPDVRVNQVGYLPS
AKKVATVVTDDSTSPLKWRLLDSTGKVVKEGNTIPKGLDLDSQDKVHWLDFSDFTTEGTGYFELPNVNTDTNYSH
PFDIGNDIYSQMKFEALAFFYH
>MHPJIEBC_07988 Cellulosome-anchoring protein
MPDKSITRAEFATVAYKFLEKLGKIEEVQDIEIQDKIDIGHWAQKYIKTLVAKGYIKGYPDETRFPQASIKRSES
VALINRSLERGPLNGAVLDFQDVPANYWAYKDIAEGVIYHSYKIDENGQEVMEKLD
>MHPJIEBC_06249 Cellulase/esterase Cele
MKRVYITLIMLIIFTIYLFACSKENQLQEKQTQIETATNEEISVTPTEKGEVKDQOQSSQNEQTSVPKKEETIERQEMR
DISSVELIKEMKIGWNLGNTMDATGGNGVNSELSWGNPLTNEEMIKTIKAAGFNILRIPITWEKHLGPAPDYIID
EAWLNRVQTIIVNYGIDSDMFVIINMHHEWDHWFPSYENADNAKDILTKVWRQIADRFENYDEHLIFEDLNEPRMKG
TNVEWTGGNEEGRDVVNQLNAAFIETIRNSGGNNPLRHLMIPPYAASSDPITWSNFIVPEDDKVIVSIHAYTPWN
FTLNEYGTSEWTLSNSNDTWEIDNLMNNIYESFISKGIPVIGEFGARDKENMQSRVEWAEYVQSATEKGI PCI
WWDNGAFTGEGELFGILDRRGLSWKYPEIVDALMKGIQ
>MHPJIEBC_06024 Cellulase/esterase Cele
MNEEKQLQTYALNEIEYIKVHGRTTGQLSPLTLFWTGSAVELNAKGSSELWVEVEAGYDVYEPWIGIVINSAPVSR
LMITEGRHWICVFRGMNPDQVKNVRIVKEVQAMSGDQGCFLHIHSVKFDGQFLPIEEKPKYKIEFIGDSITSGE GI
VGAKGEEDWIPMWF SATGNYTELVANALNAEYRVLSQSGWGVFTSWDNNPHCNMQDDYEVKVCGLIQGKRNEALGA
LQENNFASWQPDVIVVNLGTNDASAFDQPQWKDEVTGETHKQRRNEDGSFHEEDIKAFERAIVRFLTKLRKYNKK
AQIVWAYGMIGITMMPYIYRAVEAYYRETGDKKVSVYQLPNTTEATMGSRSHPGHLSHLKAATELSEYLQDFLK

>Unclassified bacterium, Isolate MD1 16S rRNA gene

ATGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTTATATTT
ATGAAGTTTTCGGATGGAATGATATAAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGGGTAACCTGCCTCATACA
GGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAACACCGCATAAGCATAACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAATATTT
ATAGGTATGAGATGGGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCC
GGCTTGAGAGAGTGACCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGTGAAGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGCTCTATCA
GCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGG
GGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGGTGGTGCGGTAAGTCAGATGTGAAAACCCGGG
GCTCAACTCCGGGACTGCATTTGAAACTATCGAACTAGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACCTGACACTGAGGCTCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGGCC
AAAAGGCTCTCGGTGCCGTCGCAAACGCATTAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATTTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCCTCTGACCGGTCCGTAACGGGACCTTCCCTCGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGT
CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCAACCCCTATCCTTAGTACCCAGCAGTACGGC
TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCAGGATAAACCCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGCTACAAAGAGAAGCGACCCTGTGAAGGTGAGCAAATCTCAAAAA
GCCATCCCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATG
TCGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTCGGATATGCCCGAAGTCAGT
GACCAACCCATCTTAGTGAGCATGACGT

16S rRNA Amplikon, V3-V4, mit 100% Übereinstimmung zu *Ruminiclostridium herbifermentans*, MA18^T

aus Analyse der Anreicherungskulturen 2019 (Schmidt 2019) PRJNA674617 und PRJNA674481

>OTU_39

GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATG
AAGGTTTTTCGATTGTAACTTCTTTAGTCAGGGACGAAAAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTA
AAGGGCGTGTAGGCGGGAATGTAAGTCAGATGTGAAATCCCAGGGCTTAACTCTGGAGCTGCATCTGA
AACTATATTTCTTGAGTGCCGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATT
AGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTTTCTGGACGGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGG

16S rRNA OTUs der Region V3-V4 des Isolates MA7

>OTU_1

GCTGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGT
CTTTCGATCGTAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGATAATGACGGTACCTGAGGAGGAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTTACTGGGCGTAAAGGGAG
CGTAGGCGGATTTTAAAGTGAGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTTCAAACCTGGA
AGTCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATAC

>OTU_2

GCTGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGT
TTTTTCGATTGTAACTTCTTTAGTCAGGGACGAAAAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTACTGGGTGTAAAGGG
CGTGTAGGCGGGAATGTAAGTCAGATGTGAAATCCCAGGGCTTAAACCCTGGAGCTGCATCTGAAACTA
TGTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGCTTTCTGGACGGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGAT

AC

>OTU_3

GCTGCAGTGAAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGACTGC
CCTATGGGTTGTAACTTCTTTTATAAAGGAATAAAGTCGGGTATGGATACCCGTTTGCATGTACTTT
ATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGATGGATGTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCAGGCTCAACCGTA
AAATTGCAGTTGATACTGGATATCTTGAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCTGCAACTGACATTGAGGCT
CGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATAC

GH48-Gensequenzierung MA7c

>GH48-MA7c

TCCATCCATACCAGTTGTCGACGTCAAGTAACCAATGCATTCCGTACAGCATGCTGGTTCCATATGCT
GAAGTCAATTGTGAATTAATTGGATCTCTACCAACAGGTTGGCTAGTATCCAATGGTGAAGGATACTT
GCTTGGATCCTGGAATTCTGGAGCGTATGTAGCAGGCTTGTTAGCATCATATCTGCTCATACTTGAAT
TAGGCTGATCCTTTTCTGTAGGGATCAAATATTTTTTCAGTAGTAGTCCAAGACTTGTTAAAACCTGAA
AAATCTCCTGTGAATCTTCCATACATTGCTTCCAACCACATATAATAGGACATTGCTTCACTTGTGTG
AACATGTCCGTAGTCTGGAGCTTCACTCAAGAA

Anhängende Abbildungen und Tabellen

Tab. A 1: Primer-Sequenzen in Cel48-Mix2 zur Amplifizierung von GH48 Genen.

Primer-ID	Nukleotidsequenz	GC-Gehalt in [%]	Länge [bp]	Volumen in cel48-Mix2
F1	TCTTGAGTGAAGCTCCAGACTA	45,5	22	1 µl
F2	TGCTTAGCGA[AG]GCGCCCAA	60,5	19	2 µl
F3	GAGCGA[AG]GC[]CC[]GATTAC	55,3	19	2 µl
F4	TGAGCGAGGCTCC[GT]GAC[CT]A	63,2	19	4 µl
F5	TGATATGCGAAGCACCTGA[CT]TATG	43,8	24	2 µl
F6	TCATATG[CT]GAAGC[GA]CC[]GATTAC	45,7	23	8 µl
F7	TGATATGCGAGGCACCGGATTA	50,0	22	1 µl
F8	TGAACTGTGAAGCTCCTGATCAA	43,5	23	1 µl
F9	TGTGTGTTGAAGCGCCTGATTAC	47,8	23	1 µl
F10	TGATTGT[]GAAGCTCC[]GAC[CT]TATG	41,7	24	4 µl
F11	ATCGTCGAAGCGCCTGACCA	60,0	20	1 µl
F12	ATCGACGAGGCGCCCGA	70,6	17	1 µl
F13	TTTTGGTGGAAGCTCCGGACTAT	47,8	23	1 µl
F14	TAATGGTTGAAGCACCC[]GAC[CT]AT	41,3	23	2 µl
F15	TCATCGTGA[GA]GC[]CC[]GAC[CT]TA	50,0	22	4 µl
F16neu	ATCGTGAAGGC[]CC[GC]GACC	68,4	19	2 µl
R1	CCGAAGCCGTAGACGTTGTC	60,0	20	1 µl
R2	CCGTAACCGTAGATGTTGTC[]A	45,5	22	1 µl
R3	CCG[AT]AGCCGTA[GC][GC]TGTTGTC	60,0	20	8 µl
R4	CCGTATCCATACCAGTTATCCGTA	45,8	24	1 µl
R5	CCAAATCCATACCAGTTATCACAGT	40,0	25	1 µl
R6	CCAAAACCATACCAGTTATCAACATC	38,5	26	1 µl
R7	CCATCCATACCAGTT[AG]TC[]AC[AG]TC	45,8	24	4 µl
R8	CCR[AT]A[]CCGTAGACGTTGTC	52,5	20	4 µl
R9	CCGAAGCCGTACCA[AG]TT[AG]TC	55,0	20	4 µl

