

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Analyse spezialisierter Bakteriengemeinschaften und deren
cellulolytische Hauptvertreter für die Hydrolyse in thermophilen
Biogasanlagen**

Tanja Köllmeier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 24.07.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.12.2013 angenommen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Biogas als erneuerbarer Energieträger	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Biogasanlagen.....	2
1.1.3 Mikrobiologische Prozesse beim anaeroben Abbau von Biomasse.....	3
1.1.4 Energieträger der 2. Generation: Lignocellulose	5
1.2 Mikroorganismen in Biogasanlagen	7
1.2.1 Übersicht.....	7
1.2.2 Cellulolytische Bakterien: <i>Clostridia</i>	8
1.3 Multienzymkomplexe zur Cellulosehydrolyse: das Cellulosom	10
1.3.1 Allgemeines	10
1.3.2 Das Cellulosom von <i>C. thermocellum</i>	11
1.4 Unkultivierbare Mikroorganismen und Nachweismethoden	12
1.5 Zielsetzung	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Medien.....	15
2.1.1 GS2	15
2.1.2 LB-Medium	15
2.1.3 SOC-Medium.....	16
2.1.4 Gärrestmedium	16
2.2 Substrate	16
2.3 Kits und Verbrauchsmaterialien	17
2.4 Bakterienstämme	18
2.5 Plasmide	18
2.6 Antikörper	19
2.7 Biogasanlagen.....	19
2.8. Analytische Methoden	21
2.8.1. Bestimmung des Substratabbaus	21
2.8.2 Faserstoffanalyse nach van Soest.....	22
2.8.3 Gaschromatographie	23
2.8.4 Gasanalyse	24

Inhaltsverzeichnis

2.9 Mikrobiologische Methoden	24
2.9.1 Anreicherungen.....	24
2.9.2 Vereinzelnung von cellulolytischen Mikroorganismen	25
2.9.3 Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer	25
2.10 Molekularbiologische Methoden	25
2.10.1 Isolierung genomischer DNA	25
2.10.2 Agarosegel-Elektrophorese.....	27
2.10.3 RNA-Extraktion.....	27
2.10.4 DNA-Verdau	28
2.10.5 Reverse Transkription.....	28
2.10.6 Quantifizierung der Gesamt-RNA/DNA-Konzentration	28
2.10.7 PCR.....	28
2.10.8 Aufreinigung des PCR-Produkts.....	34
2.10.9 Polyadenylierung	34
2.10.10 TOPO-TA- und TOPO-XL-Klonierung.....	34
2.10.11 Plasmidisolierung	35
2.10.12 ARDRA	36
2.10.13 EcoR I-Restriktionsverdau.....	37
2.10.14 Sequenzierung.....	37
2.10.15 FISH.....	37
2.11 Proteinbiochemische Methoden	40
2.11.1 Gewinnung von <i>C. saccharobutylicum</i> -Proteinextrakt	40
2.11.2 Proteinextraktion aus Fermenterproben	40
2.11.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford	41
2.11.4 SDS-PAGE	41
2.11.5 Coomassiefärbung	43
2.11.6 Silberfärbung	43
2.12 Immunologische Methoden	43
2.12.1 Dot Blot	44
2.12.2 Western Blot.....	44
2.12.3 ELISA	45
2.13 Bioinformatische Methoden	45
2.13.1 ARB	45
2.13.2 ClustalW	46
2.13.3 BLAST.....	46
2.13.4 DNASIS.....	46
2.13.5 Clone Manager.....	46
2.13.6 BioEdit.....	46
3 ERGEBNISSE	47
3.1 Monitoring-Methoden für Clostridien in Biogasanlagen	47
3.1.1 qPCR.....	47
3.1.2 RT-qPCR	51
3.1.3 FISH	55
3.1.4 Immunologische Nachweismethoden	56
3.2 Medium für cellulolytische Kulturen	58
3.2.1 GR-Medium.....	58

Inhaltsverzeichnis

3.2.2 Medium für Einzelkolonieausstrich auf Platte.....	59
3.3. Cellulolytische Kulturen: Zusammensetzung der Anreicherungen und phylogenetische Einordnung der Isolate	60
3.3.1 Cellulolytische Mischkulturen	60
3.3.2 Reinkulturen	65
3.4 Cellulolytische Clostridien in Biogasanlagen.....	66
3.4.1 Quantifizierung von <i>C. thermocellum</i> , <i>C. stercoarium</i> und CIII-Clostridien mit RT-qPCR.....	66
3.4.2 Analyse der Cluster III-Clostridien.....	68
3.5 Hydrolytisches Potential und optimale Bedingungen für thermophile hydrolytische Kulturen.....	71
3.5.1 Hydrolytisches Potential	71
3.5.2 Optimale Bedingungen für Hydrolyse	74
3.6 Unterschiede der <i>C. thermocellum</i>-Stämme	79
3.6.1 Sequenzvergleiche	79
3.6.2 Physiologische Eigenschaften.....	83
3.7 Inokulationsversuche	87
3.7.1 Labormaßstab	87
3.7.2 Modellfermenter	89
4 DISKUSSION	91
4.1 Nachweismethoden für Bakterien in Biogasanlagen.....	91
4.2 Thermophile, hydrolytische Bakterien für den Abbau lignocellulosereicher Biomasse	97
4.3 Optimale Bedingungen für Hydrolyse und hydrolytisches Potential verschiedener Bakterienkulturen	103
4.4 Charakterisierung verschiedener <i>C. thermocellum</i>-Stämme.....	107
4.5 Potential einer Inokulation.....	110
4.6 Schlussfolgerungen (Verfahrenstechnische Einordnung).....	113
5 ZUSAMMENFASSUNG	115
6 LITERATUR	119
7 ANHANG	131
DANKSAGUNG	149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bestandsentwicklung der Biogasanlagen in Deutschland	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Umsetzung von Biopolymeren zu Methan	4
Abbildung 3: Schema der Verstoffwechslung von Cellulose und Hemmicellulose durch <i>C. thermocellum</i> und <i>C. thermosaccharolyticum</i>	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lignocellulose in pflanzlichen Zellwänden	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des initialen Angriffs der hydrolytischen Enzyme im amorphen und kristallinen Bereich von Cellulose.....	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Cellulosoms, assoziiert an Bakterien-Zelloberfläche	10
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des CipA Proteins aus dem Cellulosom von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung der 16S rDNA	13
Abbildung 9: Substrat 1 und Substrat 2 nach der beschriebenen Vorbehandlung	17
Abbildung 10: 0, 20, 40, 60, 80 und 100 % Filterpapierabbau	22
Abbildung 11: Mit Substrat gefüllte FiberCaps™ und Apparatur zur Fraktionierung (rechts) (aus http://www.severnsaleslabequip.com).....	23
Abbildung 12: Chromatogramm der verwendeten Standards	24
Abbildung 13: Anaerobenflaschen und Gasbeutel für Gasanalyse	24
Abbildung 14: C _T -Werte der Standards in Abhängigkeit vom log ₁₀ der Kopienzahl	32
Abbildung 15: C _T -Werte von drei unabhängigen Plasmidstandard-Verdünnungsreihen, aufgetragen gegen log ₁₀ der in der Probe enthaltenen <i>rrs</i> Kopien.....	47
Abbildung 16: Fluoreszenzanstieg mit genomischer <i>C. thermocellum</i> -DNA, <i>C. stercorarium</i> -DNA oder ddH ₂ O-Wasser im PCR-Ansatz mit <i>C. thermocellum</i> - und <i>C. stercorarium</i> -spezifischen Primern	48
Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse mit <i>C. thermocellum</i> -Primern und <i>C. stercorarium</i> -Primern .	49
Abbildung 18: Anteile der Cluster III-Clostridien, <i>C. thermocellum</i> und <i>C. stercorarium</i> an der Gesamtbakterienzahl in Kultur #10.....	50
Abbildung 19: C _T -Werte der <i>C. thermocellum</i> -16S rDNA-qPCR mit DNA aus Fermenterproben und nach Anreicherung in GR-Medium mit Filterpapier bei 42 und 60 °C.....	51
Abbildung 20: C _T -Werte der RT-qPCR von Fermenterproben mit <i>Bacteria</i> -16S rDNA-Primern mit und ohne Reverse Transkriptase im Ansatz zur Überprüfung des vollständigen DNA-Verdaus.....	52
Abbildung 21: C _T -Werte der 16S rRNA-RT-qPCR mit spezifischen Primern für <i>C. thermocellum</i> und Proben aus zwei thermophilen Biogasanlagen	53
Abbildung 22: <i>C. thermocellum</i> -16S rRNA-Kopienzahlen in Fermentern der Biogasanlage 4	54
Abbildung 23: C _T -Werte der <i>celS</i> -RT-qPCR mit Proben 4HFv, 4HFh, 4MR und 4E aus Biogasanlage 4.....	54
Abbildung 24: FISH mit <i>C. thermocellum</i> -Sonde	55
Abbildung 25: Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung einer vorbehandelten Fermenterprobe mit der <i>C. thermocellum</i> -Sonde.....	55
Abbildung 26: Western Blot mit Antikörpern gegen CelS von <i>C. thermocellum</i>	56
Abbildung 27: Bestimmung der Nachweisgrenze für <i>C. thermocellum</i> -CelS mit Anti-CelS-Antikörpern	57
Abbildung 28: Anti-CelS Western Blot mit Proben aus Hydrolysefermenter Hohenheim.....	57
Abbildung 29: ELISA mit Anti-CelS-Antikörpern	58
Abbildung 30: Substratabbau durch Kultur #10 nach 3 Tagen bei 60 °C mit verschiedenen GR-Anteilen	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Platte mit Höfen (Cellulose-Hydrolyse) und lichtmikroskopische Aufnahme eines <i>C. thermocellum</i> -Isolats mit Cellulosefaser	59
Abbildung 32: Nächste verwandte Bakterien der bei 60 °C und pH 7,4 angereicherten cellulolytischen Kulturen.....	62
Abbildung 33: Nächste verwandte Bakterien der bei pH 5,6 und 60 °C angereicherten cellulolytischen Kulturen.....	63
Abbildung 34: Nächste verwandte Bakterien der bei pH 7,4 und 42 °C angereicherten Kulturen	64
Abbildung 35: Vier der isolierten <i>C. thermocellum</i> -Stämme bei 60 °C und Stamm BC1 bei 60 °C und 67 °C in GS2-Medium.....	66
Abbildung 36: C _T -Werte der RT-qPCR mit Proben aus Biogasanlagen und den <i>C. stercorarium</i> - bzw. <i>C. thermocellum</i> -Primern	67
Abbildung 37: Anteil <i>C. stercorarium</i> an CIII-Clostridien in Fermenterproben	68
Abbildung 38: Anteile CIII-Clostridia an <i>Bacteria</i> in Fermenterproben.....	68
Abbildung 39: Phylogenetisches Dendrogramm der Sequenzen der CIII- <i>rrs</i> -cDNA-Bibliotheken aus Biogasfermentern HuF2, 3F-2 und 55-1ph	70
Abbildung 40: Substratabbau der Mischkulturen #10, BK und LfL sowie von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 nach 1, 3 und 7 Tagen bei 60 °C	71
Abbildung 41: Substratabbau und End-pH der Anreicherung #10 bei 60 °C nach verschiedenen Inkubationszeiten	72
Abbildung 42: Substratabbau von Kulturen aus Biogasanlagen nach 5 Tagen bei 60 °C.....	73
Abbildung 43: Substratabbau der Anreicherung #10, definierter Co-Kulturen und <i>C. thermocellum</i> -Reinstämmen nach 2 und 5 Tagen bei 60 °C	74
Abbildung 44: Substratabbau von Anreicherung #10 nach 1 und 3 Tagen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen	75
Abbildung 45: pH-Änderung mit GS2-Medium und GR-Medium	76
Abbildung 46: Substratabbau der bei pH 7,4 angereicherten Kulturen #10 und LfL sowie der bei pH 5,6 angereicherten Kulturen A, B, C	77
Abbildung 47: Substratabbau von Kultur #10 nach 21 Stunden bei 60 °C	77
Abbildung 48: Proteine aus Kultur-Überstand der <i>C. thermocellum</i> -Isolate aufgetrennt in einem Polyacrylamid-Gradientengel.....	80
Abbildung 49: <i>cipA</i> -PCR-Produkte von genomischer DNA aus <i>C. thermocellum</i> F7 und den Isolaten 5g, NB2, T2 und BC1.....	80
Abbildung 50: Bezeichnung der Cohesine der analysierten <i>C. thermocellum</i> -Stämme.....	81
Abbildung 51: Gebildete Produkte der <i>C. thermocellum</i> -Stämme.....	84
Abbildung 52: Inkubationszeit bis 40-60 % Filterpapierabbau.....	86
Abbildung 53: Inkubationszeit bis 100 % Filterpapierabbau	86
Abbildung 54: Substratabbau des <i>C. thermocellum</i> -Typstamms ATCC 27405 und der Isolate NB2 und BC1 bei pH 7,4 und 6,8 nach 5 bzw. 7 Tagen.....	87
Abbildung 55: Substratabbau mit bzw. ohne Inokulum nach 7 Tagen bei 60 °C unter dem Einfluss des Autoklavierens der Medien-Komponenten	88
Abbildung 56: <i>C. thermocellum</i> -16S rRNA-Anteile an <i>Bacteria</i> -16S rRNA in Laboransätzen.....	88
Abbildung 57: Anteile von <i>C. thermocellum</i> und <i>C. stercorarium</i> an <i>Bacteria</i> in inokulierten und nicht-inokuliertem Technikumsfermenter	89
Abbildung 58: Anteile von <i>C. thermocellum</i> und <i>C. stercorarium</i> an <i>Bacteria</i> in inokulierten und nicht-inokuliertem Technikumsfermenter	90
Abbildung 59: BSA-Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	131
Abbildung 60: CelS-Eichgerade zur Bestimmung der CelS-Konzentration	131
Abbildung 61: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen aus Anreicherung #10,. 132	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 62: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen aus Anreicherung LfL.	133
Abbildung 63: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen der pH 5,6-Anreicherungen A, B und C.....	134
Abbildung 64: Dendrogramm der Aminosäuresequenzen der Cohesine von sieben <i>C. thermocellum</i> -Stämmen.....	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Biogas	2
Tabelle 2: Anzustrebende Verweilzeiten in Abhängigkeit der Prozesstemperatur	3
Tabelle 3: Bakteriengattungen in Biogasanlagen und ihnen zuschreibbare Substrate und Produkte	7
Tabelle 4: bisher kultivierte und charakterisierte cellulolytische Clostridien	8
Tabelle 5: Untersuchte Biogasanlagen	20
Tabelle 6: getestete Agarzusammensetzungen zum isolieren cellulolytischer Reinkulturen	25
Tabelle 7: Verwendete Primer und Beschreibungen	32
Tabelle 8: Für Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung verwendete Sonden und Beschreibung	38
Tabelle 9: Volumen Formamid, ddH ₂ O, NaCl und EDTA in Hybridisierungs- bzw. Waschpuffer entsprechend der jeweiligen Sonden	38
Tabelle 10: Sonden und gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge	39
Tabelle 11: C _T -Werte der qPCR für <i>C. thermocellum</i> - und <i>Bacteria</i> -16S rDNA	50
Tabelle 12: <i>C. stercorarium</i> -Anteil an CIII-Clostridien in Biogasanlagen HuF2, 3F-2 und 55-1ph, bestimmt mit RT-qPCR und Sequenzierung von CIII- <i>rrs</i> -cDNA-Bibliotheken	53
Tabelle 13: Übersicht der analysierten Mischkulturen	61
Tabelle 14: Substratabhängige Zusammensetzung der thermophilen Anreicherungen #10; Sequenzen erhalten mit allgemeinen <i>Bacteria</i> -16S rDNA-Primern	62
Tabelle 15: Shannon-Wiener-Diversitäts-Index der angereicherten cellulolytischen Kulturen	65
Tabelle 16: Isolierte cellulolytische Reinstämme	65
Tabelle 17: Nächste verwandte und kultivierte Bakteriengruppen der 328 bp-CIII-16S rRNA- Sequenzen aus den Biogasfermentern HuF2, HeiF und 55-1ph	69
Tabelle 18: Gasanalyse der Mischkulturen; Inkubation für 10 Tage bei 60 °C, Substrat: Cellulose	72
Tabelle 19: Filterpapierabbau bei unterschiedlichen Start-pH-Werten	78
Tabelle 20: Punktmutationen im <i>celR</i> -Gen der isolierten <i>C. thermocellum</i> -Stämme sowie der Stämme DSM 1313 und JW20 verglichen mit dem <i>C. thermocellum</i> -Stamm ATCC 27405	80
Tabelle 21: Unterschiede in der Aminosäuresequenz von CipA der <i>C. thermocellum</i> -Stämme NB2, 5g, T2, F7, JW20 und ATCC 27405	81
Tabelle 22: Aminosäuresequenzähnlichkeit der einzelnen Cohesine zu den Cohesinen des Typstamms <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	83
Tabelle 23: Wachstumsverhalten einer Auswahl von Stämmen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen	84
Tabelle 24: Filterpapierabbau der <i>C. thermocellum</i> -Isolate bei verschiedenen Temperaturen	85
Tabelle 25: 16S rDNA-Kopien im Genom ausgewählter Clostridien	92

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	<i>amplified rDNA restriction analysis</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c	<i>concentration</i>
CBM	<i>carbohydrate binding module</i>
CelS	Exoglucanase S
CIII	Cluster III (Clostridien)
CipA	Scaffoldin Protein A
CMC	Carboxymethyl Cellulose
Coh	Cohesin
Cst	<i>Clostridium stercorarium</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
Cth	<i>Clostridium thermocellum</i>
d	<i>day</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Eub	<i>Bacteria</i>
F	Fermenter
FISH	<i>fluorescence in-situ-hybridisation</i>
g	Gramm
GH	Glycosyl Hydrolase
GR	Gärrest
HF	Hydrolysefermenter
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LfL	Landesanstalt für Landwirtschaft
M	Molar
min	Minute
MR	Methanreaktor
MW	<i>molecular weight</i>
nm	Nanometer
oTS	organische Trockensubstanz
OTU	<i>operational taxonomic units</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASC	<i>phosphoric acid swollen cellulose</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-qPCR
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
Std.	Stunde
t	<i>time</i>
T	Temperatur
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _m	<i>melting temperature</i>
TS	Trockensubstanz
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Biogas als erneuerbarer Energieträger

1.1.1 Überblick

Zunehmendes Umweltbewusstsein und der weltweit steigende Energiebedarf machen die Erforschung und Erschließung neuer, regenerativer Energiequellen wirtschaftlich und politisch interessant. Die negativen Auswirkungen des bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe entstehenden CO₂ verstärken den Bedarf und die Nachfrage nachhaltiger, klimaneutraler Energieträger. Dabei kommt neben der Energiegewinnung aus Sonne, Wind- und Wasserkraft der Energiegewinnung aus Biomasse steigende Bedeutung zu. Das Erneuerbare Energien Gesetz (EEG) 2000 (Abnahme und Vergütungsgarantie) und steigende Nachfrage an erneuerbaren Energien führen zu seit Jahren steigender Energieerzeugung aus Biogas und Bau neuer Biogasanlagen (Abbildung 1). Dabei findet eine Vielzahl organischer Substrate wie Energiepflanzen sowie tierische Exkrememente (Gülle und Mist), denen durch ihre Prozess-stabilisierende Wirkung eine große Bedeutung zukommt, Verwendung für die Biogaserzeugung. Neben Mais als ertragreichster Frucht mit der höchsten Flächeneffizienz kommen auch andere nachwachsende Rohstoffe wie Getreide, Gräser, Sonnenblumen u.v.m. zum Einsatz. Außerdem eignen sich für die Biogaserzeugung landwirtschaftliche Abfälle und Reststoffe sowie außerlandwirtschaftliche Substrate, wie Rückstände aus der Lebensmittelindustrie, Gemüseabfälle von Großmärkten, Speiseabfälle, Rasenschnitt, Landschaftspflegematerial oder Bioabfälle aus der Kommunalentsorgung für die Biogasproduktion. Dabei laufen die meisten Biogasanlagen als nasse Fermentationen mit einem Trockenmassegehalt von maximal 12 %. Neben der Nutzung zur Strom- und Wärmeerzeugung mittels Kraft-Wärme-Kopplung (KWK) in Blockheizkraftwerken kann Biogas auch als Kraftstoff und Erdgas-Äquivalent genutzt werden. So eignet es sich als Energieträger für Brennstoffzellen, Stirlingmotoren und Mikrogasturbinen. Aufbereitetes Biogas (Biomethan) kann in das Erdgasnetz eingespeist werden und durch die vorhandene Infrastruktur zu Standorten mit hohem, ganzjährigem Wärmebedarf transportiert werden (FNR 2011).