[|], degenerative Position

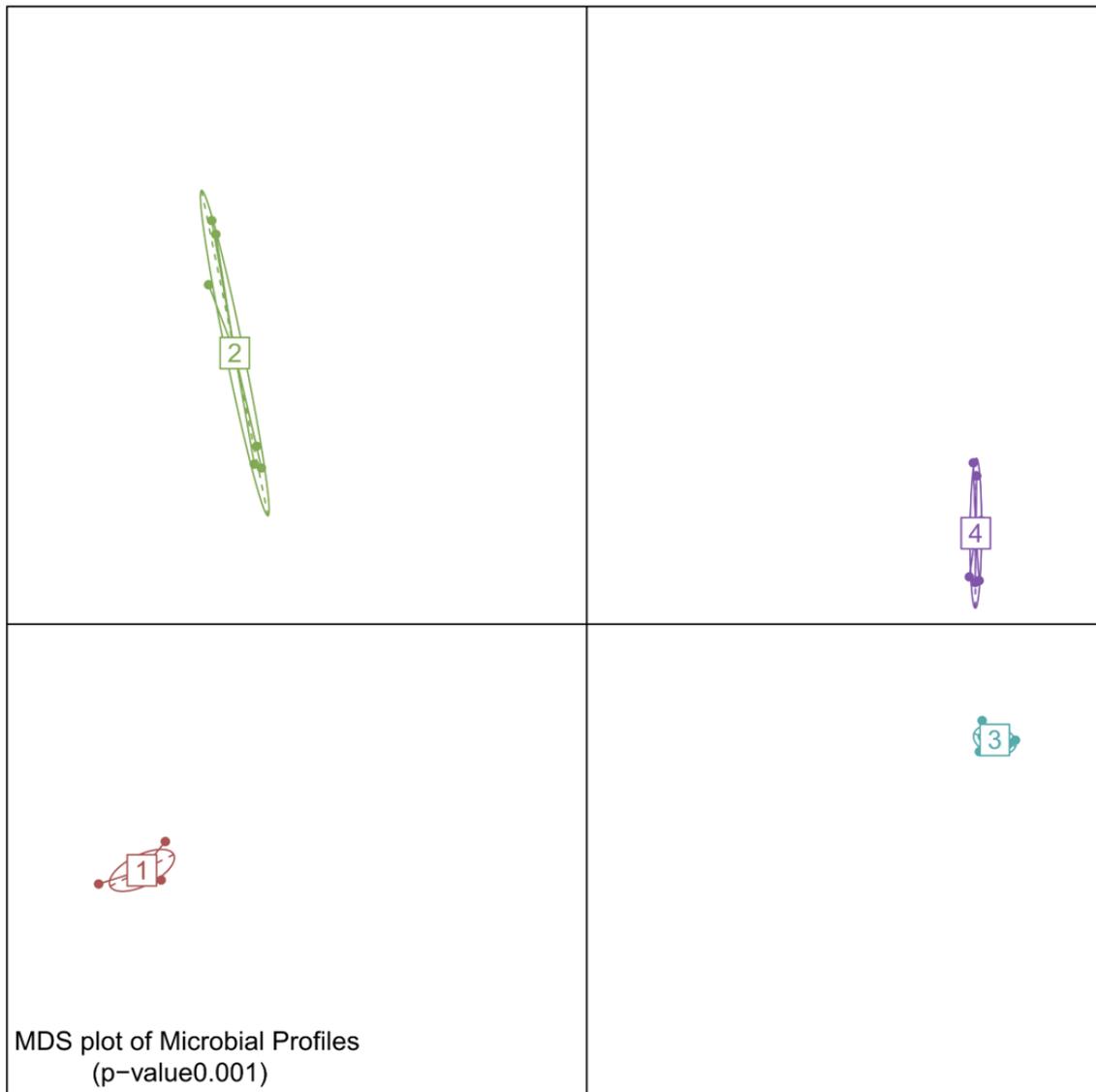


Abb. A 1: Multidimensional-Scaling (MDS) des *de novo* clustering der mikrobiellen Zusammensetzung, identifiziert mittels 16S rRNA, Region V3-V4 Amplikonsequenzierung in DNA und RNA aus dem mesophilen oder thermophilen Fermenterbetrieb. Die Roh-Daten sind unter PRJNA682319 (DNA) und PRJNA682384 (RNA) öffentlich zugänglich. Die statistische Auswertung erfolgte über Rhea (Lagkouvardos et al. 2017) in R. Identifizierte Cluster:

- 1, MI-PN19-1-cDNA, MI-PN19-1-DNA, MI-PN19-2-cDNA, MI-PN19-2-DNA, MI-PN2-DNA, MI-PN3-cDNA;
- 2, MS-PN14-1-cDNA, MS-PN14-1-DNA, MS-PN14-2-cDNA, MS-PN14-2-DNA, MS-PN2-DNA, MS-PN3-cDNA;
- 3, TI-PN2-DNA, TI-PN3-cDNA, TI-PN8-9-1-cDNA, TI-PN8-9-1-DNA, TI-PN8-9-2-cDNA, TI-PN8-9-2-DNA;
- 4, TS-PN2-DNA, TS-PN3-cDNA, TS-PN8-1-cDNA, TS-PN8-1-DNATS-PN8-2-cDNA, TS-PN8-2-DNA

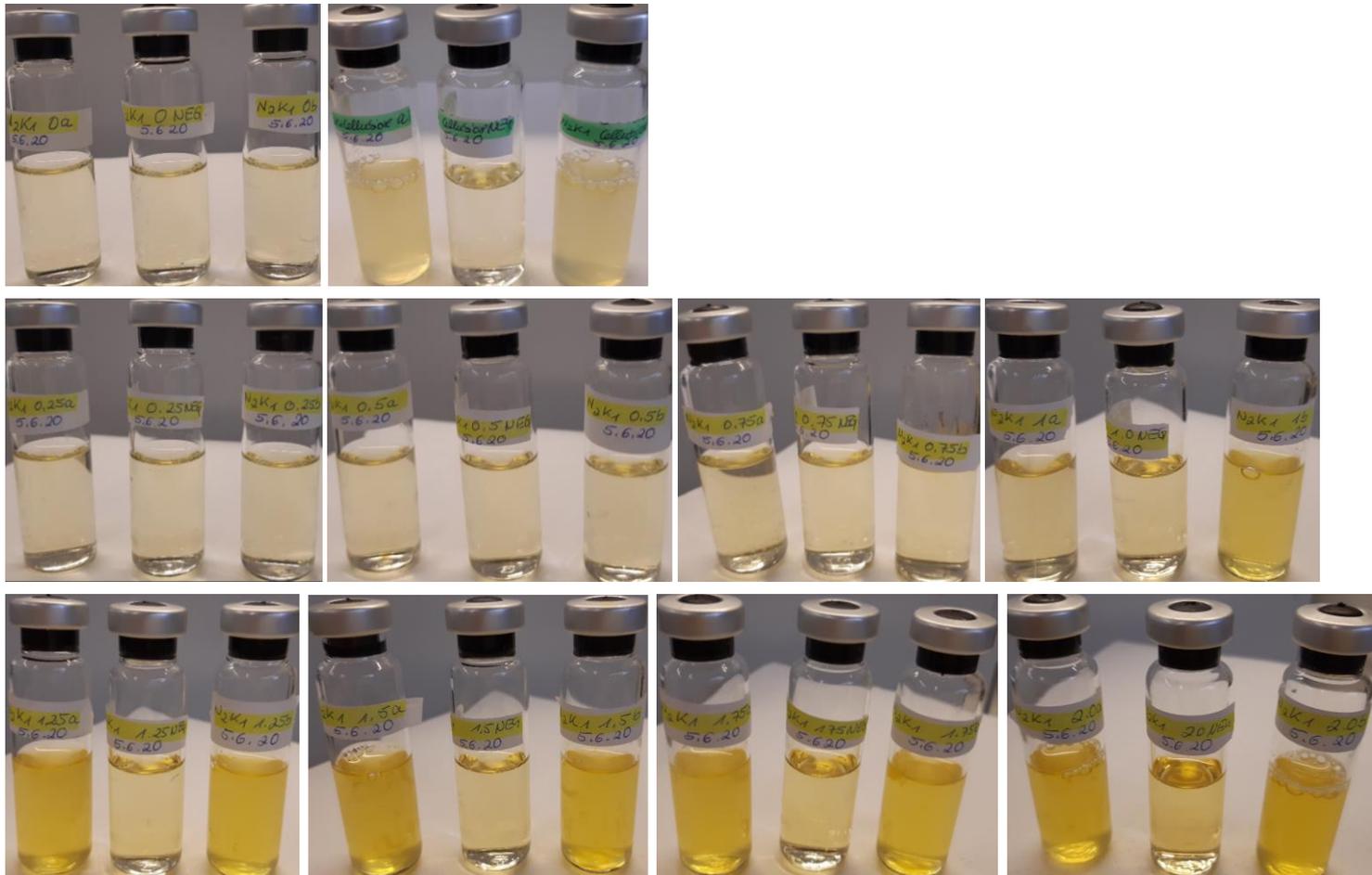


Abb. A 2: Wachstum von N2K1^T in 10 ml GS2 Medium mit verschiedenen C-Quellen nach 5 Tagen bei 45 °C, jeweils Replikant a, sterile Mediums-Kontrolle, Replikant b. Abgebildet von links nach rechts:

- keine C-Quelle; 0,5% (w/v) Cellobiose
- 0,25% (w/v) Xylose; 0,5% (w/v) Xylose; 0,75% (w/v) Xylose; 1% (w/v) Xylose
- 1,25% (w/v) Xylose; 1,5% (w/v) Xylose; 1,75% (w/v) Xylose; 2% (w/v) Xylose

Tab. A 2: Kohlenhydrat-Stoffwechselwege, identifiziert über KEGG Pathway Analyse, von N2K1^T.

Kohlenhydrat-Stoffwechsel	Anzahl Module	Vollständigkeit (+/-)
Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate	12	-
Glycolysis, core module involving three-carbon compounds	7	-
Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P	9	-
Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	5	+
Citrate cycle, first carbon oxidation, oxaloacetate => 2-oxoglutarate	2	-
Pentose phosphate pathway, non-oxidative phase, fructose 6P => ribose 5P	3	-
PRPP biosynthesis, ribose 5P => PRPP	1	+
Semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, gluconate => glycerate-3P	4	-
D-Galacturonate degradation (bacteria), D-galacturonate => pyruvate + D-glyceraldehyde 3P	5	+
Glycogen biosynthesis, glucose-1P => glycogen/starch	5	+
Glycogen degradation, glycogen => glucose-6P	2	-
Nucleotide sugar biosynthesis, glucose => UDP-glucose	3	+
UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis, prokaryotes, glucose => UDP-GlcNAc	5	+

+ alle Module vorhanden; -, ein Block fehlt

Tab. A 3: Top Hits sekretierter Proteine von N2K1^T. Die relative Abundanz wurde via LC-MS/MS in Kooperation mit Dr. Christina Ludwig, BayBioMS, TU München, Freising ermittelt.

Protein ID	Sequenz-Abdeckung [%]	Länge (Aminosäuren)	Score	iBAQ N2K1_1_R1	iBAQ N2K1_1_R2	iBAQ N2K1_1_R3	Mittelwert
RXE57588.1	54,1	133	323,31	1,51E+10	1,51E+10	1,24E+10	1,42E+10
RXE58868.1	25	176	97,12	1,27E+10	1,26E+10	1,23E+10	1,25E+10
RXE57994.1	82,9	1033	323,31	8,85E+09	1,01E+10	9,73E+09	9,56E+09
RXE59842.1	75,4	460	323,31	6,03E+09	6,49E+09	7,25E+09	6,59E+09
RXE59309.1	64,9	741	323,31	4,51E+09	4,23E+09	7,69E+09	5,48E+09
RXE58867.1	44,3	176	133,72	3,17E+09	3,18E+09	2,68E+09	3,01E+09
RXE60313.1	55,7	884	323,31	1,67E+09	1,59E+09	2,44E+09	1,90E+09
RXE57906.1	70,4	1825	323,31	1,74E+09	1,64E+09	2,15E+09	1,85E+09

Tab. A 4: Extrazelluläre CAZymes von N2K1^T, annotiert über dbCAN2 (Zhang et al. 2018a).

Gen ID	HMMER	DIAMOND
RXE57615.1	GH9(38-516)+CBM3(545-635) + CBM3(726-806)	CBM3 + GH9
RXE57665.1	CBM16(30-153)+GT39(436-660)	CBM0 + GT39
RXE57839.1	GH9(31-461)+CBM3(486-570)	CBM3 + GH9
RXE57906.1	cohesin(32-160)+cohesin(184-311)+cohesin(350-477)+cohesin(512-638)+CBM3(690-779)+cohesin(876-1006) + cohesin(1034-1162)+cohesin(1192-1320)+cohesin(1356-1484)+cohesin(1525-1655)	CBM3
RXE57925.1	GH5_2(92-346)+CBM17(379-582)+CBM28(591-777)	CBM17 + CBM28 + GH5_2
RXE57948.1	CBM22(30-161)+GH10(219-498)	CBM22 + GH10
RXE58124.1	GH5_1(50-419)	GH5_1
RXE58131.1	GH9(40-508)	GH9
RXE58132.1	CBM35(67-162)+GH26(180-493)	CBM35+GH26
RXE58154.1	GH11(41-222)+CBM6(251-370)	CBM6+GH11
RXE58155.1	GH11(41-223)+CBM6(252-371)+CE4(474-583)	CBM6+CE4+GH11
RXE58162.1	GH9(57-539)+CBM3(746-826)	CBM3+GH9
RXE58163.1	GH9(30-453)	CBM3+GH9
RXE58209.1	GH16_21(41-241)	GH16_21
RXE58289.1	PL1(87-259)+CBM35(426-547)	CBM35+PL1
RXE58290.1	CE8(36-320)	CE8
RXE58291.1	CE1(58-275)+CBM6(302-419)+GH10(525-837)	CBM6+CE1+GH10
RXE58351.1	cohesin(41-194)+cohesin(217-371)+cohesin(414-569)+cohesin(610-764)+cohesin(802-958)+cohesin(973-1129)	CBM3
RXE58375.1	CE12(182-377)+CBM35(481-602)+CE12(621-819)	CBM35+CE12
RXE58429.1	CE3(36-224)	CE3
RXE58433.1	GH5_8(41-287)+GH5_4(379-652)+CE2(903-1105)	CE2+GH5_4
RXE58508.1	GH2(46-615)+CBM6(823-944)	CBM6+GH2
RXE58509.1	GH43_29(26-308)+CBM6(330-451)	CBM6+GH43_29
RXE58510.1	GH141(42-591)+CBM6(775-894)	CBM6+GH141
RXE58511.1	CE1(58-276)+CBM6(303-423)	CBM6+CE1
RXE58512.1	GH43_10(38-291)+CBM6(529-648)	CBM6+GH43_10

Gen ID	HMMER	DIAMOND
RXE58513.1	GH5_34(66-303)+CBM6(374-509)+GH5_34(516-648)+CBM62(738-870)	CBM13+CBM62+CBM6+GH5_34
RXE58657.1	SLH(88-129)+SLH(149-190)+CBM54(194-305)+GH16_3(437-676)+CBM4(702-841)+CBM4(877-1008)+CBM4(1032-1155)+CBM4(1183-1316)	CBM4+CBM54+GH16_3
RXE58923.1	CBM6(95-219)	CBM6
RXE58960.1	CBM22(37-163)+GH10(198-543)	CBM22+GH10
RXE58993.1	GH30_8(33-376)+CBM6(436-553)	CBM6+GH30_8
RXE59018.1	GH3(102-327)	GH3
RXE59061.1	GH48(59-679)+CBM3(780-861)	CBM3+GH48
RXE59085.1	GH9(51-471)	CBM3+GH9
RXE59088.1	GH9(77-509)+CBM3(535-617)+CBM3(744-825)	CBM3+GH9
RXE59096.1	CBM35(50-163)+GH26(180-506)	CBM35+GH26
RXE59234.1	PL1_5(92-283)+PL9_1(652-920)	CBM35+PL1_5+PL9_1
RXE59263.1	GH5_1(211-546)	CBM3+GH5_1
RXE59269.1	GH30_5(33-467)+CBM42(481-612)+GH43_20(639-886)	CBM42+GH30_5+GH43_20
RXE59270.1	CBM35(442-571)+CBM35(581-715)	CBM35+GH39
RXE59309.1	GH48(40-656)	GH48
RXE59509.1	CBM35(111-232)+PL11(264-827)	CBM35+PL11_1
RXE59530.1	GH8(62-383)	GH8
RXE59531.1	GH18(33-395)	GH18
RXE59535.1	GH9(31-450)	GH9
RXE59581.1	GH3(134-362)	GH3
RXE59664.1	GH5_55(40-287)+CBM32(355-465)	CBM32+GH5_55
RXE59666.1	GH9(139-569)	GH9
RXE59749.1	CBM22(37-163)+GH10(197-538)+CBM22(570-699)+CE1(842-1077)	CBM22+CE1+GH10
RXE59882.1	GH5_8(217-463)	CBM13+CBM32+GH5_8
RXE60051.1	GH43_16(31-315)+CBM6(337-459)+CBM6(510-617)	CBM6+GH43_16
RXE60086.1	cohesin(33-189)	CBM9+GH30
RXE60113.1	GH81(51-681)	GH81