Einleitung

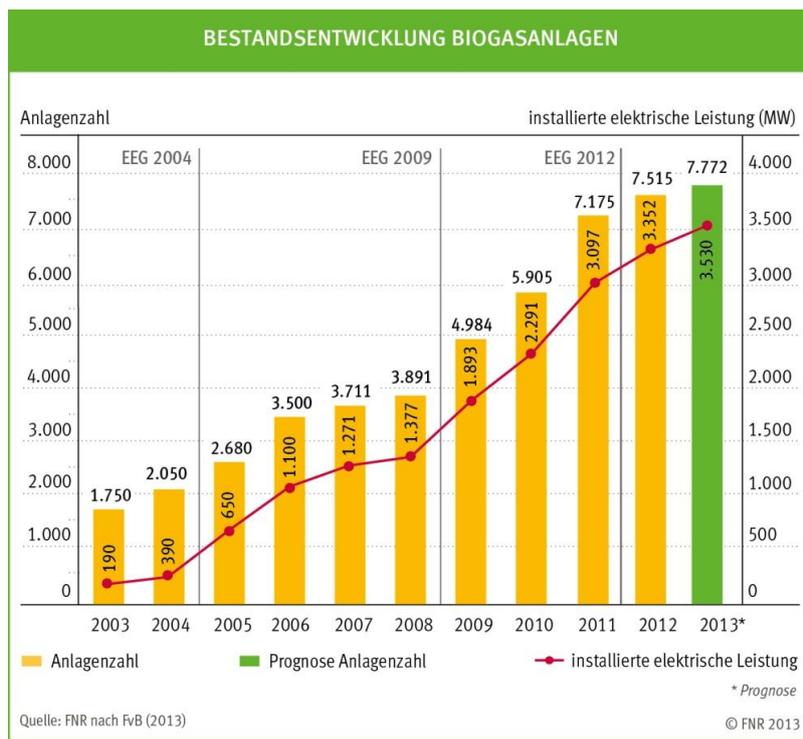


Abbildung 1: Bestandsentwicklung der Biogasanlagen in Deutschland
<http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/entwicklung-biogasanlagen.html>

Biogas setzt sich zusammen aus den Hauptbestandteilen Methan und Kohlenstoffdioxid in variablen Anteilen (Tabelle 1). Weitere Bestandteile sind Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Sauerstoff und Wasserstoff. Der Heizwert (bei 60 % Methan) liegt bei 21MJ/m³ (Biogashandbuch Bayern 2007, Deublein und Steinhauser 2011).

Tabelle 1: Zusammensetzung von Biogas

Bestandteil	Anteil
Methan (CH ₄)	40-75 %
Kohlendioxid (CO ₂)	25-55 %
Schwefelwasserstoff (H ₂ S)	50-5000 ppm
Ammoniak (NH ₃)	0-1%
Wasserdampf (H ₂ O)	0-10%
Stickstoff (N ₂)	0-5%
Sauerstoff (O ₂)	0-2%
Wasserstoff (H ₂)	0-1%

1.1.2 Biogasanlagen

Biogasanlagen können mesophil oder thermophil, einphasig oder zweiphasig betrieben werden. In zweiphasigen Anlagen finden die verschiedenen mikrobiologischen Prozesse (Hydrolyse/Acidogenese und Acetogenese/Methanogenese) räumlich getrennt in verschiedenen Fermentern statt. Dabei können die Fermenter voneinander unabhängig für die

jeweiligen Mikroorganismen optimiert werden (Cirne *et al.* 2007). Nach bisherigen Erkenntnissen unterscheiden sich die Milieuanforderungen der Hydrolyse-Bakterien von denen der Methanbildner, weshalb ein 2-stufiger Prozess sinnvoll ist (Ghosh *et al.* 1975, Cohen *et al.* 1980). Hydrolytische und acidogene Bakterien haben ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH zwischen 5,0 und 6,5, dagegen benötigen methanogene Archaea einen neutralen bis schwach alkalischen pH-Wert (Kaltschmitt und Hartmann 2001, Tsavkelova und Netrusov 2012). Ein Großteil der landwirtschaftlichen Biogasanlagen wird einphasig betrieben (Andersson und Björnsson 2002), dabei werden die Betriebsbedingungen auf die methanogene Population optimiert, da diese relativ empfindlich gegenüber Prozessschwankungen ist. Bei zweiphasigen Anlagen findet in der ersten Stufe die Hydrolyse und Versäuerung statt, das entstandene Hydrolysat, welches die Substrate für die methanogenen Archaea enthält, wird im zweiten, methanogenen Reaktor zu Methan umgesetzt. Zweiphasige Biogasanlagen gibt es bisher v.a. bei der Vergärung landwirtschaftlicher und industrieller Abfälle (Verrier *et al.* 1987, Kalia *et al.* 1992, Weiland 1993). 10 % der anaeroben Anlagen für kommunale Abfälle in Europa werden derzeit zweiphasig betrieben, die Anwendung mit Energiepflanzen ist aber limitiert (Cirne *et al.* 2007).

Thermophil betriebene Biogasanlagen (55-60 °C) haben einige Vorteile gegenüber mesophil (35-42 °C) betriebenen Anlagen. So ist der Methangehalt im Biogas höher, die Verweilzeit kürzer (Tabelle 2), und sie können mit höheren Raumbelastungen betrieben werden (Ahn und Forster 2000); weitere Vorteile sind der durch die höheren Temperaturen entstehende hygienisierende Effekt (Weiss *et al.* 2008), sowie eine Verbesserung der Hydrolyse (Schiraldi und De Rosa 2002, Turner *et al.* 2007). Aus diesem Grund stellen thermophile Mikroorganismen und ihre Enzyme wichtige Zielobjekte für die Entwicklung und Optimierung alternativer Energien dar (Rastogi *et al.* 2009), bessere Kenntnisse über thermophile hydrolytische Bakterien könnten zur Verbesserung der Hydrolyse beitragen.

Tabelle 2: Anzustrebende Verweilzeiten in Abhängigkeit der Prozesstemperatur (Biogashandbuch Bayern 2007)

Prozesstemperatur	Anzustrebende Verweilzeit
unter 20 °C	70 bis 80 Tage
30 °C bis 42 °C	30 bis 40 Tage
48 °C bis 55 °C	15 bis 20 Tage

1.1.3 Mikrobiologische Prozesse beim anaeroben Abbau von Biomasse

Die Prozesse, die bei der Umsetzung des organischen Materials zu Methan stattfinden, können in vier Schritte eingeteilt werden (Abbildung 2), bei denen cellulolytische Mikroorganismen, nicht-cellulolytische saccharolytische Mikroorganismen, syntrophe H₂-produzierende Bakterien und methanogene Archaea beteiligt sind (Stams 1994).

Einleitung

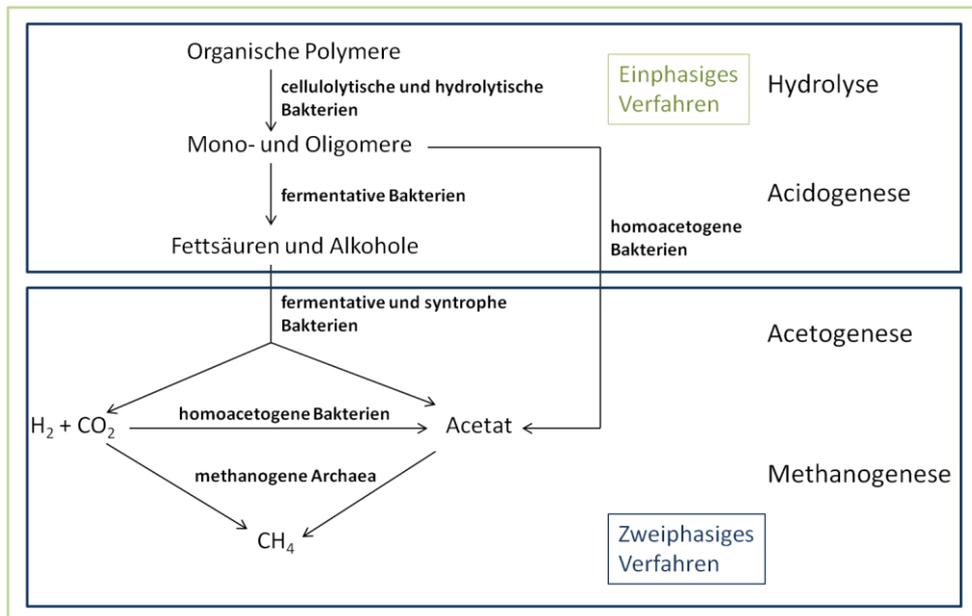


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Umsetzung von Biopolymeren zu Methan

In der ersten Phase, der Hydrolyse, werden komplexe organische Makromoleküle in Oligo- und Monomere (einfache Zucker, Peptide, Aminosäuren und Fettsäuren) gespalten, die dann in der Acidogenese (2. Phase) in flüchtige organische Säuren, Alkohole, Aldehyde, Ketone, CO_2 und H_2 umgesetzt werden. Hydrolyse und Acidogenese sind nicht klar voneinander zu trennen, da sie oft gemeinsam im Stoffwechsel eines Organismus stattfinden. Bei der Hydrolyse und Verstoffwechslung von Biomasse spielen auch synergistische Effekte zwischen den beteiligten Mikroorganismen eine Rolle. So verbraucht z.B. *Clostridium thermosaccharolyticum* Hydrolyseprodukte von *Clostridium thermocellum*, welche bei Akkumulation einen inhibitorischen Effekt hätten (Abbildung 3) (Demain *et al.* 2005); oder es setzen *Methanobacterium ruminantium* und *Methanobacterium mobilis* H_2 , welches das Wachstum des H_2 produzierenden Bakteriums *Clostridium cellobioparum* hemmt, zu Methan um (Chung 1976). Die Kenntnis solcher Zusammenhänge ist für die Steuerung und Optimierung des Biogasprozesses von großer Bedeutung.

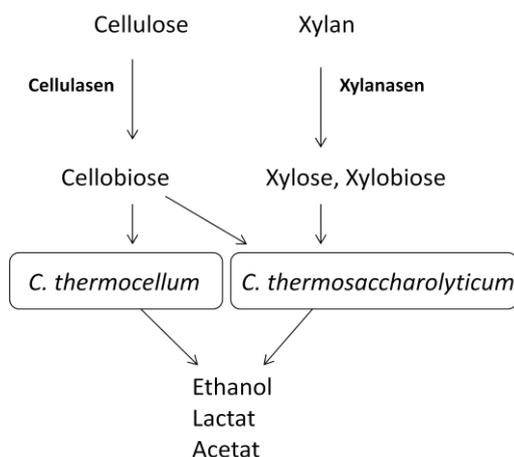


Abbildung 3: Schema der Verstoffwechslung von Cellulose und Hemicellulose durch *C. thermocellum* und *C. thermosaccharolyticum* (nach Demain *et al.* 2005, modifiziert)

In der dritten Phase, der Acetogenese werden diese Zwischenprodukte in Acetat, CO₂ und H₂ metabolisiert. H₂ produzierende Acetogene (z.B. *Acetobacterium woodii*) leben in naher räumlicher Assoziation mit H₂-konsumierenden Partnern (Winter und Wolfe 1980). Es wurden über 100 acetogene Spezies aus 22 Gattungen aus unterschiedlichsten Habitaten wie z.B. Erde, Sedimente, Schlamm, Intestinaltrakt von Mensch und Tieren isoliert (Drake *et al.* 2004). Beteiligte Mikroorganismen der ersten drei Phasen gehören zu den Bakterien. In der vierten Phase, der Methanogenese, wird CH₄ durch Decarboxylierung von Acetat oder Methanisierung von CO₂ und H₂ durch acetoklastische bzw. hydrogenotrophe Archaea gebildet (Weiss *et al.* 2008). Durch die Vielzahl der bei der Methanisierung von Biomasse beteiligten Bakterien, das Ineinandergreifen der verschiedenen Prozesse und dem Synergismus zwischen verschiedenen Bakterien ist es schwer, einzelne Schritte isoliert zu untersuchen.

1.1.4 Energieträger der 2. Generation: Lignocellulose

Um einen höheren Biogas-Anteil an der Energieversorgung zu erreichen, ist eine Effizienzsteigerung der Biogasproduktion nötig. Der Biogasanteil an regenerativen Energien kann erhöht werden, indem das Substratspektrum für Biogasanlagen in Richtung lignocellulosehaltiger Biomasse, also Energieträger der 2. Generation erweitert wird. Eine effiziente Hydrolyse des Substrats ist wichtig, da diese v.a. beim Abbau von Lignocellulose als der geschwindigkeitslimitierende Schritt angesehen wird (Noike *et al.* 1985, Boone *et al.* 1993, Mata-Alvarez *et al.* 2000, Lynd *et al.* 2002).

Energieträger der ersten Generation werden auf Basis von öl- und stärkehaltigen Pflanzen, wobei meist nur die Frucht zur Erzeugung von flüssigen und gasförmigen Biokraftstoffen verwendet wird, gewonnen. Dagegen wird lignocellulosereiche Biomasse als Energieträger der zweiten Generation bezeichnet. Große Teile der vorhandenen Energie auf der Erde sind in Form von Lignocellulose als Gerüstsubstanz pflanzlicher Zellwände gespeichert, was Lignocellulose zu einem umweltverträglichen Substrat für Biogasanlagen mit hoher Verfügbarkeit macht. Bei der in der Natur vorkommenden Lignocellulose ist Cellulose mit Hemicellulose assoziiert und von Lignin umgeben (Abbildung 4), was die Angreifbarkeit durch hydrolytische Mikroorganismen erschwert (Saha 2003, Demain *et al.* 2005). Für den Abbau von Lignocellulose ist eine komplexe Mischung verschiedener Enzyme nötig, darunter Cellulasen, Hemicellulasen, Xylanasen und Lichenasen und viele andere. Dabei ist v.a. der initiale Angriff der dicht gepackten kristallinen Cellulosefasern, bei dem lösliche Zucker entstehen, geschwindigkeitslimitierend und nur wenigen Organismen möglich (Demain *et al.* 2005, Noike *et al.* 1985, Boone *et al.* 1993, Mata-Alvarez *et al.* 2000, Lynd *et al.* 2002) (Abbildung 5).

Einleitung

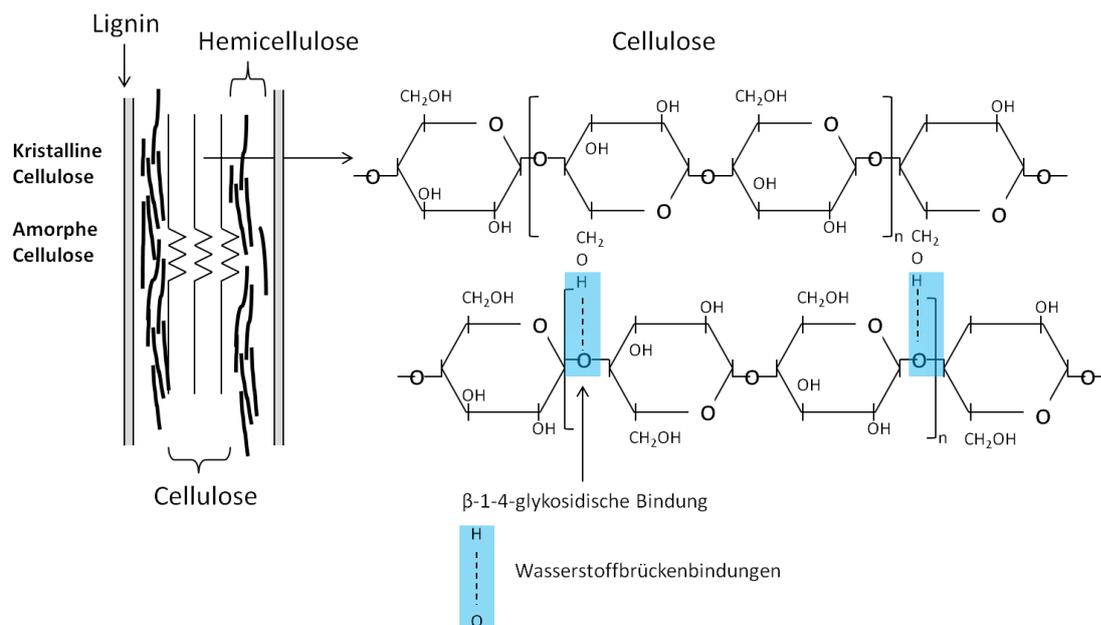


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lignocellulose in pflanzlichen Zellwänden (nach Reineke und Schlömann 2007, modifiziert)

Cellulose ist mit einem Massenanteil von 50 % der Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände und damit die häufigste organische Verbindung der Erde; landwirtschaftlicher, forstwirtschaftlicher und städtischer Cellulose-Abfall gehört zu der weltweit häufigsten und relativ preisgünstigen erneuerbaren Ressource (Rastogi *et al.* 2009). Cellulose besteht aus 100 bis 10000 Glucose-Molekülen, die β-1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind. Durch die geordnete, polymere Struktur ist Cellulose sehr stabil, kristallin und wasserunlöslich. Die Hydrolyse von Cellulose ist ein wichtiger biologischer Prozess, der nur von wenigen spezialisierten Mikroorganismen, die Cellulasen besitzen, bewerkstelligt werden kann. Cellulolytische Mikroorganismen kommen in den Reichen Bakterien, Pilze und Ciliaten vor; cellulolytische Bakterien finden sich in den Gattungen *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Fervidobacterium*, *Halocella*, *Spirochaeta*, *Thermotoga* und *Fibrobacter* (Lynd *et al.* 2002; Burrell *et al.* 2004).