Gen ID	HMMER	DIAMOND
RXE60146.1	CBM30(212-302)+GH9(316-749)+GH44(790-1298)+CBM44(1387-1449)	CBM30+CBM44+GH44+GH9
RXE60211.1	GH9(31-461)+CBM3(485-570)	CBM3+GH9
RXE60218.1	GH5_1(51-412)	GH5_1
RXE60294.1	GH9(41-511)	CBM3+GH9
RXE60312.1	CBM4(45-181)+GH9(311-808)	CBM3+CBM4+GH9
RXE60313.1	CBM4(42-179)+GH9(309-806)	CBM4+GH9
RXE60320.1	GH5_1(48-388)	GH5_1
RXE60348.1	GH9(30-462)+CBM3(491-571)	CBM3+GH9
RXE60716.1	GH26(102-285)+GH5_25(356-603)+CBM11(665-824)	CBM11+GH26+GH5_25
RXE60764.1	GH53(36-329)	GH53
RXE60766.1	GH74(91-202)+GH74(229-353)+GH74(570-696)	GH74

ID, Identifikationsnummer

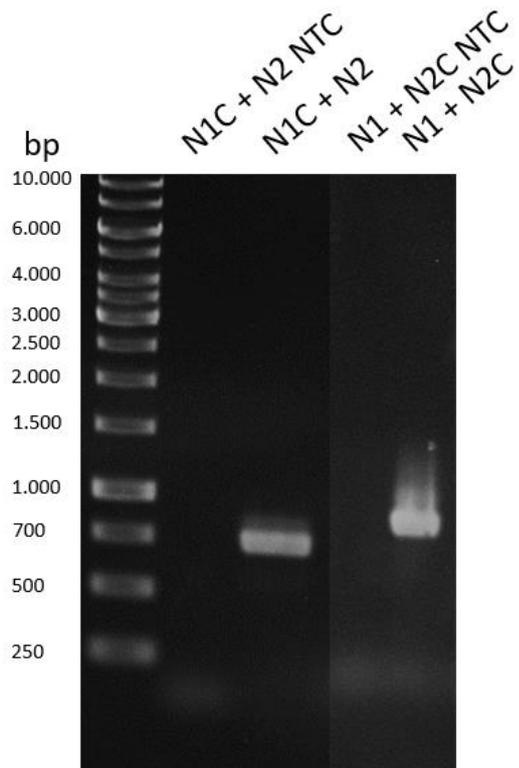


Abb. A 3: Genomschließung MD1 nach Luca Di Bello (Bachelorarbeit). Die PCR wurde mit gDNA von MD1 und den Primerkombinationen N1c + N2 und N2c + N1 durchgeführt. Die Agarosegel-Elektrophorese wurde mit 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer bei 100 V für 40 min durchgeführt, für 10 min in 0,1% (v/v) Ethidiumbromid gefärbt und am Alphaimager aufgenommen. Als Marker wurden 3 µl GeneRuler 1 kb verwendet.

Tab. A 5: Komplette Kohlenhydrat-Stoffwechselwege, identifiziert über KEGG Pathway Analyse, von MD1.

Kohlenhydrat-Stoffwechselweg	Zugeordnete Proteine
Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate	MBB2182420.1, MBB2184175.1, MBB2184168.1, MBB2184011.1, MBB2182421.1, MBB2184112.1, MBB2184127.1, MBB2182552.1, MBB2182422.1, MBB2181334.1, MBB2182423.1, MBB2181576.1, MBB2181522.1, MBB2184419.1
Glycolysis, core module involving three-carbon compounds	MBB2182420.1, MBB2184011.1, MBB2182421.1, MBB2182552.1, MBB2182422.1, MBB2182423.1, MBB2181576.1
Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	MBB2182317.1, MBB2183146.1, MBB2184669.1
Citrate cycle, first carbon oxidation, oxaloacetate => 2-oxoglutarate	MBB2182598.1, MBB2183657.1, MBB2182719.1, MBB2183039.1, MBB2182597.1
Pentose phosphate pathway, non-oxidative phase, fructose 6P => ribose 5P	MBB2184365.1, MBB2184366.1, MBB2184725.1, MBB2184726.1, MBB2182700.1, MBB2184367.1, MBB2184547.1
PRPP biosynthesis, ribose 5P => PRPP	MBB2181397.1
D-Glucuronate degradation, D-glucuronate => pyruvate + D-glyceraldehyde 3P	MBB2184380.1, MBB2183042.1, MBB2184596.1, MBB2183921.1, MBB2184125.1
Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P	MBB2184125.1, MBB2183832.1, MBB2181677.1, MBB2184709.1, MBB2183879.1
Glycogen biosynthesis, glucose-1P => glycogen/starch	MBB2184398.1, MBB2184395.1, MBB2184396.1, MBB2184397.1
Glycogen degradation, glycogen => glucose-6P	MBB2182560.1, MBB2184350.1, MBB2182559.1, MBB2184341.1, MBB2184303.1
Nucleotide sugar biosynthesis, galactose	MBB2181676.1, MBB2183832.1

Tab. A 6: Intrazelluläre GH Familien von MD1, annotiert über dbCAN2 (Zhang et al. 2018a).

GH Familie	Anzahl	Protein IDs
GH1	1	MBB2181413.1
GH2	7	MBB2183265.1, MBB2182667.1, MBB2182721.1, MBB2182726.1, MBB2183975.1, MBB2184042.1, MBB2184430.1
GH3	3	MBB2181667.1, MBB2182445.1, MBB2184382.1
GH5	2	MBB2181415.1, MBB2182371.1
GH8	1	MBB2182443.1
GH10	1	MBB2181858.1
GH13	3	MBB2184341.1, MBB2184398.1, MBB2183904.1
GH18	2	MBB2184551.1, MBB2182544.1
GH26	1	MBB2184056.1
GH27	3	MBB2183838.1, MBB2183841.1, MBB2184053.1
GH29	1	MBB2183780.1
GH30	1	MBB2184045.1
GH31	4	MBB2183195.1, MBB2183845.1, MBB2183865.1, MBB2183927.1
GH36	2	MBB2182669.1, MBB2184035.1
GH39	2	MBB2183359.1, MBB2183616.1

GH Familie	Anzahl	Protein IDs
GH43	6	MBB2183218.1, MBB2182454.1, MBB2184384.1, MBB2182533.1, MBB2183300.1, MBB2183383.1
GH51	5	MBB2183823.1, MBB2183837.1, MBB2183851.1, MBB2183863.1, MBB2184648.1
GH67	1	MBB2184381.1
GH77	1	MBB2182559.1
GH94	4	MBB2181638.1, MBB2182068.1, MBB2182408.1, MBB2184044.1
GH95	2	MBB2183201.1, MBB2183869.1
GH120	2	MBB2183474.1, MBB2184370.1
GH126	1	MBB2184327.1
GH127	1	MBB2183936.1
GH130	3	MBB2184055.1, MBB2184067.1, MBB2184126.1
GH146	1	MBB2183397.1
GH161	1	MBB2184046.1

ID, Identifikationsnummer

Tab. A 7: Relative Abundanz dominierender 16S rRNA OTUs in cellulolytischen Mischisolaten und deren BLASTN Ergebnis nach Abgleich mit der NCBI Datenbank, Stand 2018 nach Rettenmaier et al. (2019a). Die Roh-Daten der 16S rRNA Amplikonsequenzierung sind öffentlich zugänglich bei NCBI unter der Identifikationsnummer RJNA516126.

Isolat	Medium	#OTU	relative Abundanz [%]	BLASTN Ergebnis (NCBI Datenbank)
QR3	GS2	OTU_4	49,70	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
		OTU_3	36,63	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>
		OTU_16	9,44	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>
		OTU_373	3,67	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
MN3	GS2	OTU_4	56,66	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
		OTU_3	37,66	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>
		OTU_373	5,67	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
MN2	GR20	OTU_7	52,07	[Clostridium] <i>thermosuccinogenes</i>
		OTU_4	23,40	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
		OTU_3	21,24	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>
T4	GS2.5GR	OTU_4	84,89	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
		OTU_15	8,33	<i>Clostridium thermocellum</i>
		OTU_373	6,39	<i>Defluviitalea raffinosedens</i>
O45	GS2	OTU_3	69,07	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>
		OTU_7	16,63	[Clostridium] <i>thermosuccinogenes</i>
		OTU_15	14,30	<i>Clostridium thermocellum</i>

#, Nummer

Tab. A 8: Relative Abundanz von *Defluviitalea* Spezies im DNA und cDNA der Fermenterbetriebe 2017-2018 nach Rettenmaier et al. (2020c).

Probe	Nukleinsäure	relative Anzahl an Reads OTU66	Gesamtzahl an Reads	Relative Abundanz [%]
M1_stabil	DNA	0	36.061	-
M2_stabil	DNA	0	42.433	-
M1_acidifiziert	DNA	2	39.518	-
M2_acidifiziert	DNA	0	40.029	-
T1_stabil	DNA	7	36.076	0,019
T2_stabil	DNA	1	36.211	0,003
T1_hoch effizient	DNA	80	42.417	0,189
T2_hoch effizient	DNA	199	31.044	0,641
M1_stabil	cDNA	0	27.054	-
M2_stabil	cDNA	0	18.571	-
M1_acidifiziert	cDNA	0	17.775	-
M2_acidifiziert	cDNA	0	34.050	-
T1_stabil	cDNA	144	24.340	0,592
T2_stabil	cDNA	0	33.053	-
T1_hoch effizient	cDNA	109	31.362	0,348
T2_hoch effizient	cDNA	386	29.471	1,310

Die Daten wurden in Kooperation mit Bernhard Munk, LFL-AQU, Freising Deutschland, erstellt.

Tab. A 9: Extrazelluläre GHs von MA18^T annotiert via dbCAN2 (Zhang et al. 2018a).

Gene ID	HMMER	DIAMOND
lcl CP061336.1_prot_QNU65257.1_1922	CBM61(129-274)+GH53(289-645)	CBM61+GH53
lcl CP061336.1_prot_QNU65467.1_2148	GH30(26-456)	GH30
lcl CP061336.1_prot_QNU65468.1_2149	GH9(50-471)+CBM3(514-584)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU65476.1_2157	CBM22(41-156)+CBM22(203-334)+CBM22(357-488)+GH10(516-879)+CBM9(908-1042)+CBM9(1058-1232)	CBM22+CBM9+GH10
lcl CP061336.1_prot_QNU65773.1_2486	CBM9(238-407)+CE1(531-794)	CBM9+CE1
lcl CP061336.1_prot_QNU65790.1_2507	GH9(136-563)	GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU65822.1_2548	CBM3(2864-2950)	CBM3
lcl CP061336.1_prot_QNU65849.1_2577	CBM6(345-485)	CBM13
lcl CP061336.1_prot_QNU65850.1_2578	GH141(43-590)+CBM6(761-880)	CBM6+GH141
lcl CP061336.1_prot_QNU65851.1_2579	GH43_29(26-296)+CBM6(318-439)	CBM6+GH43_29
lcl CP061336.1_prot_QNU65955.1_2697	GH5_4(70-372)+CBM2(434-510)	CBM3+GH5_4
lcl CP061336.1_prot_QNU66059.1_2812	GH5_1(53-414)	GH5_1
lcl CP061336.1_prot_QNU66060.1_2813	CBM35(73-162)+GH26(180-493)	CBM35+GH26
lcl CP061336.1_prot_QNU66061.1_2814	GH9(41-512)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU66062.1_2815	GH9(41-512)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU66064.1_2817	GH5_55(42-289)+CBM32(356-467)	CBM32+GH5_55
lcl CP061336.1_prot_QNU66065.1_2818	GH5_4(79-366)	GH5_4
lcl CP061336.1_prot_QNU66095.1_2850	GH10(50-358)	GH10+GH11
lcl CP061336.1_prot_QNU66099.1_2854	GH18(47-408)+GH8(525-897)	GH18
lcl CP061336.1_prot_QNU66140.1_2901	GH146(46-552)+CBM6(658-779)	CBM22+GH146
lcl CP061336.1_prot_QNU66647.1_3464	CBM54(193-304)	CBM54
lcl CP061336.1_prot_QNU66651.1_3469	GH115(36-691)+CBM6(1014-1135)	GH115
lcl CP061336.1_prot_QNU66653.1_3474	GH95(71-793)+CBM32(826-951)+CBM6(971-1092)	CBM32+CBM6+GH95
lcl CP061336.1_prot_QNU66654.1_3475	GH62(52-294)+CBM6(350-472)	CBM6+GH62
lcl CP061336.1_prot_QNU66655.1_3476	GH30_8(42-386)+CBM6(443-566)	CBM6+GH30_8
lcl CP061336.1_prot_QNU66656.1_3477	GH27(136-314)+CBM6(410-533)	CBM6+GH27

Gene ID	HMMER	DIAMOND
lcl CP061336.1_prot_QNU66657.1_3478	GH59(46-774)+CBM6(925-1046)	CBM6+GH59
lcl CP061336.1_prot_QNU66658.1_3479	GH43_29(26-307)+CBM6(330-451)+CBM6(464-588)	CBM6+GH43_29
lcl CP061336.1_prot_QNU66659.1_3480	GH10(37-321)+CBM6(346-468)	CBM6+GH10
lcl CP061336.1_prot_QNU66660.1_3481	GH43_10(44-298)+CBM6(528-652)	CBM6+GH43_10
lcl CP061336.1_prot_QNU67288.1_338	CBM3(40-128)+cohesin(286-413)+cohesin(432-560)+cohesin(578-706)+cohesin(724-852)+cohesin(870-998)+cohesin(1016-1144)+cohesin(1162-1289)+cohesin(1395-1521)+CBM3(1634-1724)+cohesin(1884-2010)+cohesin(2028-2156)+cohesin(2172-2299)+cohesin(2409-2537)+cohesin(2645-2773)+cohesin(2793-2922)	CBM3
lcl CP061336.1_prot_QNU67289.1_339	GH48(43-658)	GH48
lcl CP061336.1_prot_QNU67290.1_341	GH9(37-467)+CBM3(495-579)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU67291.1_342	CBM4(41-173)+GH9(300-785)	CBM4+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU67293.1_344	GH9(36-490)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU67294.1_346	GH9(35-454)	GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU67295.1_347	GH8(85-398)	GH8
lcl CP061336.1_prot_QNU67297.1_350	CBM4(36-164)+GH9(291-771)	CBM4+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU67298.1_352	GH5_1(49-419)	GH5_1
lcl CP061336.1_prot_QNU67299.1_353	CBM3(35-124)+cohesin(283-410)+cohesin(514-644)+cohesin(746-875)+cohesin(979-1108)+cohesin(1213-1339)+cohesin(1709-1833)	CBM3
lcl CP061336.1_prot_QNU67300.1_354	GH48(39-650)	GH48
lcl CP061336.1_prot_QNU67301.1_356	CBM3(38-124)+cohesin(282-395)+cohesin(514-630)+cohesin(739-867)+cohesin(883-1010)+cohesin(1203-1333)+cohesin(1347-1474)+cohesin(1755-1883)	CBM3
lcl CP061336.1_prot_QNU67302.1_357	CBM3(38-124)+cohesin(282-393)+cohesin(514-641)+cohesin(745-874)+cohesin(889-1017)+cohesin(1211-1339)	CBM3
lcl CP061336.1_prot_QNU67473.1_549	GH27(141-313)	GH27

Gene ID	HMMER	DIAMOND
lcl CP061336.1_prot_QNU67529.1_610	GH74(88-200)+GH74(629-741)	GH74
lcl CP061336.1_prot_QNU67685.1_821	GH5_25(51-298)+CBM11(360-518)	CBM11+GH5_25
lcl CP061336.1_prot_QNU67689.1_825	CBM9(66-235)+CE1(354-598)	CBM9+CE1
lcl CP061336.1_prot_QNU67698.1_839	GH10(42-344)	GH10
lcl CP061336.1_prot_QNU67700.1_841	GH11(39-221)+CBM6(256-372)+CE4(468-577)	CBM6+CE4+GH11
lcl CP061336.1_prot_QNU67712.1_855	GH43_24(58-305)+GH16_5(368-590)	CBM13+GH43_24
lcl CP061336.1_prot_QNU67895.1_1056	GH9(147-584)	GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU68135.1_1324	GH9(34-455)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU68136.1_1325	GH9(58-540)+CBM3(744-823)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU68137.1_1326	GH9(71-549)+CBM3(576-664)+CBM3(755-831)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU68140.1_1329	GH18(28-331)	GH18
lcl CP061336.1_prot_QNU68428.1_1652	CBM6(38-159)	CE0
lcl CP061336.1_prot_QNU68623.1_1864	CBM2(69-159)+CBM2(178-270)	CBM2
lcl CP061336.1_prot_QNU68648.1_1891	CBM35(54-163)+GH26(180-504)	CBM35+GH26
lcl CP061336.1_prot_QNU68671.1_1917	GH43_22(495-692)+GH43_26(1035-1355)	GH43_22+GH43_26+GH43_34
lcl CP061336.1_prot_QNU68673.1_1919	GH43_16(31-313)+CBM6(335-456)	CBM6+GH43_16
lcl CP061336.1_prot_QNU68702.1_340	GH8(65-384)	GH8
lcl CP061336.1_prot_QNU68703.1_345	GH9(41-516)+CBM3(542-633)	CBM3+GH9
lcl CP061336.1_prot_QNU68763.1_1073	GH44(32-538)+CBM44(633-694)	CBM44+GH44
lcl CP061336.1_prot_QNU68902.1_2880	CBM30(211-299)+GH9(316-750)	CBM30+GH9

Fett markiert, GHs im cellulosomal Gencluster , siehe auch Abb. 26. ID, Identifikationsnummer

Tab. A 10: CAZymes annotiert via dbCAN2 von *C. sartagoforme* AAU1.