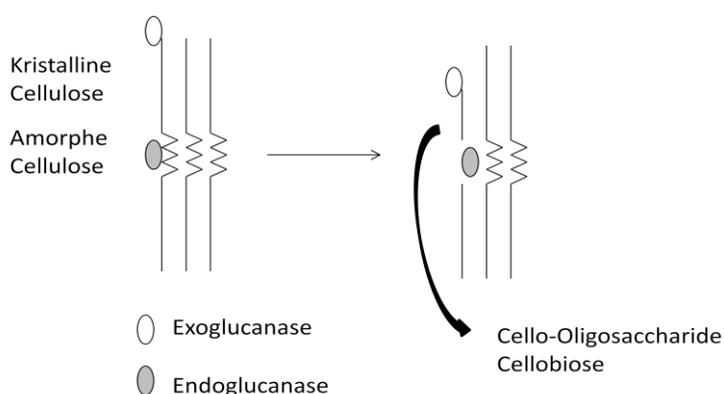


Abbildung 5: Schematische Darstellung des initialen Angriffs der hydrolytischen Enzyme im amorphen und kristallinen Bereich von Cellulose (nach Lynd *et al.* 2002, modifiziert)

1.2 Mikroorganismen in Biogasanlagen

1.2.1 Übersicht

In natürlichen und technischen Ökosystemen gibt es eine große Vielfalt an Mikroorganismen. So gibt es Schätzungen, dass in einem Gramm Boden mehr als 1.0000 (Torsvik *et al.* 1990, 1998) bzw. mehr als eine Million (Gans *et al.* 2005) unterschiedlicher Bakterienarten vorkommen können. Bis zu 10.000 verschiedene Spezies pro cm³ konnten in technischen Systemen wie Biogasanlagen nachgewiesen werden (Engel *et al.* 2009). Dabei scheinen Bakterien des Phylum *Firmicutes* eine wichtige Rolle zu spielen. So machten Tang *et al.* (2004) in einer kommunalen thermophilen Biogasanlage mit Feststoffabfall-Vergärung *Firmicutes* als dominantes Phylum aus. Mikroorganismen des Phylum *Firmicutes* sind weit verbreitet in anaeroben Habitaten (Weiss *et al.* 2008); sie bauen ein breites Spektrum an komplexen organischen Makromolekülen (Proteine und Kohlenhydrate) ab (Wiegel *et al.* 2005). Die mikrobielle Zusammensetzung wird beeinflusst von pH, Temperatur und Substrat und ändert sich während des Substratabbaus (Boon *et al.* 2000, Forney 2001). In Hydrolysestufen mit Gras konnten v.a. *Firmicutes* nachgewiesen werden, mit leicht abbaubaren Zuckerrüben hingegen v.a. *Alphaproteobacteria* (Cirne *et al.* 2007). Eine Übersicht über in Biogasanlagen vorkommende Bakteriengattungen und ihnen zuschreibbare Substrate, Produkte und Funktion ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Bakteriengattungen in Biogasanlagen und ihnen zuschreibbare Substrate und Produkte

Organismengruppe	Gattungen	Substrate	Produkte
Hydrolytische, proteolytische, lipolytische, saccharolytische und acidogene Bakterien	<i>Clostridium</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacteroides</i> sp. <i>Butyrivibrio</i> sp. <i>Eubacterium</i> sp.	Cellulose, Hemicellulose, Pectin, Stärke Proteine, Fette und Wachse (Cutin), Oligo- und Monosaccharide Glycerin, Lactat, Succinat, CO ₂ , H ₂ , Fermentationsprodukte	Ethanol, Acetat, Feruloylat, Lactat, Formiat, Propionat, Butyrat, Zucker (Pentosen, Hexosen, Oligosaccharide, Uronsäuren), CO ₂ , H ₂ , Benzoat, Indol, Aminosäuren, CO ₂ , NH ₃ , H ₂ S, Succinat, Ethanol, Glycerin, H ₂ , i-Propanol, Propandiol, n-Butanol,
Acetogene Bakterien	<i>Clostridium</i> sp.	Hexose, Aminosäuren, Ethanol, i-Propanol, Propandiol, n-Butanol, Acetat, Lactat, (Formiat), Propionat, Succinat, Butyrat, Benzoat,	Acetat
Hydrogenotrophe methanogene Archaea	<i>Methanobacterium</i> sp.	CO ₂ , H ₂	CH ₄ + CO ₂
Acetotrophe methanogene Archaea	<i>Methanosaeta</i> sp. <i>Methanosacina</i> sp.	Acetat	CH ₄ + CO ₂

1.2.2 Cellulolytische Bakterien: *Clostridia*

Eine große Bedeutung beim anaeroben Abbau von schwerverdaulichen Substraten in Biogasanlagen kommt den cellulolytischen Mikroorganismen zu. Viele anaerobe Cellulose abbauende Bakterien sind dem Phylum *Firmicutes* zuzuordnen (<http://www.wzw.tum.de/mbiotec/cellmo.htm>). Darunter gibt es v.a. in der Ordnung *Clostridiales* einige Gattungen mit cellulolytischen Vertretern, wie z.B. einige Vertreter der Gattungen *Caldocellulosiruptor*, *Anaerocellum*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* oder *Acetivibrio*. Besonders Vertreter der Gattung *Clostridium* scheinen eine wichtige Rolle bei der Cellulose-Hydrolyse in Biogasanlagen zu spielen (Schlüter *et al.* 2008, Krause *et al.* 2008). Clostridien sind Endosporenbildner, die ubiquitär in allen anoxischen Habitaten, in denen organische Verbindungen verfügbar sind vorkommen, wie z.B. im Boden, in aquatische Sedimenten, oder im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren.

Tabelle 4: bisher kultivierte und charakterisierte cellulolytische Clostridien

Organismus	Temperaturbereich	Cellulosom	Clostridien-Cluster
<i>C. thermocellum</i> ¹	thermophil	+	III
<i>C. stercorarium</i> ¹	thermophil	-	III
<i>C. clariflavum</i> ³	thermophil	-	III
<i>C. straminisolvens</i> ²	thermophil	-	III
<i>C. alkalicellulosi</i> ¹	mesophil		III
<i>C. aldrichii</i> ¹	mesophil		III
<i>C. cellobioparum</i> ¹	mesophil	+	III
<i>C. papyrosolvens</i> ¹	mesophil	+	III
<i>C. cellulosi</i> ¹	thermophil		IV
<i>C. cellulof fermentans</i>	thermophil		
<i>C. herbivorans</i> ⁴	mesophil		XIVa
<i>C. josui</i> ¹	mesophil	+	III
<i>C. termitidis</i> ¹	mesophil		III
<i>C. thermopapyrolyticum</i>	thermophil		
<i>C. thermocopriae</i> ¹	thermophil		V
<i>C. hungatei</i> ¹	mesophil	+	III
<i>C. sufflavum</i>	mesophil		III
<i>C. cellulolyticum</i> ¹	mesophil	+	III
<i>C. cellulovorans</i> ⁴	mesophil	+	I
<i>C. phytofermentans</i> ¹	mesophil		XIVa
<i>Bacteroides cellulosolvens</i> ¹	mesophil	+	III
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ¹	mesophil	+	III

Einordnung in Clostridien-Cluster nach ¹Collins *et al.* 1994; ²Izquierdo *et al.* 2010; ³Shiratori *et al.* 2009; ⁴Dürre, P. (2005); ⁵Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

Manche Clostridien sind biotechnologisch interessant, da sie organische Lösemittel (Aceton, Ethanol, Butanol, Acetoin) und Säuren (Butyrat, Acetat, Propionat) produzieren. Vor allem aber können Vertreter der Gattung *Clostridium* ein breites Spektrum an komplexen organischen Makromolekülen wie Proteine, Fette und Kohlenhydrate abbauen und als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Wiegel *et al.* 2005). Zu den cellulolytischen Clostridien gehören mindestens 22 bekannte und bereits kultivierte Spezies (Tabelle 4), die unter mesophilen oder thermophilen Bedingungen leben. Mindestens 15 der bekannten cellulolytischen Clostridien gehören zum Clostridien Cluster III nach Collins *et al.* (1994). Innerhalb des Clusters liegt die 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit bei 87-99 %. Zum Cluster III gehören sowohl mesophile als auch thermophile Clostridien, der GC-Gehalt der chromosomalen DNA variiert zwischen 28 und 42 mol%. Dieses Cluster wurde übereinstimmend identifiziert, und ungeachtet der Untersuchungsmethode und als statistisch signifikant bestätigt (Rainey und Stackebrandt 1993, Rainey *et al.* 1993, Collins *et al.* 1994). Einige cellulolytische Clostridien produzieren einen extrazellulären Multienzymkomplex, das Cellulosom. Cellulosome sind aufgrund synergistisch wirkender Enzyme beim Abbau komplexer Kohlenhydrate, wie sie in pflanzlicher Biomasse vorkommen, besonders effiziente Enzymsysteme zum Abbau natürlicher (kristalliner) Cellulose. Da besonders unter den Clostridien des Cluster III Bakterien mit der Fähigkeit Cellulose zu hydrolysieren vorkommen und diese z.T. auch in Biogasanlagen gefunden wurden, wäre es interessant, mehr über die Rolle dieser Bakteriengruppe zu erfahren.

1.2.1.1 *Clostridium thermocellum*

Unter den Cluster III-Clostridien hat sich das anaerobe, thermophile, cellulosomproduzierende Bakterium *Clostridium thermocellum* als besonders effizienter Cellulosehydrolytiker erwiesen (Zverlov und Schwarz 2008, Zverlov *et al.* 2010). *C. thermocellum* ist weit verbreitet in Böden und konnte auch aus Pferdemist, menschlichem Feces und marinem Schlamm isoliert werden (MC Bee 1954, Freier *et al.* 1988). Es gibt sechs Stämme, deren Genom sequenziert ist (ATCC 27405, DSM 1313, AD2, DSM 2360, JW20, YS). Das Bakterium verwertet die Hydrolyseprodukte der Cellulose (Cellobiose, Cellodextrine), nicht aber Glucose und Pentosen wie z.B. Xylose, unter Produktion von Ethanol, Acetat, Lactat, Wasserstoff und CO₂. Dies sind im Biogasprozess geeignete Ausgangsstoffe für sekundäre Gärer und acetoclastische methanogene Archaea. Aufgrund mehrerer Faktoren ist *C. thermocellum* biotechnologisch interessant (Lynd 1989, 1990). Sein Cellulase-Komplex, das Cellulosom, hat eine bis zu 50-fach höhere spezifische Aktivität an kristalliner Cellulose als die industriell produzierten Cellulasen von *Trichoderma reesei*. Mit seiner "echten Cellulase Aktivität" kann es die hoch-kristallinen Formen von Cellulose wie Baumwolle und Filterpapier vollständig solubilisieren (Johnson *et al.* 1982, Demain *et al.* 2005). Durch das Temperaturoptimum bei 60 °C sind Probleme durch Kontaminationen verringert, außerdem sind thermophile Mikroorganismen robust, besitzen stabile Enzyme und gelten generell als apathogen (Lynd 1989, 1990). Es gibt Hinweise, dass sich verschiedene Stämme dieser Spezies stark in ihrer Effizienz beim Cellulosaabbau unterscheiden (Tachaapaikoon *et al.* 2012). Dies genauer zu untersuchen, war eines der Ziele dieser Arbeit.

1.2.1.2 *Clostridium stercorarium*

C. stercorarium ist ein anaerobes, thermophiles Bakterium, das schon in Biogasanlagen nachgewiesen wurde (Burell *et al.* 2003). Es ist saccharolytisch und cellulolytisch, produziert aber kein Cellulosom (Madden 1983). Aufgrund der großen Zahl an Hemicellulasen ist es evtl. besser für den Biomasseabbau geeignet als *C. thermocellum*. Zverlov *et al.* (2010) zeigten, dass *C. stercorarium* zusammen mit *C. thermocellum* besonders beim ersten Angriff auf Lignocellulosefasern besonders effizient ist.

1.3 Multienzymkomplexe zur Cellulosehydrolyse: das Cellulosom

1.3.1 Allgemeines

Im Gegensatz zu frei vorkommenden, synergistisch wirkenden Enzymen sind die Enzyme zum Abbau komplexer Kohlenhydrate, wie sie z.B. in pflanzlichen Zellwänden vorkommen, bei manchen Mikroorganismen in einem Komplex organisiert, dem sogenannten Cellulosom. Dieser Komplex ist sehr effektiv und wird von einer Reihe aerober als auch anaerober Mikroorganismen (aus Böden, Rumen, Abwasser, Termitendarm, Kompost) zum Abbau komplexer Kohlenhydrate produziert. Beispiele für mesophile Cellulosomproduzenten sind *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacterioides cellulosolvens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium josui*, *Clostridium papyrosolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*. Einzige bisher kultivierte thermophile Bakterienspezies, die ein Cellulosom produziert, ist *C. thermocellum* (Doi *et al.* 2003). Vorteile des Cellulosoms liegen in der effizienten Bindung einer großen Zahl hydrolytischer Enzyme an das Substrat, was die Abbaurate steigert und dadurch einen Synergismus verschiedener Enzyme bewirkt (Doi 2008). Die geordnete Struktur gibt Stabilität sowie Resistenz gegen äußere Einflüsse und Dissoziation auch in Anwesenheit von dissoziierenden Detergenzien, so dass die Reinigung einzelner Proteine extrem schwierig ist. (Lamed und Bayer 1988, Demain *et al.* 2005). Die Lokalisation der Multienzymkomplexe ändert sich im Laufe der bakteriellen Wachstumsphase, so befinden sich Cellulosome während der frühen log Phase an der Zelloberfläche, während der späten exponentiellen Phase liegen sie v.a. frei vor; während der stationären Phase sind die meisten Cellulosome im Medium an Cellulose gebunden (Bayer *et al.* 1985, Demain *et al.* 2005).

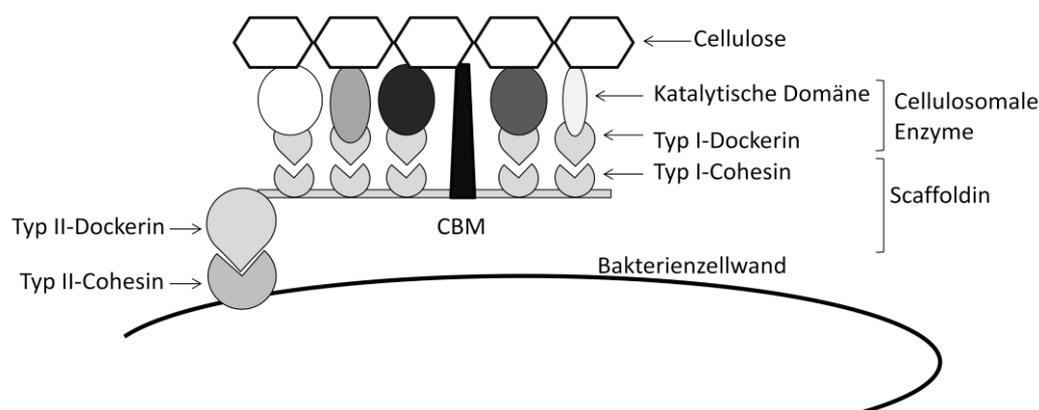


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Cellulosoms, assoziiert an Bakterien-Zelloberfläche; cellulosomale Enzyme mit Dockerinen, die mit den Cohesinen interagieren; CBM bindet Cellulosom an Substrat (modifiziert nach Doi 2008 und Krause *et al.* 2003)

Aufgebaut sind Cellulosome aus einer Struktureinheit, dem Scaffoldin, an die katalytischen Komponenten assemblieren (Abbildung 6). Die Bindung findet zwischen Dockerin-Modulen in den katalytischen Komponenten und Cohesin-Domänen im Scaffoldin statt. Dockerine sind nicht-katalytische, ca. 70 Aminosäuren lange Module am C-terminalen Ende der katalytischen Untereinheit die über hochaffine Protein-Protein-Interaktionen an die Cohesine binden (Fontes und Gilbert 2010). Cohesine bestehen aus etwa 150 Aminosäure-Modulen, die im Scaffoldin als Tandem-Repeats auftreten. Die Anzahl der Cohesine kann abhängig von der Spezies variieren und es können mehrere interagierende Scaffoldine vorkommen (Xu *et al.* 2003). Untersuchungen mit der Exoglucanase Cel48A von *C. thermocellum* zeigten, dass diese an alle Cohesine des Scaffoldin binden kann. Die fehlende Spezifität ist ein Hinweis, dass Cellulosome eine unterschiedliche Zusammensetzung der katalytischen Untereinheiten haben können, die durch Induktion verschiedener Gene durch Pflanzenzellwandpolymere hervorgerufen werden könnte (Raman *et al.* 2009). Ein weiteres Modul im Scaffoldin ist das Kohlenhydrat bindende Modul CBM, das stark an kristalline Cellulose bindet. Es gibt die drei CBM-Subtypen: A, B und C. Dabei interagiert A mit kristallinen Polysacchariden, B bindet an innere Regionen von unverzweigten Polysacchariden und C-CBM erkennen kurze Zucker oder Enden von Polysacchariden. CBM sind in 59 sequenzbasierte Familien eingeteilt (Fontes und Gilbert 2010). Das im Cellulosom von *C. thermocellum* vorkommende CBM gehört zur Familie 3 (CBM3). CBM der Familie 3 gehören fast alle zum Typ A und binden stärker an cellulosehaltige Strukturen pflanzlicher Zellwände als andere Typ A CBMs. Cellulosomen sind über ein Dockerin mit der Zelloberfläche der Bakterien assoziiert und vermitteln die Anheftung der Zelle an das unlösliche Substrat, so dass die Hydrolyseprodukte direkt von der Bakterienzelle aufgenommen werden können. Die Adhäsion wird beeinflusst von Faktoren wie Alter, Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen, Gykokalix-Beschaffenheit, Art des Substrats (z.B. von Cuticula bedeckt), Hydratisierungszustand, ionische Ladung, pH, Temperatur und Anwesenheit von Kationen und löslichen Zuckern (Miron 2001).

Die Enzyme des Cellulosoms sowie freie hydrolytische Enzyme werden als Glykosid Hydrolasen (GH) bezeichnet und in Familien eingeteilt. Insgesamt gibt es 132 Glykosid Hydrolase-Familien in der Datenbank CAZy (Carbohydrate Active enZyme), die über die Aminosäuresequenzen klassifiziert sind (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>, Stand Mai 2013). Glykosid Hydrolasen der Familie 48, zu der freie und cellulosomale Cellulasen gehören, spielen wahrscheinlich eine essentielle Rolle im Celluloseabbau von Clostridien (Devillard *et al.* 2004, Dror *et al.* 2003, Kakiuchi *et al.* 1998), *Actinobacteria* (Ding *et al.* 2003, Irwin *et al.* 2000) und anaeroben Pilzen (Steenbakkers *et al.* 2002). Bei den Cellulasen werden Endoglucanasen (Endo-1,4-L-D-Glykosid Hydrolasen, EC 3.2.1.4), welche die amorphen Regionen aufbrechen, Exoglucanasen (Exo-1,4-L-D-Glucan Cellobiohydrolasen, E.C. 3.2.1.91), welche kristalline Regionen prozessiv hydrolysieren und Glucosidasen (D-L-Glucosidasen, E.C. 3.2.1.21), welche die entstandenen Cellodextrine monomerisieren, unterschieden. Zusammen wirken die Enzymklassen synergistisch. Darüber hinaus enthält das Cellulosom alle für die Hemicellulolyse notwendigen Enzyme.

1.3.2 Das Cellulosom von *C. thermocellum*

Im Genom des Modellorganismus *C. thermocellum* wurden bereits 72 potentielle cellulosomale Gene anhand ihrer Dockerindomäne identifiziert (Zverlov *et al.* 2005a). Die

häufigsten cellulosomalalen Komponenten im Cellulosom von *C. thermocellum* sind die Exoglucanase Cel48S und die Strukturkomponente CipA. CelS hat ein Molekulargewicht von 82 kDa und CipA von 250 kDa (Lamed et al. 1983, Wu 1993, Demain et al. 2005). 13 cellulosomale Proteine sind glykosiliert, eine seltene Modifikation für extrazelluläre Proteine bei Bakterien (Kohring et al. 1990, Mori 1990, Ng und Zeikus 1981, Demain et al. 2005); so sind 40 % der Strukturkomponente CipA Kohlenhydrate (Gerwig et al. 1989, 1991), welche O-glykosidisch über Galactopyranose an Threonin-Reste im CipA gebunden sind (Gerwig et al. 1993, Demain et al. 2005). Das CBM im CipA von *C. thermocellum* gehört zu Familie IIIa (Bayer et al. 1998, Tomme 1995, Demain et al. 2005). Die C-terminale Region des CipA enthält eine Typ 2 Dockerin-Domäne, welche mit Typ 2 Cohesin-Domänen von Proteinen der bakteriellen Peptidoglycanschicht interagiert und das Cellulosom so mit der Zelloberfläche verankert (Leibovitz und Béguin 1996, Abbildung 7). Die Cohesine von *C. thermocellum* sind sehr homolog zueinander, sie sind zwischen 60 und 100 % identisch und sechs der neun Domänen des Typstamms *C.thermocellum* ATCC 27405 sind mindestens 90 % identisch (Gerngross et al. 1993, Demain et al. 2005). Die Zahl der Cohesine im CipA variiert, so besitzt *C. thermocellum* ATCC 27405 neun repetitive Cohesin-Sequenzen (Bayer et al. 1994), *C. thermocellum* JW20 aber nur acht. Die Unterschiede im Cellulosom verschiedener *C. thermocellum*-Stämme stellen einen interessanten Aspekt dar, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte.



Abbildung 7: Schematischer Aufbau des CipA Proteins aus dem Cellulosom von *C. thermocellum* ATCC 27405; rot: Prolin/Threonin-reiche Linker-Regionen, grün: X-Modul mit unbekannter Funktion; grau: Cohesine; schwarz: Signalpeptid und CBM3; gelb: Dockerin Domäne 1 und 2 (modifiziert nach <http://www.uniprot.org/uniprot/Q06851>)

1.4 Unkultivierbare Mikroorganismen und Nachweismethoden

Ein Großteil der Mikroorganismen zu den erfassten 16S rDNA-Sequenzen konnte bisher nicht kultiviert werden, d.h. nicht in Reinkultur gezüchtet werden. Probleme bei der Kultivierung neuer Bakterien sind, dass Bakterien oft nur in Co-Kultur oder in natürlicher Umgebung lebensfähig sind sowie die Unkenntnis der speziellen Anforderungen und Medienzusätze. Da über einen Großteil der in der Umwelt vorkommenden (und am Biogasprozess beteiligten) Mikroorganismen außer der 16S rDNA-Sequenz nichts bekannt ist, ist es oft schwierig, Bakterien und ihre Rolle in der Umwelt oder im Fermenter richtig einzuordnen. Oft kann man nur über verwandte, bereits kultivierte Spezies auf mögliche physiologische Eigenschaften schließen, was aber auch zu fehlerhaften Einschätzungen führen kann, da phylogenetische Verwandtschaft nicht zwangsläufig auch physiologische Homologien nach sich zieht.

Kultivierungsunabhängige Techniken sind deshalb entwickelt worden. Die Diversität kann mit phylogenetischen Arrays oder Sequenzierungen der 16S oder 23S rDNA untersucht werden; dies, ebenso wie Methoden wie DGGE, TGGE oder t-RFLP, liefert einen Überblick über die in der Probe vorhandenen Mikroorganismen und deren Anteile, aber keine Aussagen über deren Rolle oder Aktivität. Auch über Sonden (FISH, Northern Blot, qPCR) können gezielt bestimmte Mikroorganismen nachgewiesen werden – allerdings nur, wenn

entsprechende Markersequenzen bekannt sind. Das genetische Potential kann mit Metagenom-Analysen (z.B. mit funktionalen Genarrays) erforscht werden, wobei hiermit nur das theoretische Potential abgebildet wird, nicht tatsächlich stattfindende Prozesse. Informationen über die stattfindenden Stoffwechselprozesse liefern Metatranskriptom- und Metaproteom-Analysen, dabei wird das gesamte in einer Probe vorhandene Transkriptom oder Proteom analysiert. Dadurch ist eine Verknüpfung von Struktur und Funktion mikrobieller Bakteriengemeinschaften möglich – dies setzt allerdings bekannte Genomsequenzen voraus. Eine funktionelle Zuordnung bestimmter Organismen zu metabolischen Funktionen kann jedoch durch Isolierung neuer Spezies, Stable isotope probing oder NanoSIMS erforscht werden (Cardenas und Tiedje 2008).

Zur Darstellung der Dynamik dominierender Populationen in mikrobiellen Gemeinschaften werden molekulare Technologien wie PCR, real-time PCR oder FISH angewandt. PCR-basierte Techniken spielen bei der Analyse von Bakteriengemeinschaften eine wichtige Rolle, die Analyse der rRNA (mit RT-qPCR) hat den Vorteil höherer Sensitivität (Matsuda *et al.* 2007). Fujimori *et al.* (2010) konnten Bakterienkonzentrationen von weniger als 10 CFU/ml Blut detektieren und quantifizieren. Untersuchungen auf rRNA Basis erlauben zudem die Detektion stoffwechselaktiver Mikroorganismen, da die Menge an ribosomaler RNA mit dem physiologischen Zellzustand korreliert (Amann *et al.* 1995).

Die 16S rRNA stellt eine strukturelle und katalytische Komponente der kleinen Untereinheit prokaryotischer Ribosomen dar und wird aufgrund der universellen Verbreitung oft als phylogenetischer Marker verwendet (Madigan und Martinko 2008). Das 16S rRNA-Gen ist aufgebaut aus variablen und konservierten Bereichen (Abbildung 8). Um verschiedene Bakterienspezies in Bakteriengemeinschaften mit PCR spezifisch nachzuweisen müssen die Primer in den variablen Regionen des Gens liegen.

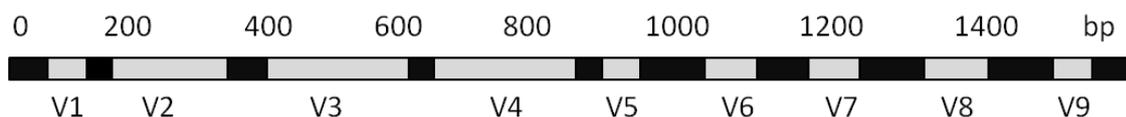


Abbildung 8: Schematische Darstellung der 16S rDNA, grau: variable Regionen; schwarz: konservierte Regionen (nach <http://www.alimetrics.com/en/index.php/dna-sequence-analysis>)

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden Mikroorganismen über spezifische Sonden, die an die 16S rRNA binden, nachgewiesen. Diese Methode erlaubt es, die Morphologie der Mikroorganismen zu untersuchen und außerdem die räumliche Verteilung und Häufigkeit mikrobieller Populationen in ihrer natürlichen Umgebung darzustellen (Gonzalez-Gil *et al.* 2001, Liu *et al.* 2002, Batstone *et al.* 2004, Burrell *et al.* 2004).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Hydrolyse lignocellulosereicher Biomasse für thermophile Biogasanlagen zu optimieren. Um Erkenntnisse über die Hydrolyse von Lignocellulose (in Biogasanlagen) zu bekommen, die zur Effizienzsteigerung des Celluloseabbaus und damit des Methanertrags führen, sollte untersucht werden, welche cellulolytischen Bakterien in cellulolytischen Anreicherungen und welche in Biogasanlagen vorkommen. Ein geeignetes Medium zum Anreichern cellulolytischer Kulturen sollte gefunden werden. Eine geeignete Methode zum Nachweis cellulolytischer Bakterien in Biogasfermentern und zum Monitoring cellulolytischer Bakterien sollte entwickelt werden. Cellulolytische Reinstämme sollten isoliert und charakterisiert werden. Außerdem sollte das hydrolytische Potential verschiedener cellulolytischer Kulturen mit lignocellulosereichem Substrat untersucht werden sowie die für den Abbau optimalen Bedingungen ausgetestet werden. Ausgewählte Kulturen sollten als Inokula in Technikumsfermenter eingesetzt werden und deren Verbleib im Fermenter sollte mit der entwickelten Monitoring-Methode nachverfolgt werden.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), BioRad Laboratories (München), Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf), Eppendorf AG (Hamburg), Fluka (Buchs; Schweiz), Invitrogen (Freiburg), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1 Medien

Alle Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121 °C und 1,21 bar autoklaviert; Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore). Für Agarplatten wurde 1,8 % Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Medien für anaerobe Mikroorganismen wurden in N₂/H₂-Atmosphäre (98:2 %, v/v) anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer (Coy, Michigan, USA) verschlossen.

2.1.1 GS2 (Johnson *et al.* 1981)

Komponente	Konzentration
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
K ₂ HPO ₄	2,9 g/l
Harnstoff	2,1 g/l
Cystein	1 g/l
MOPS	10 g/l
Hefe-Extrakt	6 g/l
Na-Citrat	2,9 g/l
Resazurin	0,2 %
pH	7,0

Salzlösung für GS2 (100x)

MgCl ₂	10,0 g
CaCl ₂	1,5 g
FeSO ₄ (1,25 %)	1 ml
ddH ₂ O	50 ml

2.1.2 LB-Medium

Komponente	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH	7,0

2.1.3 SOC-Medium

Komponente	Konzentration
Trypton	20 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
KCl	2,5 mM
Glucose	20 mM

2.1.4 Gärrestmedium (GR-Medium)

Komponente	Konzentration
Gärrest ¹	25 % (v/v)
Leitungswasser	75 % (v/v)

¹Zentrifugiert (13000 rpm, 20 min, Sorvall RC 3B PLUS, Thermo Fisher Scientific), aus einphasigem Fermenter Pellmeyer, pH 7,4

Für die phylogenetischen Analysen wurden die Kulturen in 10 % GR-Medium mit sterilfiltriertem GR und 0,5 % Cellulose kultiviert. Um den Einfluss des Substrats zu untersuchen, wurde Kultur #10 mit 1 % Substrat 1 kultiviert.

2.2 Substrate

Substrat	Zusammensetzung	Konzentration
Substrat 1	Maissilage, Grassilage, Winterroggen, Wintergerste: 30/30/20/20 (w/w), gemahlen (2 mm); Cellulosegehalt: 46,6 %	0,5% (w/v)
Substrat 2	Stroh/Heu: 50/50 (w/w), vergoren (Reststoff aus LfL-Modellfermenter), Faserlänge 5 mm; Cellulosegehalt: 43,0 %	0,5 - 1% (w/v)
Cellulose (Filterpapier Whatman no.1)		0,5 - 1% (w/v)
Xylan		0,5 % (w/v)
Xylose		0,5 % (w/v)
Sorbitol		0,5 % (w/v)
Cellobiose		0,5 % (w/v)
Arabinose		0,5 % (w/v)
Stärke, löslich		0,5 % (w/v)
Galactose		0,5 % (w/v)
Saccharose		0,5 % (w/v)
Glucose		0,5 % (w/v)

Lösliche Substrate wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben. Substrat 1 wurde gemahlen und ca. 1 Std. bei 60 °C in Leitungswasser gerührt, um lösliche Zucker abzutrennen. Anschließend wurde das Substrat über einem engmaschigen Nylonstoff gewaschen, um Bakterien und kleine Partikel abzutrennen (Abbildung 9). Substrat 2 wurde mit Leitungswasser ebenfalls über dem Vorhangstoff gewaschen. Die Faserstoffbestimmung der Substrate 1 und 2 erfolgte mit dem Fiber Cap-System 2023 der Firma FOSS GmbH (Rellingen) wie in 2.8.2 (S. 22) beschrieben.



Abbildung 9: Substrat 1 (links) und Substrat 2 (rechts) nach der beschriebenen Vorbehandlung

2.3 Kits und Verbrauchsmaterialien

Kits/Enzyme	Bezugsquelle
FastDNA™ SPIN Kit for Soil	MP-Biomedicals
FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit	MP-Biomedicals
DNase I (10U/μl)	Fermentas
Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas
Restriktionsenzyme BsuRI, Hin6I, EcoRI	Fermentas
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit	Axygen
Taq DNA Polymerase	Qiagen
KOD XL DNA Polymerase	Novagen
KAPA SYBR FAST BioRad iCycler	peqlab
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen
illustra Hot Start Mix RTG	GE
PlusOne Silver Staining Kit, Protein	GE
Gradientengele (4-20 %)	Biorad
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen
PCR purification Kit	Qiagen

Medienzusätze

Medienzusätze	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in Ethanol/ddH ₂ O 1:1 (v/v)	100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in ddH ₂ O	25 µg/ml
IPTG	1 M in ddH ₂ O	1 mM
X-Gal	40 mg/ml in N,N-DMF	40 µg/ml

Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10000 bp	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kD	Fermentas

2.4 Bakterienstämme

Stamm	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i> Top 10	Invitrogen
<i>E. coli</i> Top 10 F'	Invitrogen
<i>C. saccharobutylicum</i> DSM 13864	DSMZ
<i>C. stercorarium</i> DSM 8532	DSMZ
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	DSMZ
<i>C. thermocellum</i> F7	Russische Stammsammlung VKPM
<i>C. thermocellum</i> 5g	diese Arbeit
<i>C. thermocellum</i> NB2	diese Arbeit
<i>C. thermocellum</i> T2	diese Arbeit
<i>C. thermocellum</i> BC1	diese Arbeit

2.5 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pCR®II-Topo® Vektor	TOPO TA-Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR®-XL-TOPO® Vektor	TOPO TA-Klonierungsvektor	Invitrogen
pS37	pCR®II-Topo®-Vektor mit <i>C. thermocellum</i> 16S rDNA-Insert	diese Arbeit
pS43	pCR®II-Topo®-Vektor mit <i>C. stercorarium</i> 16S rDNA-Insert	diese Arbeit
pcelS	pCR®II-Topo®-Vektor mit <i>C. thermocellum celS</i> -Insert	zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Krauss
pF7/1-10	pCR®II-Topo® mit PCR-Produkt aus Cip1F und Cip10R von <i>C. thermocellum</i> F7	diese Arbeit

Material und Methoden

pF7/5-8	pCR®II-Topo® mit PCR-Produkt aus Cip5F und Cip8R von <i>C. thermocellum</i> F7	diese Arbeit
p5g/1-10	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip1F und Cip10R von <i>C. thermocellum</i> 5g	diese Arbeit
p5g/5-8	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip5F und Cip8R von <i>C. thermocellum</i> 5g	diese Arbeit
pNB2/1-10	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip1F und Cip10R von <i>C. thermocellum</i> NB2	diese Arbeit
pNB2/5-8	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip5F und Cip8R von <i>C. thermocellum</i> NB2	diese Arbeit
pT2/1-10	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip5F und Cip8R von <i>C. thermocellum</i> T2	diese Arbeit
pT2/5-8	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip1F und Cip10R von <i>C. thermocellum</i> T2	diese Arbeit
pBC1/1-10	pCR®-XL-TOPO® vector mit PCR-Produkt aus Cip1F und Cip10R von <i>C. thermocellum</i> BC1	diese Arbeit

2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen CelS von <i>C. thermocellum</i>	GenScript, Piscataway, USA
Anti-Rabbit Fc (Ig G)- Alkaline Phosphatase-Konjugat (ID: S373B, Lot: 24601208)	Promega

2.7 Biogasanlagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen aus folgenden Biogasanlagen und Technikumsfermentern (Tabelle 5):

Material und Methoden

Tabelle 5: Untersuchte Biogasanlagen; F: Fermenter; HF: Hydrolysefermenter; MR: Methanreaktor; E: Endlager; NG: Nachgärer, GR: Gärrest, GRL: Gärrestlager

Biogasanlage (Probenbezeichnung)	Betriebs- temperatur [°C]	Substrat	Anlagentyp	Verwendung
Anlage 3, Heiß (3F; 3-F2)	52	Silagemischung	landwirtschaftliche Biogasanlage, zweiphasig, Nassfermentation	Test-RT-qPCR RT-qPCR CIII-Analyse
Anlage 4, Straußmühle (4HFv, 4HFh, 4MR, 4E; 4HFv-2, 4HFh-2, 4MR-2, 4E;)	55		landwirtschaftliche Biogasanlage Straußmühle, zweiphasig, Nassfermentation	Test-RT-qPCR RT-qPCR
Stümmer (StimF)	40-42	Maissilage, Grassilage, Rindergülle	landwirtschaftliche Biogasanlage, Nassfermentation	RT-qPCR
Kirchstockach (KirchHF, Kirch MR)	38	Bioabfall	Kommunale Bioabfallvergärungsanlage in Kirchstockach, Nassfermentation	RT-qPCR
STS, Trabitzz (TraF, TraNG)	>50		landwirtschaftliche Biogasanlage, einphasig, Nassfermentation	RT-qPCR Anreicherung C
Hupfer (HuF1, HuF2)	45	Maissilage, Grassilage, Rindergülle	landwirtschaftliche Biogasanlage, einphasig, Nassfermentation	RT-qPCR CIII-Analyse Anreicherung B
Angermaier (AngF)	thermophil	Maissilage, Grassilage, Schweinegülle	landwirtschaftliche Biogasanlage, einphasig, Nassfermentation	RT-qPCR
Burgholzer (BurgF)	50-55	Maissilage, Grassilage, Rindergülle	landwirtschaftliche Biogasanlage, einphasig, Nassfermentation	RT-qPCR
Abfallwirtschaft München, Fröttmaning (AWM GR, AWM Perklorat)		Bioabfall	Trockenvergärungsanlage	RT-qPCR Anreicherung A
Pilotanlage Nr. 6 der LfL (6NG)			landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 14 der LfL (14, 14F1)	42		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR RT-qPCR mesophile Anreicherung Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 23 der LfL (23)			landwirtschaftliche Biogasanlage	Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 24 der LfL (24)			landwirtschaftliche Biogasanlage	Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 25 der LfL (25)	42		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR, RT-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 26 der LfL (26)			landwirtschaftliche Biogasanlage	Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 28 der			landwirtschaftliche	Fermenterkultur

Material und Methoden

LfL (28)			Biogasanlage	60 °C
Pilotanlage Nr. 29 der LfL (29)			landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 33 der LfL (33)	45			Test-qPCR RT-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 101 der LfL (101GRL)	43		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 102 der LfL (102, 102F)	42		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR mesophile Anreicherung Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 103 der LfL (103F1)	48		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR RT-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Pilotanlage Nr. 104 der LfL (104)	52		landwirtschaftliche Biogasanlage	Test-qPCR Fermenterkultur 60 °C
Technikumsanlage der LfL (55-1ph)	55	Maissilage	Technikumsanlage, einphasig	RT-qPCR CIII-Analyse
Technikumsanlage der LfL (55-2ph)	55	Maissilage	Technikumsanlage, zweiphasig	RT-qPCR
Universität Hohenheim (Hoh)	60	Stroh/Heu	Technikumsanlage der Universität Hohenheim, zweiphasig	RT-qPCR
Technikumsanlage der LfL (LfL)	60	Stroh/Heu	Technikumsanlage, zweiphasig	RT-qPCR

2.8. Analytische Methoden

2.8.1. Bestimmung des Substratabbaus

Mit Fiber Caps

Um die hydrolytischen Eigenschaften der Bakterienkulturen vergleichen zu können, wurde der Substratabbau über die TS-Abnahme (dTS) anhand folgender Gleichungen bestimmt:

Bestimmung des TS-Gehalts

$$\text{Formel 1} \quad TS = (m_{TS}/m_f) * 100 \%$$

TS = Trockensubstanzanteil [%]

m_{TS} = Masse der Trockensubstanz (1 d 105 °C)

m_f = Masse Einwaage (feucht, vor Trocknung)

Bestimmung des Abbaus

$$\text{Formel 2} \quad dTS_{ges} = (m_0 * TS - m_1) / m_0 * TS$$

dTS_{ges} = Massenverlust nach Inkubation [%]

m_0 = Masse der Einwaage (feucht)

m_1 = Masse nach Inkubation (nach Trocknung)

Korrektur mit Kontrolle

$$\text{Formel 3} \quad dTS = dTS_{ges} - dTS_K$$

dTS_K = Massenabnahme bei autoklavierter und nicht inokulierter Kontrolle, Berechnung siehe dTS_{ges}

Visuell

Für einige Versuche mit cellulolytischen Reinstämmen wurde das hydrolytische Potential visuell über den Abbaugrad eines Cellulosestreifens bestimmt. Dabei wurde der Abbaugrad in 5 Stufen (0, 20, 40, 60, 80, 100 % Abbau) entsprechend dem beobachteten Abbaugrad des Filterpapiers eingeteilt (Abbildung 10).