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
R9BRW1	GT5(2-472)	GT5	N
R9BS27	GT35(93-803)	GT35	N
R9BSS7	GT2_Glycos_transf_2(4-124)	GT2	N
R9BT52	CBM48(34-119)+GH13_9(187-487)	CBM48	N
R9BT61	GT2_Glyco_tranf_2_3(84-316)	GT2	N
R9BTI3	GH25(12-208)	GH25	N
R9BUA2	GT4(188-343)	GT4	N
R9BUP3	GH4(9-185)	GH4	N
R9BUP5	GT35(80-752)	GT35	N
R9BV47	GH16(47-300)+CBM4(332-475)+CBM4(508-634)+CBM4(663-791)+CBM4(827-952)	CBM4	Y(1-31)
R9BVE9	GT2_Glyco_tranf_2_3(45-269)	GT2	N
R9BVI9	GH4(6-183)	GH4	N
R9BVX1	GH13_14(180-505)	CBM48	N
R9BVY6	CE9(3-372)	CE9	N
R9BW48	GH88(38-365)	GH88	N
R9BWJ6	GH1(5-464)	GH1	N
R9BY47	GT2_Glycos_transf_2(8-125)	GT2	N
R9BY86	GT28(198-345)	GT28	N
R9BZ61	GT4(192-342)	GT4	N
R9BZI4	GH130(27-325)	GH130	N
R9C091	GT51(9-191)	GT51	N
R9C1S3	CE6(56-147)	CE6	N
R9C5H0	GT4(196-340)	GT4	N
R9C5Q0	GT2_Glycos_transf_2(6-137)	GT2	N
R9C6N0	GH4(1-93)	GH4	N
R9C9E0	GH13_39(715-1150)	CBM20	Y(1-36)
R9CA20	GH13_29(28-372)	GH13_29	N
R9CA37	GH2(115-681)+GH2(879-1256)	CBM51	Y(1-33)
R9CA89	GT2_Glyco_tranf_2_3(49-279)	GT2	N
R9CAH3	GH1(2-462)	GH1	N
R9CB31	GH13_31(28-372)	GH13_31	N
R9CB48	GH1(11-467)	GH1	N
R9CB52	GH4(7-187)	GH4	N
R9CBJ8	GH2(54-934)	GH2	N
R9CBS9	CE4(64-191)	CE4	Y(1-30)
R9CBT0	CBM5(453-493)	CBM5	Y(1-30)
R9CCF2	GH31(228-668)	GH31	N
R9CCH2	GT4(425-516)	GT4	N
R9CCL4	GH18(40-354)	CBM12	Y(1-30)
R9CCT3	GT1(74-355)	GT1	N
R9CD13	GH133(99-456)	GH133	N
R9CD65	GH3(121-354)	GH3	Y(1-30)
R9CDN3	GH13_14(140-460)	CBM48	N
R9CDV9	GH59(52-786)+GH43_24(1312-1679)	GH59	Y(1-35)
R9CE17	GH30_1(36-444)	GH30_1	N
R9CE22	GH92(628-1144)	CBM32	Y(1-30)

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
R9CE34	GH1(2-465)	GH1	N
R9CE48	GH1(7-476)	GH1	N
R9CE80	GH39(477-641)	GH0	N
R9CEP7	GH3(146-371)	GH3	Y(1-28)
R9CER7	GH36(12-710)	GH36	N
R9CES3	GH77(9-489)	GH77	N
R9CF84	GT2_Glycos_transf_2(7-174)	GT2	N
R9CFK7	GH13_19(84-464)	GH13_19	N
R9CFU6	GH1(6-464)	GH1	N
R9CFU7	CBM67(84-263)+GH78(288-831)	GH78	N
R9CFV2	GH1(6-476)	GH1	N
R9CFY3	GH73(472-587)	GH73	Y(1-26)
R9CFZ1	GH1(2-489)	GH1	N
R9CG02	GH1(2-473)	GH1	N
R9CG03	GH3(31-249)	GH3	N
R9CG15	GH53(176-415)	GH0	N
R9CG43	GH85(114-448)+CBM32(812-934)	CBM32	Y(1-32)
R9CG45	GT4(215-360)	GT4	N
R9CGS5	CBM67(101-270)+GH78(303-829)	CBM67	N
R9CH02	GH18(51-457)	CBM5	Y(1-33)
R9CHP0	GT4(199-346)	GT4	N
R9CK11	GH94(47-872)	GH94	N
R9CLQ2	CBM32(255-375)	CBM32	N

ID, Identifikationsnummer

Tab. A 11: CAZymes annotiert via dbCAN2 von R. josui JCM 17888^T.

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
BAV00621.1	GH10(59-325)+CBM6(346-467)	CBM6	N
BAW98157.1	GH43_10(36-300)+CBM6(555-675)	CBM6	Y(1-26)
BBA94051.1	CE1(64-277)+CBM6(300-421)	CBM6	Y(1-35)
BBA94052.1	GH43_22(495-692)+GH43_26(1035-1355)+GH43_34(1470-1755)	GH43_22	Y(1-31)
WP_024831267.1	GH43_16(31-314)+CBM6(336-459)	CBM6	Y(1-29)
WP_024831288.1	GH43_24(46-279)	GH43_24	Y(1-26)
WP_024831304.1	GT2_Glyco_tranf_2_3(98-322)	GT2	N
WP_024831451.1	GH53(115-402)	GH53	Y(1-34)
WP_024831486.1	CE2(226-430)	CE2	Y(1-44)
WP_024831565.1	GT35(124-650)	GT35	N
WP_024831663.1	GT5(5-477)	GT5	N
WP_024831690.1	GT2_Glycos_transf_2(7-167)	GT2	N
WP_024831697.1	GH8(77-398)	GH8	Y(1-26)
WP_024831717.1	GH39(12-436)	GH39	N
WP_024831718.1	GH43_10(4-275)	GH43_10	N
WP_024831720.1	GH51(4-491)	GH51	N
WP_024831726.1	GH9(30-451)	CBM3	Y(1-25)
WP_024831732.1	PL11(30-613)	PL11_1	Y(1-28)
WP_024831733.1	CE8(35-328)	CE8	N
WP_024831734.1	PL10_1(68-337)	PL10_1	Y(1-35)

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
WP_024831738.1	GH30_8(35-379)+CBM6(437-556)	CBM6	Y(1-33)
WP_024831739.1	CE1(58-270)+CBM6(296-417)	CBM6	Y(1-29)
WP_024831740.1	GH95(75-797)+CBM32(830-954)+CBM6(973-1093)	CBM32	Y(1-36)
WP_024831741.1	GH62(35-294)+CBM6(340-463)+CE6(607-699)	CBM6	Y(1-28)
WP_024831742.1	GH59(46-775)+CBM6(928-1049)	CBM6	Y(1-30)
WP_024831743.1	GH27(135-315)+CBM6(408-529)	CBM6	Y(1-34)
WP_024831744.1	GH43_29(26-297)+CBM6(318-441)	CBM6	Y(1-25)
WP_024831745.1	GH43_10(36-300)+CBM6(555-675)	CBM6	Y(1-26)
WP_024831746.1	CE1(64-277)+CBM6(300-421)	CBM6	Y(1-35)
WP_024831747.1	GH43_29(26-307)+CBM6(330-452)	CBM6	Y(1-25)
WP_024831748.1	GH10(59-325)+CBM6(346-467)	CBM6	Y(1-40)
WP_024831756.1	GH51(3-500)	GH51	N
WP_024831765.1	CE3(114-300)	CE3	Y(1-34)
WP_024831792.1	GT39(242-467)	GT39	N
WP_024831838.1	GH42(19-393)	GH42	N
WP_024831841.1	GH3(36-255)	GH3	N
WP_024831842.1	GH31(236-664)	GH31	N
WP_024831846.1	GH95(3-744)	GH95	N
WP_024831965.1	GT84(1276-1490)+GH94(1729-2820)	GH94	N
WP_024832026.1	CBM9(249-419)+CE1(543-805)	CBM9	Y(1-27)
WP_024832028.1	GH10(354-777)	GH10	Y(1-33)
WP_024832111.1	GT2_Glycos_transf_2(8-167)	GT2	N
WP_024832255.1	GT51(82-262)	GT51	N
WP_024832263.1	GT4(189-340)	GT4	N
WP_024832271.1	GH18(67-385)	GH18	Y(1-31)
WP_024832306.1	GT26(56-226)	GT26	N
WP_024832326.1	GH11(44-218)+CBM6(271-369)+CE4(394-515)	CBM6	Y(1-31)
WP_024832418.1	GT1(39-390)	GT1	N
WP_024832457.1	GT2_Glycos_transf_2(5-148)	GT2	N
WP_024832602.1	GH3(126-349)	GH3	Y(1-32)
WP_024832605.1	GH94(2-820)	GH94	N
WP_024832626.1	GH4(3-185)	GH4	N
WP_024832638.1	GH43_12(11-295)	GH43_12	N
WP_024832645.1	GT23(5-308)	GT0	N
WP_024832646.1	GT23(3-298)	GT0	N
WP_024832647.1	GT23(3-331)	GT0	N
WP_024832652.1	GT23(101-264)	GT0	N
WP_024832655.1	GT2_Glycos_transf_2(5-162)	GT2	N
WP_024832666.1	CBM9(151-320)+CE1(438-683)	CBM9	Y(1-34)
WP_024832715.1	CBM50(475-517)	CBM50	N
WP_024832727.1	GT28(203-355)	GT28	N
WP_024832748.1	CBM48(128-213)+GH13_9(286-586)	CBM48	N
WP_024832821.1	GH67(12-690)	GH67	N
WP_024832835.1	GH2(36-900)	GH2	N
WP_024832884.1	GH3(39-279)	GH3	N
WP_024832888.1	CE7(4-315)	CE7	N
WP_024832920.1	GH9(43-464)+CBM3(508-576)	CBM3	Y(1-32)

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
WP_024832963.1	CBM54(192-305)	CBM54	Y(1-27)
WP_024832982.1	CE4(104-206)	CE4	Y(1-31)
WP_024833023.1	GT2_Glyco_tranf_2_3(51-275)	GT2	N
WP_024833024.1	GH15(265-633)	GH15	N
WP_024833061.1	GH1(2-446)	GH1	N
WP_024833066.1	GH5_55(39-286)+CBM32(350-464)	CBM32	Y(1-24)
WP_024833132.1	GH146(45-551)+CBM6(657-778)	CBM22	Y(1-33)
WP_024833186.1	GH5_25(51-298)+CBM11(360-518)	CBM11	Y(1-57)
WP_024833187.1	CE1(71-317)	CE1	Y(1-27)
WP_024833189.1	GH10(42-345)	GH10	Y(1-30)
WP_024833259.1	GH43_1(10-319)	GH43_1	N
WP_024833272.1	GH141(42-588)+CBM6(761-881)	CBM6	Y(1-37)
WP_024833346.1	GH5_4(78-365)	GH5_4	Y(1-26)
WP_024833367.1	GH18(111-407)	CBM50	N
WP_024833394.1	GH3(106-291)	GH3	N
WP_024833403.1	GH8(55-367)	GH8	N
WP_024833479.1	GH74(88-200)+GH74(629-740)	GH74	Y(1-31)
WP_024833500.1	GH5_1(49-410)	GH5_1	Y(1-28)
WP_024833509.1	GT1(189-395)	GT1	N
WP_024833511.1	GT1(71-394)	GT1	N
WP_024833512.1	CBM22(35-157)+CBM22(197-329)+GH10(360-691)+CBM9(719-891)+SLH(928-969)	CBM22	Y(1-30)
WP_024833537.1	GH133(292-646)	GH133	N
WP_024833593.1	GH9(144-582)	GH9	Y(1-31)
WP_024833660.1	GH8(129-502)	GH8	N
WP_024833667.1	GH94(2-781)	GH94	N
WP_024833750.1	PL11_2(39-627)	PL11_2	Y(1-22)
WP_024833878.1	GH44(35-542)+CBM44(632-693)	CBM44	Y(1-35)
WP_024833940.1	GT28(190-349)	GT28	N
WP_024833942.1	GT28(204-350)	GT28	N
WP_024833960.1	CE15(126-456)	CE15	Y(1-22)
WP_024834090.1	GT5(9-480)	GT5	N
WP_024834249.1	GT2_Glycos_transf_2(8-120)	GT2	N
WP_024834252.1	GT2_Glycos_transf_2(5-125)	GT2	N
WP_024834296.1	GT4(205-356)	GT4	N
WP_024834384.1	CBM30(211-299)+GH9(316-750)	CBM30	Y(1-32)
WP_024834442.1	GH9(53-535)+CBM3(562-650)+CBM3(739-819)	CBM3	Y(1-34)
WP_024834469.1	GH9(119-550)	CBM9	N
WP_024834488.1	GH43_22(495-692)+GH43_26(1035-1355)+GH43_34(1470-1755)	GH43_22	Y(1-31)
WP_024834501.1	GH5_2(66-320)+CBM17(353-556)+CBM28(566-751)	CBM17	Y(1-30)
WP_024834543.1	CBM35(40-164)+GH26(180-506)	CBM35	Y(1-32)
WP_024834544.1	GH18(31-390)	GH18	Y(1-28)
WP_024834545.1	GH120(312-402)	GH120	N
WP_024834576.1	GH9(144-570)	GH9	N
WP_024834577.1	GH9(40-511)	CBM3	Y(1-35)
WP_024834578.1	GH26(181-494)	CBM35	Y(1-25)
WP_024834580.1	GH11(39-221)	GH11	Y(1-27)

Gene ID	HMMER	DIAMOND	Signalp
WP_024834586.1	GH5_1(48-417)	GH5_1	Y(1-30)
WP_024834587.1	GH9(35-454)	GH9	Y(1-31)
WP_024834588.1	GH5_17(111-401)	GH5_17	Y(1-26)
WP_024834589.1	GH9(39-512)+CBM3(538-630)	CBM3	Y(1-32)
WP_024834590.1	GH9(37-491)	CBM3	N
WP_024834592.1	CBM4(34-168)+GH9(310-799)	CBM4	Y(1-29)
WP_024834593.1	GH9(40-469)+CBM3(498-581)	CBM3	Y(1-36)
WP_024834594.1	GH8(65-384)	GH8	Y(1-33)
WP_024834595.1	GH48(38-653)	GH48	Y(1-30)
WP_024834596.1	CBM3(36-124)+cohesin(288-416)+cohesin(433-561)+cohesin(581-709)+cohesin(729-857)+cohesin(877-1005)+cohesin(1025-1154)	CBM3	Y(1-28)
WP_024834672.1	GH30(27-456)	GH30	Y(1-29)
WP_024834674.1	CBM6(359-482)	CBM13	Y(1-24)
WP_024834678.1	GH18(37-333)	GH18	Y(1-24)
WP_024834748.1	CE4(117-237)	CE4	N
WP_034847137.1	CBM13(110-287)	CBM13	Y(1-32)
WP_034847442.1	GH23(127-236)	GH23	N
WP_034847451.1	GH43_35(9-311)	GH43_35	N
WP_034847546.1	PL1_5(91-280)+PL9_1(464-735)	PL1_5	Y(1-31)
WP_051461034.1	CE4(53-173)	CE4	N
WP_051461072.1	GT2_Glycos_transf_2(1-137)	GT2	N
WP_051461074.1	GH9(49-527)+CBM3(730-810)	CBM3	Y(1-21)
WP_054749610.1	GH8(65-386)	GH8	N
WP_054750008.1	GH43_29(26-307)+CBM6(330-452)	CBM6	Y(1-25)
WP_054750023.1	GH10(86-509)	GH10	N
WP_054750070.1	GH5_4(67-354)	GH5_4	N
WP_081741804.1	GH3(127-349)	GH3	N
WP_081741834.1	GH43_4(93-414)	CBM42	N
WP_117385193.1	GH10(80-358)	GH10	N
WP_159413171.1	CBM6(40-137)+CE4(162-283)	CBM6	N

ID, Identifikationsnummer

Tab. A 12: Zusammenfassung abgebildeter Genera in der GH48-Datenbank nach Rettenmaier et al. (2020b).