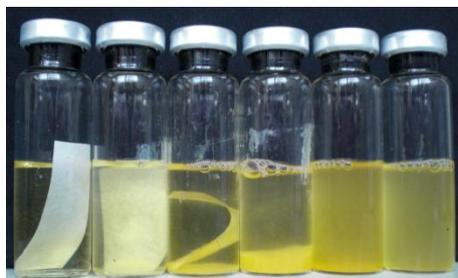


Abbildung 10: 0, 20, 40, 60, 80 und 100 % Filterpapierabbau

2.8.2 Faserstoffanalyse nach van Soest

Benötigte Puffer/Lösungen

NDF-Lösung

EDTA	18,6 g
Na ₂ B ₄ O ₇	6,8 g
SDS	30,0 g
Triethylenglykol	10 ml
Na ₂ HPO ₄	4,6 g
pH	6,9 – 7,1
Na ₂ SO ₃ (Zugabe zum Schluss)	10,5 g

ADF-Lösung

H ₂ SO ₄	0,5 M
CTAB	20 g

Mit der Faserstoffanalyse nach Van Soest kann der Anteil löslicher Stoffe, Hemicellulosen, Cellulose und Asche/Lignin in einer Probe bestimmt werden. Die Van Soest-Fraktionierung wurde in FiberCaps™ der Firma Foss und der zugehörigen Apparatur nach Herstellerangaben durchgeführt (Abbildung 11). Im ersten Schritt werden die Proben mit 20 min mit einer α -Amylase (Sigma) bei 80 °C behandelt und danach mit kochendem dH₂O gewaschen. Nach 30 minütigem Kochen in NDS-Lösung werden die Proben 3 Mal mit dH₂O gewaschen. Zum entfetten werden die Proben 2 Mal 1 min in 360 ml Aceton inkubiert und nach abdampfen des Acetons bei 105 °C getrocknet. Dies führt zur Entfernung löslicher Bestandteile, die Restfraktion wird als NDF (Nutreal-Detergent-Fiber) bezeichnet. Im nächsten Schritt wird durch Behandlung mit ADF-Lösung (1 Std. kochen, danach 4 Mal mit kochendem dH₂O waschen) der Hemicellulosen-Anteil aus den Proben entfernt, es bleibt die ADF-Fraktion (Acid-Detergent-Fiber). Im letzten Schritt wird der Celluloseanteil mit konzentrierter

Schwefelsäure (72 %, 3 Std., RT; waschen: 2 Mal mit lauwarmen dH₂O, dann 8 Mal mit kochendem dH₂O) entfernt, so dass die Restfraktion aus Asche und Lignin besteht (ADL, Acid-Detergent-Lignin). Durch Trocknung bei 105 °C zwischen den einzelnen Schritten und Bestimmung des Masseverlusts kann die jeweilige Fraktion in den Proben bestimmt werden.

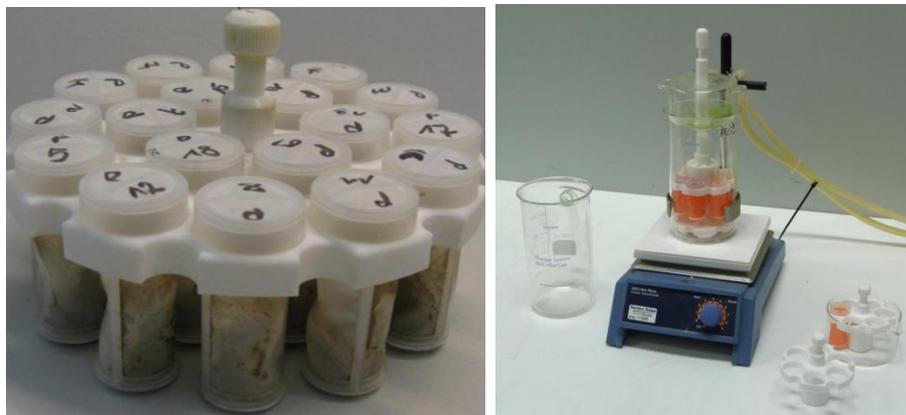


Abbildung 11: Mit Substrat gefüllte FiberCaps™ (links) und Apparatur zur Fraktionierung (rechts) (aus <http://www.severnsaleslabequip.com>)

2.8.3 Gaschromatographie

Das Produktspektrum der Isolate wurde gaschromatographisch bestimmt (GC-2010 Shimadzu, Duisburg). Dabei wurde eine Mischung aus Säuren und Alkoholen in bekannten Konzentrationen als Standard gemessen (Abbildung 12), über den die Zuordnung der Peaks zu bekannten Substanzen ermöglicht wurde. Als interner Standard diente Isobutanol.

GC-Daten

- Probeninjektion AOC-20i, Autosampler AOC-20s
- Detektion mit Flammenionisationsdetektor
- Auftrennung der Probe mit Phese-Stabilwax-DA Kapillarsäule (60 m Länge, 0,32 mm Durchmesser, 0,5 µm Filmdicke; Firma RESTECK, Bad Homburg, Deutschland)
- Trägergas Stickstoff, Fließgeschwindigkeit 50 cm/s

Temperaturgradient

- 12 min von 70 °C auf 260 °C
- 2 min konstant bei 260 °C

Konzentrationsberechnung

Formel 4 $C = C_{\text{Isobutanol}} \cdot A / A_{\text{Isobutanol}}$

C	Konzentration der unbekannt Substanz
C _{Isobut.}	Konzentration des internen Standard Isobutanol
A	Peakfläche der unbekannt Substanz
A _{Isobut.}	Peakfläche des internen Standard Isobutanol

Standards

Aceton, Methanol, Isopropanol, Ethanol, Butanol, Acetat, Propionat, Butyrat

Interner Standard: Isobutanol

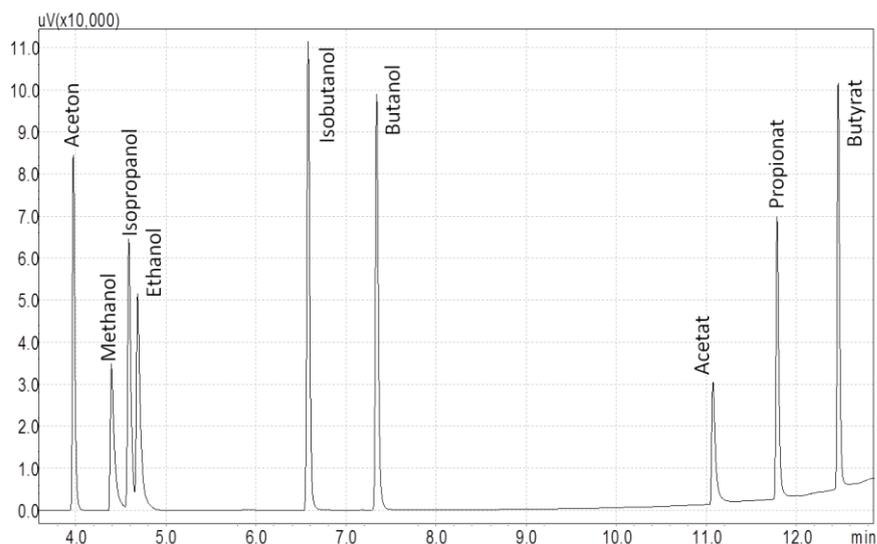


Abbildung 12: Chromatogramm der verwendeten Standards

2.8.4 Gasanalyse

Um die Zusammensetzung des gebildeten Gases zu bestimmen wurde das Gas über eine durch die Gummimembran des Flaschendeckels eingeführte Kanüle in Gasbeutel geleitet und gesammelt (Abbildung 13). Die Bestimmung der Gaszusammensetzung erfolgte von der LfL mit einem Awite-Gasanalysegerät (Awite, Langenbach), mit welchem der CH_4 , O_2 und CO_2 bestimmt werden kann.



Abbildung 13: Anaerobenflaschen und Gasbeutel für Gasanalyse

2.9 Mikrobiologische Methoden

2.9.1 Anreicherungen

Aus 80 verschiedenen Umweltproben (privater Kompost, Kompost und Bioabfallvergärung der Firma Wurzer Umwelt GmbH, landwirtschaftliche Biogasanlagen in Bayern, Misthaufen, Damwildzucht) wurden cellulolytische Mischkulturen angereichert. Dazu wurde eine Spatelspitze der Probe unter anaeroben Bedingungen in 50 ml GR-Medium (pH 7,4 oder 5,6) mit Cellulose (Filterpapier Whatman No. 1) überführt und bei 42, 60 oder 65 °C inkubiert bis ein Abbau des Cellulosestreifens erkennbar war. 0,5 ml der Kultur wurden mit einer Kanüle abgenommen und in 50 ml frisches steriles GR-Medium mit Cellulose überimpft. Nach 5

Wiederholungen wurden die angereicherten Kulturen z.T. für 20 min bei 80 °C pasteurisiert und weiterverwendet. Die Kulturen, die mit Substrat 1 und 2 unter den jeweiligen Anreicherungsbedingungen den besten Filterpapierabbau zeigten, wurden auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

Diversität

Die Diversität in den Anreicherungen wurde mit dem Shannon-Wiener-Index nach folgender Formel berechnet:

Formel 5

$$H_s = -\sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

Hs=Shannon-Wiener-Index

S=Anzahl der Spezies

p_i=Anteil der i-ten Spezies

2.9.2 Vereinzlung von cellulolytischen Mikroorganismen

Zur Isolierung von Reinstämmen wurden Verdünnungen (10⁻¹–10⁻⁶) aus cellulolytischen Anreicherungen auf Agarplatten (1,8 % Agar) ausplattiert und mit ca. 3 ml Overlay (2 % Agar) überschichtet oder die Verdünnung nach Mischen mit dem Overlay-Agar über die Platte gegossen. Die Zusätze sind in Tabelle 6 dargestellt. Nach Inkubation bei 60 °C wurden Kolonien mit sichtbaren Höfen gepickt, in Medium resuspendiert und ein Verdünnungsausstrich gemacht. Nach mindestens drei Einzelkolonie-Ausstrichen wurden die erhaltenen Stämme in flüssiges Medium überimpft.

Tabelle 6: getestete Agarzusammensetzungen zum isolieren cellulolytischer Reinkulturen

Method	Agarplatte	Overlay
1	GS2	GS2 mit 0,05% Cellobiose und 0,5 % Cellulose MN301
2	GS2	GS2 mit 0,5 % Cellulose MN301 und 1 % GR
3	GS2 mit 10 % GR	GS2 mit 0,5 % Cellulose MN301 und 1 % GR
4	GR-Medium (25 %)	GS2 mit 0,5 % Cellulose MN301 und 1 % GR

2.9.3 Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer

Die Bestimmung der Bakterien- oder Sporenzahl erfolgte mithilfe einer Zählkammer (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf), wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Isolierung genomischer DNA

Phenolische DNA Extraktion

Benötigte Puffer/Lösungen

AE-Puffer

Natriumacetat	20 mM
EDTA	1 mM

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH	5,5

Zur Extraktion genomischer DNA (gDNA) wurde 1 g Fermenterprobe mit AE-Puffer bei 14000 rpm und RT für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in AE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 6 min, RT). Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis der Überstand keine braune Färbung mehr aufwies. Bei der Extraktion genomischer DNA aus Umweltproben zur Weiterverwendung als PCR-Template war es besonders wichtig, Verunreinigung durch Huminsäuren (nachgewiesen durch niedriges OD 260/230 Verhältnis) möglichst stark zu reduzieren, da diese eine Hemmung molekularbiologischer Prozesse, wie z.B. PCR oder DNA-Verdau bewirken.

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 50 µl 25 %iger SDS-Lösung (w/v) und 600 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und mit 200 µl Glasperlen (0,1 mm Durchmesser) für 4 min mit Ultraschall behandelt. Zur Inaktivierung von DNasen wurde die Probe für 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 rpm) wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen, mit 1 ml Chloroform 30 min ausgeschüttelt und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um Proteine abzutrennen. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und wieder mit Chloroform ausgeschüttelt, bis Löcher in der Interphase sichtbar waren. Zur Fällung der DNA wurde 10 % (v/v) Natriumacetat (3 M) und 200 % (v/v) Ethanol zur wässrigen Phase zugegeben und bei -20 °C mindestens 20 min inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet 3 Mal mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Verdunsten des Ethanols wurde die gDNA in ddH₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

DNA-Extraktion mit Chloroform

Benötigte Puffer/Lösungen

Resuspendierungspuffer

Tris-HCl	20 mM
EDTA	25 mM
NaCl	75 mM
Lysozym	1 mg/ml

Zur Extraktion genomischer DNA aus den Anreicherungen wurden 50 ml einer frischen Kultur für 15 min bei 5000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml

Resuspendierungspuffer resuspendiert und ÜN bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 20 % (v/v) einer 10 %igen SDS-Lösung und 1 mg/ml Proteinase K wurde weitere 2 Std. bei 60 °C inkubiert. Zur Reinigung der DNA wurde 1/3 Vol. Chloroform zugegeben und 30 min ausgeschüttelt. Anschließend wurde für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase erneut mit Chloroform ausgeschüttelt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis Löcher in der Interphase sichtbar waren. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 100 % (v/v) Isopropanol gefällt und bei 14000 rpm und RT für 30 min abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet 3 Mal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und die gDNA nach Verdunsten des Ethanols bei 4 °C ÜN in ddH₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

DNA-Extraktion mit FastDNA® SPIN Kit for Soil

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung genomischer DNA stellt die Verwendung kommerzieller Kits dar. Genomische DNA aus Biogasfermenter-Proben wurde mit dem FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) nach Herstellerangaben extrahiert. Um eine repräsentative Aussage zu gewährleisten, wurden die Proben (ca. 50 ml) vor der DNA-Extraktion mit einem Ultraturrax® (Ika, Staufen) 30 s homogenisiert.

2.10.2 Agarosegel-Elektrophorese

Benötigte Puffer/Lösungen

50x TAE-Puffer

Tris	40 mM
Acetat	40 mM
EDTA	1 mM
pH	8,5

Auftragspuffer

Glycerin	50 % (v/v)
EDTA	0,5 M
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

Zur Analyse von gDNA und DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden je nach zu erwartender Fragmentlänge 0,5-2 %ige Agarosegele mit TAE-Puffer hergestellt. Die Auftrennung erfolgte für 1 bis 1,5 Std. bei 80 mA und 120 V. Als Größenstandard wurden 5 µl DNA Ladder Mix aufgetragen. Die Banden wurden mit 0,0001 % Ethidiumbromid im Wasserbad inkubiert und mit einem UV-Transilluminator (AlphaImager MINI, Biozym) detektiert.

2.10.3 RNA-Extraktion

Für das Arbeiten mit RNA wurden alle Reaktionsgefäße zwei Mal autoklaviert, es wurden ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen, sowie DEPC-H₂O verwendet.

Gesamt-RNA aus Biogasfermenter-Proben wurde mit dem RNA Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Proben (ca. 50 ml) wurden nach der Entnahme aus den Fermentern in verschlossenen Plastikbehältern z.T. temperiert in Styroporboxen, z.T. gekühlt transportiert (max. 4 Std.) und vor der RNA-Extraktion mit einem Ultraturrax 30 s homogenisiert.

2.10.4 DNA-Verdau

Nach der RNA-Extraktion wurde ein DNA-Verdau (DNase I, Fermentas) durchgeführt.

Reaktionsansatz

DNase Puffer (10x)	1 µl
DNase (1U/µl)	1 µl
RNA	ca. 100 ng
ddH ₂ O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl 50 mM EDTA zugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert.

2.10.5 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Reaktionsansatz

Reverse Transkriptase Puffer	4 µl
Maxima Enzym Mix (1 U/µl)	2 µl
RNA	100 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl

Vor der reversen Transkription wurden die Proben 5 min bei 65 °C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Zur reverse Transkription wurde 10 min bei 25 °C und 15 min bei 50 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min gestoppt.

2.10.6 Quantifizierung der Gesamt-RNA/DNA-Konzentration

RNA- bzw. DNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Über die Absorptionsverhältnisse bei den Wellenlängen 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm konnte der Grad der Verunreinigung festgestellt werden, die Werte sollten bei 1,8 für DNA und 2,0 für RNA (260/280) und > 2 (260/230) liegen.

2.10.7 PCR

Die PCR-Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Für Weiterverwendung des Amplikons zum klonieren wurde der doppelte Ansatz hergestellt. Die Reaktionen wurden

einem Thermocycler PTC-100 (MJ Research Inc., San Fransisco, USA) oder einem Primus 96 Gradientencycler (Peqlab, Erlangen) durchgeführt.

Illustra Hot Start Mix RTG

Reaktionsansatz

Template DNA	1 µl (50 - 100 ng)
Primer	siehe Tabelle 7
ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Primerannealing	siehe Tabelle 7	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

HotStar Taq Master Mix Kit

Reaktionsansatz

Template DNA	1 µl (50 - 100 ng)
Primer	siehe Tabelle 7
Master Mix	12,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Primerannealing	siehe Tabelle 7	30 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

KOD XL DNA Polymerase**Reaktionsansatz**

Template DNA	1 µl (50 - 100 ng)
Primer	siehe Tabelle 7
dNTP-Mix (je 2 mM)	2,5 µl
KOD XL Polymerase-Puffer	2,5 µl
KOD XL Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	30 s	1
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Primerannealing	siehe Tabelle 7	5 s	
Elongation	72 °C	45-60 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

KAPA SYBR® FAST BioRad iCycler

Zur Quantifizierung der Kopienzahlen der 16S rDNA und cDNA in Fermenterproben wurde eine SYBR® Green I qPCR Methode verwendet. Das Prinzip dieser Methode basiert auf Interkalieren des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green I in doppelsträngige DNA und dadurch hervorgerufener Fluoreszenz. Der DNA-SYBR Green-Komplex absorbiert Licht mit der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 522$ nm, dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge des gebildeten Produkts. Für die quantitative PCR wurde ein iCycler iQ™ (Bio-Rad) sowie die iQ5™-Software verwendet. Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte über bei jeder Messung mitgeführte Plasmidstandard-Verdünnungsreihen mit bekannten Kopienzahlen. Bei jeder Messung wurden drei Negativkontrollen (ddH₂O statt Template) mitgeführt. Die Effizienz der qPCR wurde mit der Formel

Formel 6 $E = 10^{(-1/\text{Steigung Standardgerade})} - 1$

berechnet und sollte über 95 % sein. Die Template DNA bzw. cDNA wurde in mindestens zwei Verdünnungen (1:10, 1:100 und z.T. 1:500) eingesetzt, und die geeignetste Verdünnung zur Auswertung herangezogen. Dadurch sollten eventuelle Störungen der PCR durch Hemmstoffe minimiert werden.

Reaktionsansatz

Template DNA	2 µl (1 - 5 ng)
Primer	siehe Tabelle 7
KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix	10 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Temperaturprofil

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	3 s	40
Primerannealing	siehe Tabelle 7	20 s	
Elongation	72 °C	1 s	
Fluoreszenzmessung			
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Schmelzkurvenstart	55 °C	1 min	
Temperaturerhöhung	0,5 °C	10 s	80

Die Fluoreszenzmessungen fanden nach jedem Elongationszyklus statt. Im Falle des *C. thermocellum*-16S rDNA-Assays fand zwischen der Elongation und der Fluoreszenzmessung ein Denaturierungsschritt bei 83,5 °C statt, um mögliche unspezifische Produkte aufzuschmelzen.

Auswertung der qPCR-Daten

Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte über eine Standardkurve, die bei jedem PCR-Lauf mit Plasmiden erstellt wurde. Die Kopienzahl der Plasmidstandards wurde mit Formel 6, 7 und 8 berechnet:

Formel 7 $(bp\ Insert^1 + bp\ Vektor^2) * 660\ [g/mol]^3 = berechnetes\ Molekulargewicht\ [g/mol]$

Formel 8 $eingesetzte\ Plasmidmasse\ [g]^4 / berechnetes\ Molekulargewicht\ [g/mol]) = eingesetzte\ Plasmidmenge\ [mol]$

Formel 9 $Kopienzahl = eingesetzte\ Plasmidmenge\ [mol] * 6,022 * 10^{23}\ [Moleküle/mol]$

¹ 16S rDNA von *Clostridium thermocellum*: 1531 bp; 16S rDNA von *Clostridium stercorarium*: 1528 bp

² pCR®2.1-TOPO® plasmid: 3931 bp

³ 660 [g/mol]: mittleres Molekulargewicht zweier Nukleotide (bp)

⁴ die Plasmidkonzentration zur Berechnung der eingesetzten Masse wurde durch Nano-Drop-Messung bestimmt

Die erhaltenen C_T-Werte der Standards wurden gegen den ermittelten log₁₀ der Kopienzahlen aufgetragen (Abbildung 14). Bei jedem Lauf wurden Standards mitgeführt.

Material und Methoden

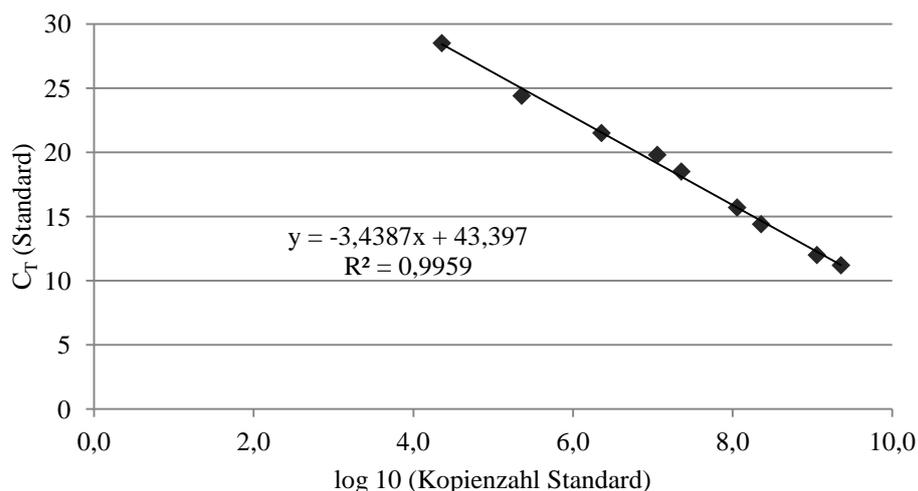


Abbildung 14: C_T-Werte der Standards in Abhängigkeit vom log₁₀ der Kopienzahl; beispielhafte Darstellung zur Auswertung der qPCR-Standards

Die Kopienzahlen in den Proben wurden mit folgender Gleichung berechnet:

Formel 10 $\log_{10}(\text{Kopienzahl}) = (C_T - t) / m$

Primer

Die verwendeten Primer (Tabelle 7) wurden in ddH₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Verwendete Primer und Beschreibungen

Primer	Sequenz 5'>3'	Annealing	Konzentration	Beschreibung	Referenz
Cth for	TTTACCGGAAGTAT ATCCTAG	59 °C	0,2 μM	selektiv für <i>C. thermocellum</i> 16S rDNA; für qPCR	diese Arbeit
Cth rev	TTTGATAACAGGAC GATGCC				
Cst for	CTTTGATCGGGGAC GAAGATG	65,5 °C	0,1 μM	selektiv für <i>C. stercorarium</i> 16S rDNA, für qPCR	diese Arbeit
Cst rev	ATTTGGCACCCCGCC TAC				
CIII for	GCGGTAATACGTAG GTGG	59 °C	0,1 μM	selektiv für Cluster III- <i>Clostridia</i> 16S rDNA, für qPCR	diese Arbeit
CIII rev	AGAAGGGGTCGATA CCTC				
celS for	GTT CTG CCG TTG TTG CTT CCG	59 °C	0,2 μM	selektiv für <i>C. thermocellum celS</i> , für qPCR	diese Arbeit
celS rev	TGT CAT AAC CGG TAG CAG G				
Eub 338	ACTCCTACGGGAGG CAG	53 °C	0,1 μM	selektiv für <i>Bacteria</i> 16S rDNA, für qPCR	Fierer et al. 2005
Eub 518	ATTACCGCGGCTGCT GG				

Material und Methoden

Cip1F	AAA ACT TTG CCG GAA AGT TGC	55-60 °C	0,2-0,4 µM	zum Klonieren und Sequenzieren von Teilen von <i>cipA</i> der <i>C. thermocellum</i> Stämme NB2, BC1, 5g, T2, F7	Dr. V.V. Zverlov
Cip2R	ATACTGATGACTTTT CTCATCTA				
Cip3F	AAT GGT AGA TGA GAA AAG TCA TC				
Cip5F	AATACCGCCGTCAG ATGATC				
Cip7F	ATT TGA AGG TTG AAT TCT ACA ACA GC				
Cip4R	GATCATCTGACGGC GGTATT				
Cip6R	TTTCAAGGTAGGTGT CTGCG				
Cip8R	TTA AGT GTC AAC TTG TTC GGA G				
Cip10R	TAA TCA CTT GAT GTA GCT CCA A				
5g-seq	AACACCGCCGGCAT CAA				
Cip-F7-3R	GCAATTGGCCATTCC TTTGG				diese Arbeit
Cip-NB2-3R	GAAGTCGCAATTGG CCAT				
CipA5F-1	GAACCTGCAACACC TACAAC				
CipA5F-2	CCTGTAACAACACC GACAAC				
CipA8R-1	CTTACTGTGTCTCCC GGTTT				
BC Cip3F-b	CGCTACTGTTGCACC ACTT				
BC Cip10R-c	CCAACAGATCCCGT AACTTT				
Cip 5-8 F2	GGTAGGATTCGGGT CAACTA				
Cip58 for	GGATTAAAGTGGAC ACAGTA				
Cip58rev	CTGTGTCCACTTTAA TCCTT				
BC V1 for	CCATACTGGAGAGC GTTTAT				
616	CA(GT)AAAGGAGAT CC	50 °C	0,5 µM	bakterielle 16S rDNA	Dr. V. V. Zverlov
630	AGAGTTTGAT(CT)(A C)TGGCTC				
M 13	GTA AACGACGGCC	55 °C	0,5 µM	TOPO TA	Invitrogen

forward	AG			Cloning	
M 13 reverse	CAGGAAACAGCTAT GAC				
CelR1	TCGCATTTATTTTAC TCGCA	55 °C	0,2 µM	zum Sequenzieren von <i>celR</i>	diese Arbeit
CelR2	TACACATCTCACAGT GGATG	55 °C	0,2 µM		
CelR3	CAAATAACGGTGTC GAATTG	55 °C	0,2 µM		

2.10.8 Aufreinigung des PCR-Produkts

Für Sequenzierungen oder für die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte. Dazu wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. In einigen Fällen war es nötig, das PCR-Produkt vor der Aufreinigung über ein Agarose-Gel aufzutrennen, um unspezifische Produkte abzutrennen. Nach der Elektrophorese wurde die entsprechende Bande unter möglichst kurzer UV-Exposition ausgeschnitten. Das PCR-Produkt wurde mit 50 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

2.10.9 Polyadenylierung

Um an PCR-Produkten, die nicht mit einer Taq-Polymerase amplifiziert wurden, Poly-A-Überhänge für die TOPO TA Klonierung zu erzeugen, wurde das PCR-Produkt im Anschluss an die PCR für 30 min bei 72 °C mit einer Taq-Polymerase inkubiert.

Reaktionsansatz

PCR-Produkt	31 µl
dNTPs (10 mM)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	8 µl
10x Taq-Puffer (+KCl; -MgCl ₂)	5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	1 µl

2.10.10 TOPO-TA- und TOPO-XL-Klonierung

Zum Klonieren von PCR-Produkten wurde das TOPO® TA Cloning® Kit und für Fragmente über 6 kb das TOPO® XL PCR Cloning Kit verwendet. Dabei können die bei der PCR mit einer Taq-Polymerase erzeugten Desoxyadenosinmonophosphate am 3' Ende des PCR-Produkts effizient mit dem Vektor ligiert werden, da der Vektor am 5' Ende Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind, besitzt (Shuman 1994).

Reaktionsansatz

Gereinigtes PCR-Produkt	1-4 µl
Salzlösung	1 µl
TOPO-Vektor	1 µl
ddH ₂ O	ad 6 µl

Die Klonierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. 4 µl des Klonierungsansatzes wurden nach Herstellerangaben in chemisch kompetente *E.coli* One Shot Top10- bzw. Top10F⁻-Zellen (Invitrogen) transformiert und jeweils 40 und 80 µl des Transformations-Ansatzes auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) und X-gal (40 µg/ml) (Top10F⁻ zusätzlich mit IPTG) ausplattiert. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C wurden weiße Kolonien gepickt; hier konnte eine erfolgreiche Klonierung vermutet werden, da das *lacZ*-Gen im Vektor durch Insertion inaktiviert wurde und somit die Farbreaktion von X-gal zu Galactose und einem Indigo-Farbstoff unterbunden wurde.

2.10.11 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung wurde nach dem Prinzip der alkalische Lyse oder unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) bzw. des AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axigen) durchgeführt

Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse

Puffer/Lösungen

P1 (Resuspendierungspuffer)

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml
pH	8,0

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

P2 (Lysepuffer)

Dieser Puffer wurde immer frisch angesetzt.

NaOH	400 mM
SDS	2 %

P3 (Neutralisationspuffer)

KAc	3 M
Eisessig (99 %)	11,5 ml
dH ₂ O	ad 100 ml
pH	4,8

Zur Plasmidpräparation mit der alkalischen Lyse wurden 2 ml einer Flüssigkultur 20 s bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl P1 aufgenommen. Nach Zugabe von 150 µl P2 wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert und anschließend 150 µl P3 zugegeben. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versetzt und bei 13000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 3 Mal mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und nach vollständigem Trocknen in ddH₂O aufgenommen.

Plasmidpräparation mittels QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Plasmidpräparation mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Quiagen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch die Reinigung der Plasmid-DNA mittels einer Säule war bei der Plasmidpräparation mit dem Kit die Reinheit der gewonnenen DNA höher, die Ausbeute jedoch geringer als bei der alkalischen Lyse ohne Kit.

Plasmidpräparation mittels AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit

Um sehr saubere Plasmidpräparationen für die Sequenzierungen zu erhalten, erfolgte die Plasmidpräparation in einigen Fällen mittels AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben. Für die Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurden 60 µl ddH₂O verwendet.

2.10.12 ARDRA

Unterschiede im Genom können durch Fingerprint-Methoden wie ARDRA dargestellt werden. Dabei wird 16S rDNA aus gDNA mit allgemeinen Bakterienprimern amplifiziert (616 und 630, siehe Tabelle 7). Das erhaltene Gemisch der 16S rDNA verschiedener Bakterienspezies kann durch Klonierung in Plasmide, Transformation in *E. coli* und anschließender Plasmidpräparation getrennt werden. Nach erneuter 16S rDNA-PCR und Restriktionsverdau können die entstandenen, unterschiedlich großen Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Die entstehenden Bandenmuster sind für das jeweilige Bakterium spezifisch. Somit können auf diese Weise die Klone in OTUs gruppiert werden und durch anschließende Sequenzierung einzelner Vertreter jeder Gruppe die Bakterienzusammensetzung in einer Probe analysiert werden.

Reaktionsansatz

Puffer Tango (Fermentas)	2 µl
<i>Bsu</i> R I (Fermentas)	1 µl
<i>Hin</i> 6 I (Fermentas)	1 µl
PCR-Produkt	6 µl
ddH ₂ O	6 µl

Für den Restriktionsverdau wurde der Reaktionsansatz für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden in einem 10 % Polyacrylamidgel für 180 min bei 20 mA und 80 V aufgetrennt und nach Inkubation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert (siehe 2.10.2, S. 27).

10 % Polyacrylamidgel

TAE	5 ml
Acrylamid (30 %-Lösung)	2,5 ml
APS (10 %-Lösung)	37,5 µl
TEMED	7,5 µl

2.10.13 EcoR I-Restriktionsverdau

Um die erfolgreiche Integration des Inserts in den pCR2.1-TOPO®-Vektor (3931 bp) bzw. pCR-XL-TOPO®-Vektor (3519 bp) zu überprüfen, wurden die Plasmide nach der Plasmidpräparation mit *EcoR* I geschnitten. Die *EcoR* I-Schnittstellen innerhalb der Topo-Vektoren liegen dabei direkt am 5'- und 3'-Ende der Integrationsstelle.

Reaktionsansatz

10 x Puffer <i>EcoR</i> I (Fermentas)	1 µl
<i>EcoR</i> I (Fermentas)	0,5 µl
Plasmid-DNA	5 µl
ddH ₂ O	3,5 µl

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Zur Visualisierung der Restriktionsfragmente wurden 10 µl des Ansatzes mit 6x DNA Loading Dye (Fermentas) in einem Agarosegel (1 %, w/v) bei 80 mA und 100 V aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht dokumentiert (siehe Kapitel 2.10.2). Es wurden 5 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) mitgeführt.

2.10.14 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) durchgeführt.

Reaktionsansatz

gereinigtes PCR-Produkt	10 ng
Sequenzierprimer	5 µM
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.10.15 FISH

Benötigte Puffer/Lösungen

PBS-Puffer

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	6,5 mM
pH	7,1

Hybridisierungspuffer

NaCl (5M)	360 µl
Tris-HCl (1M, pH 8,0)	40 µl
SDS (10 %)	4 µl
Formamid	siehe Tabelle 9
ddH ₂ O	siehe Tabelle 9

Waschpuffer

NaCl (5M)	siehe Tabelle 9
EDTA (0,5 M)	siehe Tabelle 9
Tris-HCl (1M, pH 8,0)	1 ml
SDS (10 %)	50 µl

Sonden

Tabelle 8: Für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verwendete Sonden und Beschreibung

Sonde	Sequenz 5'>3'	Beschreibung	Referenz
C. th. 1258	TCCTCCTCGCGAATTAGC	Spezifisch für <i>C. thermocellum</i> und nah verwandte Spezies	Burell <i>et al.</i> 2004
C. st. 440	CGTCTATTTTCGTCCCCGATC	Spezifisch für <i>C. stercorarium</i> und nah verwandte Spezies	Burell <i>et al.</i> 2004
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	die meisten <i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> 1990
EUB 338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Planctomycetales	Daims <i>et al.</i> 1999
EUB 338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verrucomicrobiales	

Tabelle 9: Volumen Formamid, ddH₂O, NaCl und EDTA in Hybridisierungs- bzw. Waschpuffer entsprechend der jeweiligen Sonden

Sonde	Hybridisierungspuffer: Formamid [µl]/ddH ₂ O [µl]	Waschpuffer: 5 M NaCl [µl]/0,5 M EDTA [µl]
C. th. 1258	600/1000	1490/500
C. st. 440	600/1000	1490/500
EUB 338	1000/600	180/500
EUB 338-II		
EUB 338-III		

Die verwendeten Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden aus der Datenbank probeBase ([www. microbial-ecology.net/probebase](http://www.microbial-ecology.net/probebase)) bezogen, ebenso die geeignetste Formamidkonzentration. Die sich aus der Formamidkonzentration ergebenden variablen Anteile von ddH₂O im Hybridisierungspuffer und NaCl bzw. EDTA im Waschpuffer sind in Tabelle 9 angegeben.

Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden die Proben mit dem Ultraturax 10 s homogenisiert und 2 Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 3 min bei 14000 rpm und RT). Zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz durch Entfernen der lignocellulosehaltigen Partikel wurden 1350 µl Proben mit 150 µl Methanol (10 %, v/v) versetzt und 15 min bei 35 °C im Ultraschallbad inkubiert (modifiziert nach Lunau *et al.* 2005). Nach dem Abzentrifugieren (1 min, 200 rpm) wurde der Überstand mit 4 % PFA (3:1, v/v) bei -4 °C ÜN fixiert. Nach 3-maligem waschen mit PBS (Zentrifugation 3 min bei 14000 rpm und RT) und suspendieren des Pellets in PBS wurden die Proben mit EtOH versetzt (1:1, v/v) und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die fixierten Proben wurden 3 Mal mit dem 20-

Material und Methoden

fachen Volumen PBS gewaschen und z.T. mit 0,01 % Toluidinblau-Lösung in PBS (w/v) für 1 Std. bei RT inkubiert, um die Eigenfluoreszenz von Lignin zu verringern (Smith and McCully 1978). Nach der Behandlung mit Toluidinblau erfolgten wiederum 3 Waschschrte mit PBS. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl PBS gelöst und je 2-15 µl auf die Aussparungen Epoxidharz beschichteter Objektträger (Menzel) aufgetragen und getrocknet. Zur Verbesserung der Membranpermeabilität wurde 30 min bei 37 °C mit 2 µl Lysozym (10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) und 10 µl PBS inkubiert und anschließend mit ddH₂O gespült. Einige Proben wurden in Kryomedium (Richard-Allan Scientific Neg-50 Frozen Section Medium) gefroren und in 10-20 µm dicken Schnitten (Croystat Microm HM 500) in die Aussparungen der Objektträger gelegt, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Die Proben wurden mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (50, 80 und 100 % EtOH, je 3 min) dehydriert. Für die Hybridisierung wurden 9 µl Hybridisierungspuffer mit 1 µl Sonde (30 bzw. 50 ng/µl) über die ganze Aussparung verteilt und für mindestens 90 min bei 46 °C in einem 50 ml Falcon, welches ein mit Hybridisierungspuffer getränktes Papiertuch enthielt, inkubiert. Danach wurde der OT mit Waschpuffer gespült und 15 min in Waschpuffer bei 48 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde mit eiskaltem ddH₂O gespült und mit Druckluft getrocknet. Zum Färben aller Zellen wurde mit 10 µl DAPI oder SYBR Green I (1:10.000, v/v in ddH₂O) je Aussparung für 10 min im Dunkeln inkubiert, mit kaltem ddH₂O gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Durch Überschichtung mit Citifluor solution AF1 (Citifluor Ltd., London, UK) konnte der Ausbleicheffekt verzögert werden. Die Auswertung erfolgte mit einem Axio Imager M1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss), ausgestattet mit einer Halogen- und Quecksilberdampfampe. Die verwendeten Sonden und deren Absorptions- bzw. Emissionswellenlängen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Sonden und gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge

Sonde	Fluorochrom	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
C. th. 1258	Fluorescein	495	517
C. st. 440			
EUB 338	Cy5	646	664
EUB 338-II			
EUB 338-III			
	DAPI	358	461
	SYBRGreen	498	522

2.11 Proteinbiochemische Methoden

Benötigte Puffer/Lösungen

PBS-Puffer

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	6,5 mM
pH	7,1

2.11.1 Gewinnung von *C. saccharobutylicum*-Proteinextrakt

Benötigte Puffer/Lösungen

Harnstofflösung

Tris-HCl	100 mM
Harnstoff	5 M
CaCl ₂	5 mM
pH	8,5

Dialysepuffer

Tris-HCl	100 mM
Cellobiose	2 mM
NaCl	100 mM
pH	7,0

Proteinextrakt von *C. saccharobutylicum* wurde als Negativkontrolle für Western Blots gegen CelS von *C. thermocellum* verwendet. Dazu wurde eine 50 ml-Kultur bei 5000 g für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS-Puffer gelöst und zwei Mal für 5 min mit Ultraschall behandelt (Amplitude 60 %, Impulszeit 0,25 min; Ultrasonicator UP200S, Dr. Hielschler GmbH, Teltow). Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 18000 rpm, 4°C, Sorvall RG5B Plus, Thermo Scientific, Langenselbold), der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.11.2 Proteinextraktion aus Fermenterproben

Da die Bindung der Cellulasen ans Substrat sehr stark ist, mussten die Fermenterproben mit entsprechend harschen Bedingungen behandelt werden, um die Cellulasen vom Substrat abzulösen. Zum Denaturieren der Proteine (Cellulasen) wurden die Proben (ca. 100 ml) 1:1 (v/v) mit 6 M Harnstoff gemischt und 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 15000 rpm für 30 min zentrifugiert und der Überstand zum Fällen der Proteine durch langsames zutropfen mit gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt (Endkonzentration 60 %; v/v). Die Lösung wurde für mindestens 12 Std. bei 4 °C inkubiert. Um die ausgefallenen Proteine zu waschen, wurde 30 min bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 1,5

ml PBS gelöst und erneut bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde für 20 min auf einer Millipore-Membran (Millipore „V“ Series Membrane, Millipore) gegen dH₂O dialysiert und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

Die Proteinextraktion aus Kulturüberständen mit Cellulose als Substrat erfolgt analog, jedoch ohne Harnstoff-Behandlung.