Genus	Anzahl Einträge	Genus	Anzahl Einträge	Genus	Anzahl Einträge
<i>Acidothermus</i>	1	<i>Gorillibacterium</i>	2	<i>Paenibacillus</i>	93
<i>Actinoalloteichus</i>	7	<i>Hahella</i>	2	<i>Persicobacter</i>	1
<i>Actinobacteria</i>	5	<i>Herbidospora</i>	12	<i>Phytoactinopolyspora</i>	1
<i>Actinomadura</i>	7	<i>Herbinix</i>	3	<i>Plantactinospora</i>	4
<i>Actinophytocola</i>	1	<i>Herpetosiphon</i>	3	<i>Polyangium</i>	1
<i>Actinoplanes</i>	16	<i>Hungateiclostridium</i>	14	<i>Prauserella</i>	1
<i>Actinospica</i>	1	<i>Isoptericola</i>	2	<i>Promicromonospora</i>	3
<i>Actinosynnema</i>	3	<i>Janthinobacterium</i>	1	<i>Pseudosporangium</i>	1
<i>Allonocardiopsis</i>	1	<i>Jishengella</i>	3	<i>Reichenbachiella</i>	1
<i>Amycolatopsis</i>	16	<i>Jonesia</i>	2	<i>Rhizobacter</i>	1
<i>Anaerobacterium</i>	1	<i>Kibdelosporangium</i>	1	<i>Roseateles</i>	2
<i>Aquimarina</i>	12	<i>Kitasatospora</i>	12	<i>Ruminiclostridium</i>	2
<i>Ardenticatena</i>	1	<i>Kribbella</i>	1	<i>Ruminococcaceae</i>	1
<i>Asanoa</i>	3	<i>Kutzneria</i>	2	<i>Ruminococcus</i>	3
<i>Azotobacter</i>	1	<i>Labilibacter</i>	1	<i>Saccharothrix</i>	8
<i>Bacillus</i>	38	<i>Labilibaculum</i>	1	<i>Salinispora</i>	4
<i>Bacteroides</i>	2	<i>Lachnoclostridium</i>	2	<i>Sanguibacter</i>	1
<i>Caldicellulosiruptor</i>	18	<i>Lachnospiraceae</i>	1	<i>Sphaerisporangium</i>	1
<i>Catellatospora</i>	2	<i>Lachnotalea</i>	1	<i>Streptacidiphilus</i>	6
<i>Catenulispora</i>	1	<i>Lechevalieria</i>	6	<i>Streptomonospora</i>	1
<i>Catenuloplanes</i>	1	<i>Lentzea</i>	11	<i>Streptomyces</i>	382
<i>Cellulomonas</i>	16	<i>Mahella</i>	1	<i>Streptosporangium</i>	6
<i>Cellulosimicrobium</i>	2	<i>Marinateneraspora</i>	3	<i>Tenacibaculum</i>	2
<i>Cellvibrionaceae</i>	1	<i>Martellella</i>	1	<i>Thermoactinospora</i>	1
<i>Clostridium</i>	27	<i>Massilia</i>	1	<i>Thermobifida</i>	4
<i>Cohnella</i>	1	<i>Methylibium</i>	1	<i>Thermobispora</i>	1
<i>Crossiella</i>	1	<i>Microbispora</i>	4	<i>Thermoclostridium</i>	4
<i>Cystobacter</i>	1	<i>Micromonospora</i>	74	<i>Thermogemmatispora</i>	3
<i>Dactylosporangium</i>	1	<i>Micromonosporaceae</i>	2	<i>Thermosporothrix</i>	1
<i>Flammeovirga</i>	5	<i>Minicystis</i>	1	<i>Thermostaphylospora</i>	1
<i>Flavivirga</i>	1	<i>Myceligenerans</i>	1	<i>Umezawaea</i>	1
<i>Fontibacillus</i>	1	<i>Nocardia</i>	1	<i>Verrucosispora</i>	5
<i>Geofilum</i>	1	<i>Nocardiopsis</i>	9	<i>Vitiosangium</i>	1
<i>Glycomyces</i>	7	<i>Nonomuraea</i>	8	<i>Xiangella</i>	1
				<i>Xylanimonas</i>	1

Tab. A 13: Details der Probennahmen des Fermenterbetriebes 2019

ID	Fermenter-zustand	Datum der Probennahme	Raumbelastung [kg _{OTS} /m ³ *d]	Datum der <i>in sacco</i> Einbringung	Raumbelastung [kg _{OTS} /m ³ *d]
MS1	mesophil-stabil / ineffizient	13.03.19	2,75	08.03.2019	2,00
MS2	mesophil-stabil	13.05.19	4,00	08.05.2019	4,00
MS3	mesophil-stabil	12.07.19	5,50	07.07.2019	5,50
MI	mesophil-instabil	07.08.19	0,00	02.08.2019	0,00
TS	thermophil-stabil	02.05.19	1,25	27.04.2019	1,25
TI	thermophil-instabil	12.07.19	18,00	07.07.2009	4,00

OTS, organische Trocken-Substanz

Die Probennahmen erfolgten im Rahmen der Masterarbeit von Schmidt (2019).

Weitere Prozessparameter der Biogasfermenter wurden am LFL-ILT dokumentiert.

Tab. A 14: Probenahme-Zeitpunkte der Nukleinsäure-Extraktionen durchgeführt durch Bernhard Munk, LfL.

Probe	Nukleinsäure	Datum
Ms_PN2	DNA	09.04.2019
Ms_PN14_1	DNA	11.04.2019
Ms_PN14_2	DNA	11.04.2019
Mi_PN2	DNA	29.07.2019
Mi_PN19_1	DNA	01.08.2019
Mi_PN19_2	DNA	01.08.2019
Ts_PN2	DNA	25.06.2019
Ts_PN8_1	DNA	26.06.2019
Ts_PN8_2	DNA	26.06.2019
Ti_PN2	DNA	23.07.2019
Ti_PN8/9_1	DNA	24.07.2019
Ti_PN8/9_2	DNA	24.07.2019
Ms_PN3	RNA	09.04.2019
Ms_PN14_1	RNA	11.04.2019
Ms_PN14_2	RNA	11.04.2019
Mi_PN3	RNA	29.07.2019
Mi_PN19_1	RNA	01.08.2019
Mi_PN19_2	RNA	01.08.2019
Ts_PN3	RNA	25.06.2019
Ts_PN8_1	RNA	26.06.2019
Ts_PN8_2	RNA	26.06.2019
Ti_PN3	RNA	23.07.2019
Ti_PN8/9_1	RNA	24.07.2019
Ti_PN8/9_2	RNA	24.07.2019

M, mesophil; T, thermophil; S, stabil; I, instabil; PN, Probenahme.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München durchführen zu dürfen und für die hilfreichen Ratschläge während der Zeit am Lehrstuhl.

Ganz besonders möchte ich Dr. Vladimir Zverlov danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner großartigen Arbeitsgruppe an einem interessanten und aktuellen Forschungsthema zu arbeiten. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt und wenn nötig stets Unterstützung gefunden. Vielen Dank für die engagierte Betreuung, das Vertrauen in meine Fähigkeiten und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Björn Andreeßen, Dr. Georg Schmid, Jonathan Herlet, Dr. Matthias Mechelke, Melanie Baudrexl, Dr. Nils Thieme, Patricia Krähe, Dr. Petra Kornberger, Sibylle Schadhauser, Simon Heinze, Dr. Waldemar Hauf und allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für die sehr gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und anregende Diskussionen bei der einen oder anderen Kaffeepause bedanken. Mein Dank gilt zudem Dr. Wolfgang Schwarz für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie Dr. Daniela Köck, die mir als Mentorin einen besonders guten Start in die Promotion ermöglicht hat.

Danken möchte ich auch den Studenten Carina Dürr, Johanna Streubl, Kristina Scheitz, Larissa Schmidt, Luca Di Bello, Marie-Louise Kowollik, Martin Gerbaulet, Martina Schneider und Yat Kei Lo für ihre Beiträge zu meinen Ergebnissen im Rahmen von Master-, Bachelor und Praktikumsarbeiten.

Den Mitgliedern des Modisto Projektteams danke ich für die interessante, teils interdisziplinäre Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich hier die gute Kooperation mit Bernhard Munk und Dr. Michael Lebuhn am Landesamt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, die mir zunächst die akademische Grundausbildung ermöglicht hat, mich durch die Höhen und Tiefen meiner Promotion begleitete und mir wenn nötig den Rücken freihielt.