2.11.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde anhand des Bradford-Assays bestimmt (Bradford 1976). Dabei wird die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung photometrisch bestimmt. Durch die Bindung an aromatische und basische Aminosäuren wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Mithilfe einer BSA-Eichgerade (Abbildung 59, S. 131) kann somit die Proteinkonzentration in einer Probe ermittelt werden. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit folgender Gleichung berechnet:

Formel 11 $\text{Gesamtproteinkonzentration [mg/ml]} = [(OD_{595-t})/m]/V$

V = Volumen der eingesetzten Probe [µl]

Reaktionsansatz

Proteinlösung	20 µl
Färbelösung ¹	750 µl

¹ Coomassie® Plus Protein Assay Reagent (BioRad)

Die Absorption bei Wellenlänge 595 nm wurde mit einem Spectrophotometer (Ultraspec plus Biochrom, Cambridge, England) gemessen. Als Nullwert wurde statt der Proteinlösung dH₂O eingesetzt. Die Proteinlösungen wurden so verdünnt, dass die Messwerte im linearen Bereich (OD < 1,0) lagen.

2.11.4 SDS-PAGE

Benötigte Puffer/Lösungen

Trenngelpuffer

Tris	36,4 g
SDS (10 %)	8 ml
dH ₂ O	ad 200 ml
pH	8,8

Sammelgelpuffer

Tris	12,2 g
SDS (10 %)	8 ml
dH ₂ O	ad 200 ml
pH	6,8

4 % Sammelgel

Sammelgelpuffer	1,25 ml
Acrylamid (30 %)	0,5 ml
dH ₂ O	3,25 ml
APS (10 %)	30 µl
TEMED	15 µl

10 % Trenngel

Trenngelpuffer	5 ml
Acrylamid (30 %)	6,7 ml
dH ₂ O	8,3 ml
APS (10 %)	100 µl
TEMED	15 µl

10x SDS-Laufpuffer

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

SDS-Auftragspuffer

250 mM Tris/HCl (pH 6,8)	3,2 ml
SDS-Lösung (20 %)	1,0 ml
Glycerin	1,0 ml
β-Mercaptoethanol	0,02 ml
Bromphenolblau	5 mg
dH ₂ O	ad 10 ml

Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Lämmli (1970). Dabei werden Proteine in Anwesenheit von SDS im Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 oder 2:1 (v/v) mit Auftragspuffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine 10 min bei 100 °C gekocht. Es wurde in jede Tasche die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit einer Mini PROTEAN® Tetra Cell-Apparatur (Biorad) für 1,5 Std. bei 20 mA pro Gel, als Größenstandard wurden 5 µl PageRuler Protein Ladder (Fermentas) aufgetragen.

2.11.5 Coomassiefärbung

Benötigte Puffer/Lösungen

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue	1,5 g
Methanol	455 ml
Essigsäure (100 %)	80 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

Entfärbelösung

Methanol	125 ml
Essigsäure (100 %)	150 ml
dH ₂ O	ad 2500 ml

Zur Anfärbung der Proteinbanden nach der Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel 30 min bei RT auf dem Schüttler in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung entfärbt, bis Banden zu erkennen waren (ca. 30 min bei RT).

2.11.6 Silberfärbung

Zur Anfärbung von gering konzentrierten Proteinen diente die Silberfärbung, welche eine höhere Sensitivität aufweist (Detektionslimit 0,2-0,6 ng/Bande, Herstellerangaben GE Healthcare). Das Prinzip beruht auf der Anlagerung von Silberionen an negativ geladene Seitenketten und Schwarzfärbung durch Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber. Die Silberfärbung wurde mit dem PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.12 Immunologische Methoden

Zum Nachweis von Proteinen werden immunologische Techniken wie Western Blot und ELISA als Standardmethoden eingesetzt. Dabei binden spezifische Antikörper an das Zielprotein. Durch ein an einen Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym, welches eine Farbreaktion auslöst, kann das Zielprotein nachgewiesen werden.

Benötigte Puffer/Lösungen

PBS

NaH ₂ PO ₄	100 mM
NaCl	150 mM
pH	7,2

Blockpuffer

Milchpulver	5 % (w/v) in PBS
-------------	------------------

Waschpuffer

Tris (pH 7,7)	50 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
BSA	0,5 % (w/v)

Zum Nachweis von *C. thermocellum* wurden von der Firma GenScript® the biology CRO, Piscataway, USA polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen die Exoglucanase CelS von *C. thermocellum* hergestellt. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Rabbit Fc (Ig G)-Alkaline Phosphatase-Konjugat (Promega), welches in einer Konzentration von 1:7500 (v/v) in Blocking-Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt wurde.

2.12.1 Dot Blot

Zur Ermittlung geeigneter Primärantikörper-Verdünnungen wurde ein Dot Blot mit *C. thermocellum* Cellulosom als Positivkontrolle und 5 % BSA als Negativkontrolle durchgeführt. Die Proteinproben wurden auf eine PVDF-Membran (Roche, Grenzach-Wyhlen) aufgetragen und nach dem Eintrocknen für 30 min in Blockpuffer inkubiert. Nach Abgießen des Blockpuffers wurde die Membran 1 Std. bei RT auf dem Schüttler mit dem Anti-CelS-Antikörper in PBS (Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:20000) inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit für je 5 min in PBS wurde der Sekundärantikörper nach Herstellerangaben eingesetzt, die Farbreaktion wurde mit dem Reagenz Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega) durchgeführt.

2.12.2 Western Blot

Benötigte Puffer/Lösungen

Transferpuffer

Tris	50 mM
Glycin	40 mM
SDS	1 mM
Methanol	20 % (v/v)

Ein Western Blot diente zum Nachweis der Cellulase CelS von *C. thermocellum*. Dabei können im Polycrylamidgel aufgetrennte Proteine nach Blotten auf eine Membran mit spezifischen Antikörpern und einer Farbreaktion nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde eine PVDF-Membran (Roche) verwendet; die Proteine haften aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche.

Die Membran wurde kurz in Methanol geschwenkt und mit dH₂O gespült. Anschließend wurde sie 5 min in Transferpuffer gelegt. Zum Blotten wurden 9 zugeschnittene und in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman No. 1, Whatman, Dassel) auf die Elektrode (Kathode) gelegt, darauf das Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran. Nach weiteren 9 zugeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Filterpapieren wurde die Anode darauf befestigt. Der Blot wurde für 1,5 Std. bei 1 mA/m² mit einer 2117 Multiphor II Electrophorese-Einheit (Pharmacia LKB Uppsala, Schweden) durchgeführt. Nach dem Blot

wurde die Membran 2 Std. bei RT mit Blockpuffer geblockt und anschließend ÜN bei 4 °C mit dem polyklonalen Primärantikörper aus Kaninchen (GenScript, Piscataway, USA) inkubiert. Nach 3-maligem Schwenken in Waschpuffer für je 20 min wurde 1 Std. bei RT mit dem Sekundärantikörper, an den alkaline Phosphatase gekoppelt war, inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 Mal 20 min mit Waschpuffer, 1 Mal Spülen mit dH₂O) wurde die Membran mit dem Substrat Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega) inkubiert. Das Substrat wurde nach ca. 30 min enzymatisch umgesetzt, was zu einer sichtbaren Bande führte. Die Reaktion wurde durch Spülen mit dH₂O gestoppt.

2.12.3 ELISA

Um die Konzentration der Exoglucanase CelS in einer Probe genau bestimmen zu können, wurde ein ELISA getestet. Die verwendeten Antikörper und das Prinzip der Antikörperquantifizierung war das gleiche wie bei Western Blot, als Substrat für die alkaline Phosphatase wurde pNPP (Calbiochem) verwendet. Die Extinktion wurde photometrisch mit einem Varioskan (Thermo Electron Corporation, USA) bei 405 nm gemessen. Es wurden jeweils 100 µl der Proben 2-fach in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Microlon 96K, Greiner Bio-one, Frickenhausen) aufgetragen. Die Standards (*C. thermocellum*-Kulturüberstand) wurden in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1, 2, 5 µg/ml jeweils 2-fach aufgetragen. Die CelS-Konzentration in den Standards wurde unter der Annahme, dass 1,2 % des Gesamtproteins CelS ist (Gold und Martin 2007), berechnet. Als Negativkontrollen diente 5 % Milchpulver in PBS. Nach Ausklopfen der Platte wurde diese 2 Mal mit 200 µl TBST gewaschen. Die 96 Well Platte wurde mit 100 µl Blockpuffer pro Vertiefung für 1,5 Std. bei RT inkubiert. Nach Ausklopfen wurden 100 µl des Primärantikörpers (1:20000 (v/v) in Blockpuffer) je Vertiefung aufgetragen und ÜN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und 3 Mal mit 200 µl Waschpuffer (TBST) gewaschen. Mit dem Sekundärantikörper wurde 1 Std. bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x mit je 200 µl TBST) wurden 100 µl pNPP je Vertiefung zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Durch die Abspaltung des Phosphatrests durch die alkalische Phosphatase entsteht das leicht gelbe *p*-Nitrophenol. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl NaOH (1 M) gestoppt. Die Menge des gebildeten Produkts wurde photometrisch bei 405 nm gemessen. Über Standardreihen mit bekannter CelS-Konzentration (Abbildung 60, Anhang S. 131) konnte die CelS-Konzentration in unbekanntenen Proben berechnet werden:

$$\text{Formel 12} \quad \text{CelS} [\mu\text{g/ml}] = (\text{Abs}_{405\text{nm}} \cdot t) / m$$

2.13 Bioinformatische Methoden

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen ARB, BLAST, DNasis, Clone Manager und BioEdit.

2.13.1 ARB

Die phylogenetische Einordnung der Clostridien Cluster III-Sequenzdaten wurde mit Hilfe der ARB-Software durchgeführt (Ludwig *et al.* 2004). Die 16S rDNA-Sequenzen wurden dabei mit einer ca. 300.000 Bakterien-Referenzsequenzen umfassenden Datenbank (www.arb-silva.de, Stand 2011) verglichen, die mit der Sequenz von *C. clariflavum* (aus ribosomal database project; <http://rdp.cme.msu.edu/>) ergänzt wurde. Es wurde ein automatischer

Sequenzvergleich (alignment) durchgeführt und manuell korrigiert. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass das Alignment der Sequenzen nur mit dem entsprechenden Genabschnitt (328 bp) der Sequenzen der SILVA-Datenbank durchgeführt wurde. Phylogenetische Dendrogramme wurden mit Hilfe der ARB-Software unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode berechnet. Die Funktion PROBE-DESIGN wurde zum Design der CIII-Primer verwendet.

2.13.2 ClustalW

Das Alignment der Cohesin-Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) durchgeführt.

2.13.3 BLAST

Die Sequenzen der 16S rDNA-Bibliotheken, erhalten aus den Anreicherungen, wurden mit BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ausgewertet. Gruppen- und speziesspezifische Primer wurden zusätzlich *in silico* mit BLAST getestet. Sequenzierte Gene (*celR*, *cipA*) wurden mit BLASTx mit der Proteindatenbank abgeglichen, um die Sequenzen und den Leserahmen zu überprüfen.

2.13.4 DNASIS

Das Programm DNASIS (Hitachi Software Engineering Europe S.A.) wurde zum Zusammenfügen von sequenzierten Genfragmenten und zur Anzeige von Primerbindestellen verwendet.

2.13.5 Clone Manager

Mit der Software Clone Manager (<http://www.scied.com>) wurden sequenzierte Gene in ihre Proteinsequenz translatiert.

2.13.6 BioEdit

Die Software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) wurde zum Alignieren von Sequenzen, zum Design und zur Überprüfung von Primern und Primerbindestellen sowie zur Bestimmung von Sequenzähnlichkeiten verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Monitoring-Methoden für Clostridien in Biogasanlagen

Um die für die Hydrolyse von Lingocellulose wichtigen Bakterien in Biogasanlagen quantifizieren zu können und die Etablierung von Inokula in Technikumsfermentern nachverfolgen zu können, wurden verschiedene Monitoring Methoden für *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, die bereits als wichtige cellulolytische Spezies beschrieben wurden (Zverlov *et al.* 2010), und für Clostridien des Cluster III (CIII), dem viele cellulolytische Spezies angehören, entwickelt und getestet.

3.1.1 qPCR

Im Rahmen der Entwicklung und Evaluierung von quantitativen Nachweismethoden für die hydrolysierenden Bakterien wurden qPCR-Assays ausgearbeitet. Aus Fermenterproben von Biogasanlagen wurde eine DNA-Isolierungsmethode mit dem Fast DNA Extraction Kit (MP Bio) etabliert, bei welchem die Zellen mechanisch mit einem Bead Beater aufgeschlossen werden. Mit den gewonnenen DNA-Proben wurde eine qPCR mit Oligonukleotid-Primern für 16S rRNA-Gene von *C. thermocellum*, *C. stercorarium* und *Bacteria* durchgeführt. Dabei wurde ein SYBR-Green-Assay verwendet. SYBR-Green I ist ein intensiver Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wodurch sich das Fluoreszenzsignal verstärkt. Die Fluoreszenzzunahme korreliert dabei mit der Zunahme des PCR-Produkts. Bei der Quantifizierung einzelner Spezies in Umweltproben ist die Spezifität der Primer besonders wichtig, um nah verwandte Nichtzielorganismen nicht zu erfassen. Außerdem könnte die Nachweisgrenze für unterrepräsentierte Spezies durch Matrixeffekte z.B. durch Inhibitoren aus Pflanzenbestandteilen erhöht sein.

3.1.1.1 Validierung

Für die Quantifizierung der Kopienzahlen in den Proben wurden 2-4 Messungen durchgeführt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Effizienz zwischen 90 und 110 % lag, R^2 sollte größer als 0,95 sein (Abbildung 15).

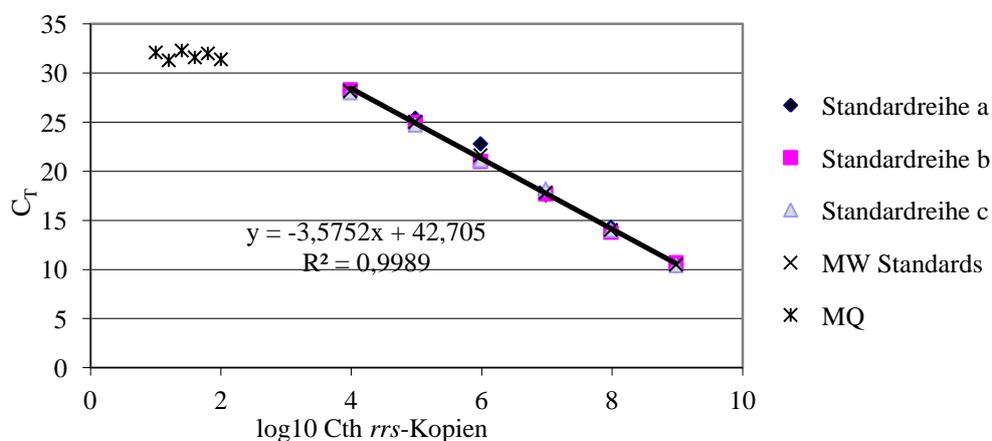


Abbildung 15: C_T-Werte von drei unabhängigen Plasmidstandard-Verdünnungsreihen, aufgetragen gegen log₁₀ der in der Probe enthaltenen *rrs* Kopien

Primerspezifität

Die Spezifität der für die Bakterienspezies *C. thermocellum* und *C. stercoarium* entwickelten 16S rDNA-Oligonukleotid-Primer wurde *in silico* mit BLASTn und experimentell in PCR-Ansätzen mit verwandten Spezies überprüft (Abbildung 16). Als Negativkontrollen dienten nah verwandte Organismen, die somit eine gewisse 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zum Target aufweisen, die aber nicht amplifiziert werden sollten. Um dies zu erreichen, wurden die PCR-Bedingungen entsprechend stringent ausgelegt. Der Fluoreszenzanstieg trat in den Proben mit Ziel-DNA mit den *C. thermocellum*- und *C. stercoarium* Primerpaaren nach deutlich weniger Zyklen ein, als mit Nicht-Ziel-DNA.

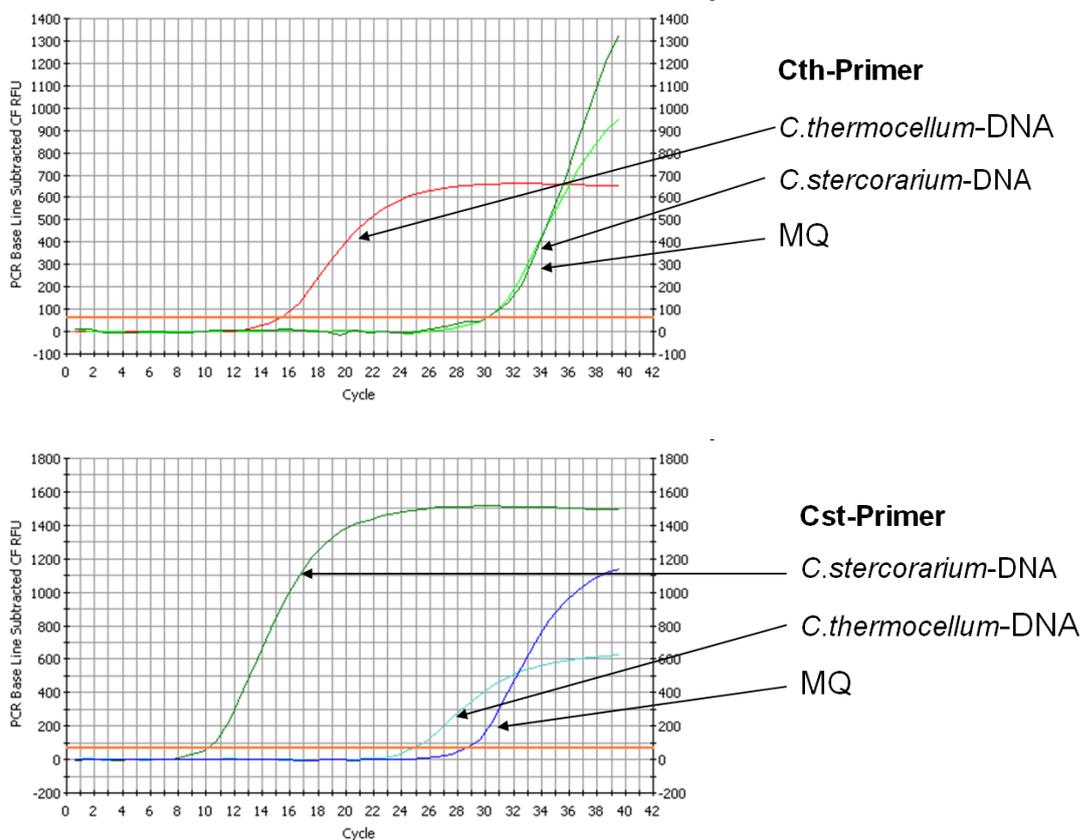


Abbildung 16: Fluoreszenzanstieg mit genomischer *C. thermocellum*-DNA, *C. stercoarium*-DNA oder ddH₂O-Wasser im PCR-Ansatz mit *C. thermocellum*- (oben) und *C. stercoarium*-spezifischen Primern (unten); es wurde jeweils die gleiche DNA-Menge eingesetzt

Außerdem wurde nach jedem qPCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um unspezifische Produkte und Primerdimere, die bei niedrigerer Temperatur aufschmelzen würden, zu identifizieren. Mit beiden Methoden konnte die Spezifität der Primer belegt werden. Die Primer für Clostridien des Cluster III, zu dem ein Großteil der cellulolytischen Clostridien gehört, wurden mit der Software ARB designet und überprüft. Die qPCR-Methode zur Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl in den Proben (als interner Standard) wurde mit publizierten Primern (Fierer *et al.* 2005) angepasst. In Abbildung 17 sind die Schmelzkurven einer qPCR mit Standards und Fermenterproben der für *C. stercoarium* bzw. *C. thermocellum* spezifischen 16S rDNA-Primer dargestellt. Die Schmelzkurven zeigen einen Peak bei 85 °C (*C. thermocellum*) und 87,5 °C (*C. stercoarium*), die theoretisch berechneten Schmelztemperaturen liegen bei 80 bzw. 83 °C. Der Peak der Standards (linke Abbildungen)

Ergebnisse

stimmt mit dem Peak der Proben (rechte Abbildungen) überein, sie befinden sich bei der gleichen Schmelztemperatur. Außerdem ist kein weiterer Peak vorhanden. Das zeigt, dass keine Primerdimere oder unspezifischen Produkte gebildet wurden, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden.

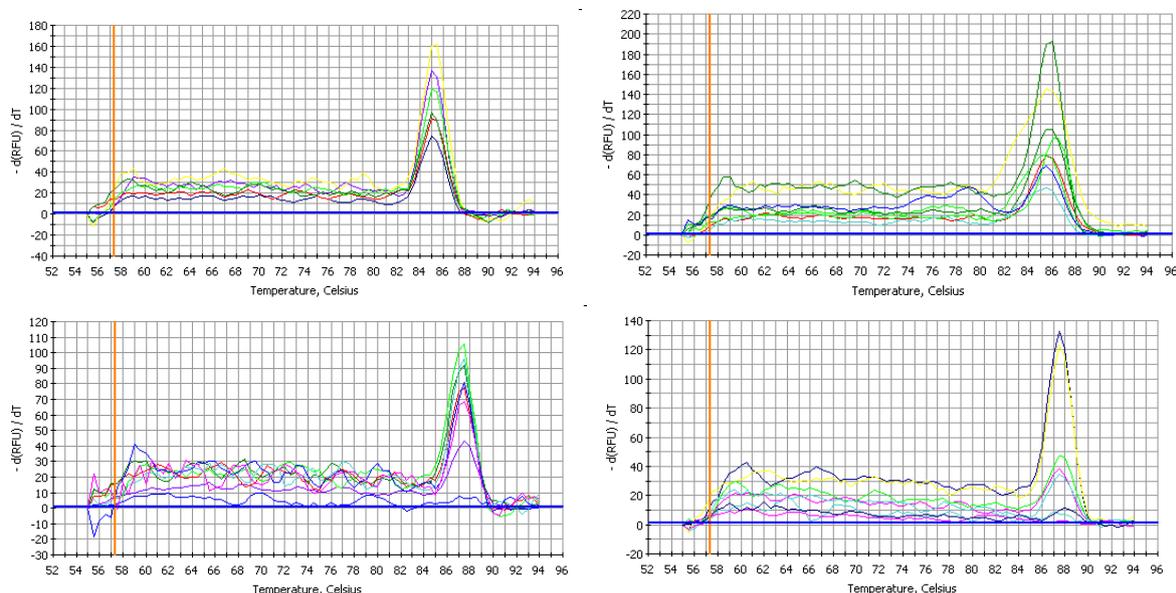


Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse mit *C. thermocellum*-Primern (oben) und *C. stercorarium*-Primern (unten); links Standards und rechts Fermenterproben

Nachweisgrenze

Anhand der Plasmidstandards konnte die Kopienzahl, die noch eindeutig nachgewiesen werden konnte, bestimmt werden. Unter der Voraussetzung von mindestens 5 Zyklen Abstand zu den C_T -Werten der Negativkontrollen lag sie für die *C. thermocellum*-Primer bei $2 \cdot 10^6$ Kopien pro ng DNA.

Vergleich der qPCR-Daten mit den Daten aus der Sequenzierung

Um die Ergebnisse verifizieren zu können, wurde eine Mischkultur mit bekannter Bakterienzusammensetzung (Kultur #10) als Kontrolle mit der entwickelten qPCR-Methode untersucht. Bei der Quantifizierung von *C. thermocellum*, *C. stercorarium* und Cluster III-Clostridien in der gDNA-Probe von Kultur #10, von der auch eine 16S rDNA-Genbank erstellt wurde (Tabelle 14, S. 62: #10 auf Silage), wurden für *C. thermocellum* ähnliche Anteile festgestellt wie bei den Sequenzdaten (30 bzw. 35 %). Die größte Abweichung tritt bei der Quantifizierung von *C. stercorarium* auf, hier ist der mit qPCR ermittelte Anteil an *Bacteria* 2,5 mal so groß wie der mit Sequenzierung ermittelte Anteil an *Bacteria* (71 bzw. 28 %). Die Sequenzierung der Genbank liefert einen CIII-Clostridien-Anteil von 63 %, mit der qPCR sind es 112 % (Abbildung 18). Somit ist der mit qPCR ermittelte CIII-Anteil an *Bacteria* 1,8 Mal so groß wie der mit Sequenzierung ermittelte CIII-Anteil.

Ergebnisse

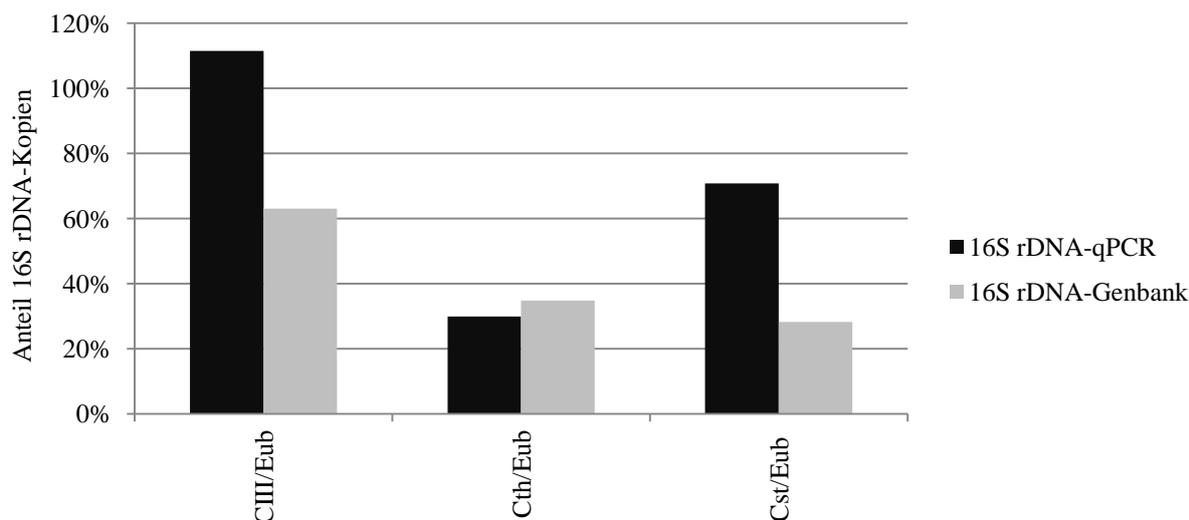


Abbildung 18: Anteile der Cluster III-Clostridien, *C. thermocellum* und *C. stercorarium* an der Gesamtbakterienzahl in Kultur #10, bestimmt mit Sequenzierung einer 16S rDNA-Genbank (n=46) sowie qPCR

3.1.1.2 Anwendung der qPCR mit Proben aus Biogasanlagen

Die *C. thermocellum*- und *Bacteria*-16S rDNA-Kopienzahlen in Proben aus Biogasfermentern wurden mit qPCR bestimmt. Von den untersuchten Biogasanlagen wurden Anlage 103 und 104 thermophil (48 und 52 °C) betrieben, (siehe Tabelle, S. 20).

Tabelle 11: C_T-Werte der qPCR für *C. thermocellum*- und *Bacteria*-16S rDNA, mit jeweils 3ng DNA im PCR-Ansatz; ND: nicht detektiert

Probe	<i>C. thermocellum</i>	<i>Bacteria</i>
6	30,5	11,9
14	29,8	13,4
25	30,8	14,2
29	29,4	15,4
33	25,0	16,0
101	25,4	14,1
102	27,5	15,2
103	29,4	12,1
104	28,4	13,7
<i>Th. mathranii</i>	30,3	ND
<i>E. coli</i>	29,8	ND
MQ	28,9	28,3

Tabelle 11 zeigt die erhaltenen C_T-Werte der Quantifizierung von *C. thermocellum* und *Bacteria* in Biogasfermenterproben mit qPCR. Die Quantifizierung erfolgte mit DNA in jeweils gleicher Konzentration, es wurden 3 ng für die Quantifizierung eingesetzt. Mit den *Bacteria*-16S rDNA-Primern lieferte die qPCR C_T-Werte zwischen 11,9 und 16,0, die

Ergebnisse

Negativkontrolle ddH₂O hatte einen C_T-Wert von 28,3. Der Abstand der C_T-Werte zwischen der Probe mit der geringsten *Bacteria*-Kopienzahl und der Negativkontrolle liegt bei 12,3 Zyklen. Da die Ziel-DNA in jedem Zyklus theoretisch verdoppelt wird, wäre das in 12,3 Zyklen eine Erhöhung um den Faktor 5042,8 ($2^{12,3}$). Somit war der Wert für die Negativkontrollen zu vernachlässigen. *C. thermocellum* dagegen war in den untersuchten Proben aus Biogasfermentern nicht nachweisbar. Die C_T-Werte der Fermenterproben waren zwischen 25,0 und 30,8 und damit im Bereich der Negativkontrollen, welche sehr niedrig waren und zwischen 28,9 und 30,3 lagen. Theoretisch sollte bei den Negativkontrollen kein Amplikon gebildet werden und somit nach 40 Zyklen kein Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Nachweis nach Anreicherung

Um zu klären, ob *C. thermocellum* unter dem Detektionslimit war oder gar nicht in den Proben vorhanden war, wurden die Fermenterproben 14, 102 und 104 bei 42 und 60 °C auf Cellulose angereichert und der *C. thermocellum*-Anteil mit qPCR bestimmt. *C. thermocellum* konnte in den 60 °C-Anreicherungen nachgewiesen werden, (C_T-Werte zwischen 15,7 und 19,0; Abbildung 19) in den 42 °C aber nicht, die C_T-Werte lagen mit 27,5 bis 28,6 nicht signifikant unter den C_T-Werten der Negativkontrollen. Das zeigt, dass *C. thermocellum* in den Fermenterproben vorhanden war, aber die entwickelte qPCR-Methode nicht sensitiv genug für einen direkten Nachweis war, was evtl. durch Co-Extraktion einer größeren Menge pflanzlicher DNA verursacht sein könnte.

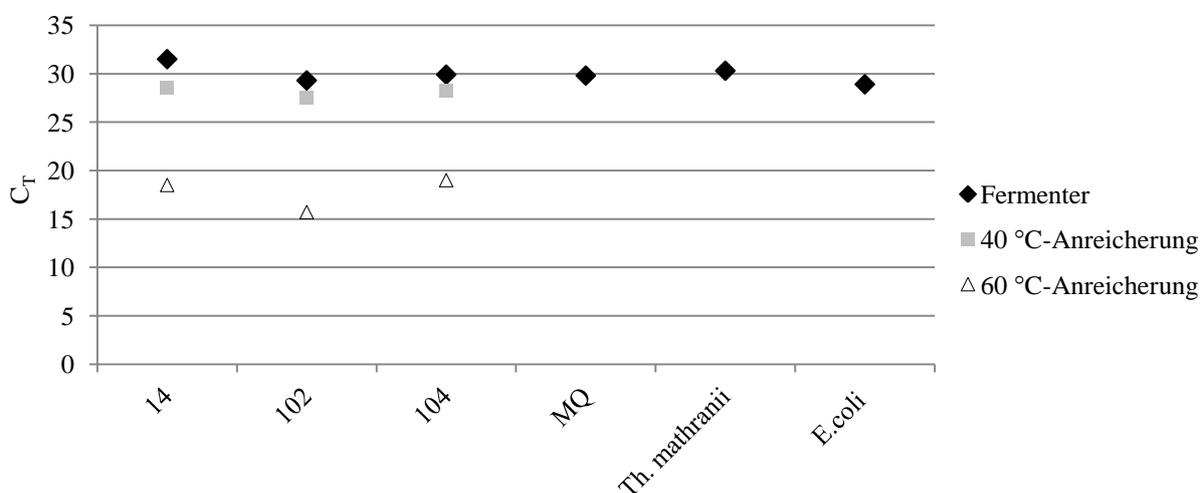


Abbildung 19: C_T-Werte der *C. thermocellum*-16S rDNA-qPCR mit DNA aus Fermenterproben und nach Anreicherung in GR-Medium mit Filterpapier bei 42 und 60 °C

3.1.2 RT-qPCR

Um den Effekt der Co-Extraktion pflanzlicher DNA zu eliminieren und damit die Nachweisempfindlichkeit auf Speziesebene zu erhöhen, wurde ein Reverse Transkriptase (RT)-qPCR-Assay entwickelt. Da dieser Nachweis auf der Amplifikation von gebildeter rRNA basiert, die bei aktiven Zellen in sehr viel höherer Kopienzahl vorliegt (ca. 15000 Kopien/Zelle, Cammarano *et al.* 1986, Woese *et al.* 1980), würden hauptsächlich die

metabolisch aktiven Bakterien im Fermenter detektiert. Für die RT-qPCR wurden die für die qPCR entwickelten *C. thermocellum*- und *C. stercorarium*-Primer, ein für *celS* von *C. thermocellum* spezifisches Primerpaar sowie Primer für Clostridien Cluster III-16S rDNA verwendet.

3.1.2.1 Methodenentwicklung und -validierung

Probentransport

Um eine Beeinträchtigung des rRNA-Gehalts durch den Probentransport auszuschließen, wurden verschiedene Transportmethoden getestet. Dabei erwiesen sich temperierte 1 l-Behälter in Styroporboxen bei einer Transportzeit von maximal 4 Stunden, und direkt anschließender RNA-Extraktion als gut geeignet. Die gemessenen Bakterien-rRNA-Kopienzahlen waren bei dieser Transportmethode im selben Bereich wie in Proben, die nach dem Transport über Nacht bei Betriebstemperatur des Fermenters inkubiert wurden.

Kontrolle des vollständigen DNA-Verdau

Um den vollständigen Verdau der DNA zu kontrollieren, wurden bei der qPCR ein RT-Ansatz, der ohne Reverse Transkriptase inkubiert wurde, mitgeführt. Bei vollständigem DNA-Verdau sind die C_T -Werte der Proben ohne Reverse Transkriptase durch Fehlen der cDNA im Bereich der Negativkontrollen, theoretisch sollte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abbildung 20). Außerdem wurde der DNA-Verdau mit Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

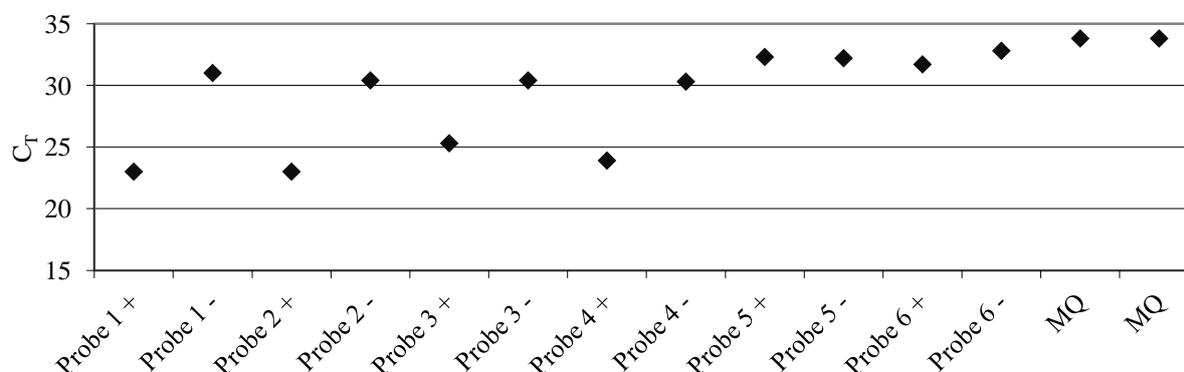


Abbildung 20: C_T -Werte der RT-qPCR von Fermenterproben mit *Bacteria*-16S rDNA-Primern (Eub338/518); mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase im Ansatz zur Überprüfung des vollständigen DNA-Verdau

Nachweisgrenze

Die über Plasmidstandards bestimmte Nachweisgrenze der RT-qPCR war bei mindestens 5 Zyklen Abstand zwischen Standard und Negativkontrolle für *C. thermocellum* bei $2,0 \cdot 10^6$ 16S rRNA-Kopien, für *C. stercorarium* bei $2 \cdot 10^5$ 16S rRNA-Kopien und für CIII-Clostridien bei $1 \cdot 10^5$ 16S rRNA-Kopien. Das heißt unter der Annahme von durchschnittlich 10.000 16S rRNA-Kopien in aktiven Zellen waren etwa 200 *C. thermocellum*-Zellen, 20 *C. stercorarium*-Zellen und 10 CIII-Clostridia-Zellen in den ca. 0,3 g für die RNA-Extraktion verwendeten Fermenterproben noch nachweisbar.

Vergleich der RT-qPCR mit Daten aus Sequenzierung

Der *C. stercorarium*-Anteil an CIII-Clostridien in drei Biogasanlagen wurde zum einen mit der Klonierung und Sequenzierung des CIII-RT-qPCR-Produkts bestimmt (entspricht Subcluster CIII-3, Tabelle 17, S.69), zum anderen mit RT-qPCR (siehe Abbildung 37). Die durch Sequenzieren erhaltenen *C. stercorarium*-Anteile sind mit 42, 13 und 38 % für Anlage Hu F2, 3F-2 und 55-1ph etwas höher als die mit RT-qPCR erhaltenen Werte (19, 2 und 17 %; Tabelle 12). Mit beiden Methoden wurde in Anlage HuF2 und 55-1ph ein höherer *C. stercorarium*-Anteil festgestellt als in Anlage 3F-2.

Tabelle 12: *C. stercorarium*-Anteil an CIII-Clostridien in Biogasanlagen HuF2, 3F-2 und 55-1ph, bestimmt mit RT-qPCR und Sequenzierung von CIII-*rrs*-cDNA-Bibliotheken

	Biogasanlage		
	HuF2	3F-2	55-1ph
RT-qPCR	19%	2%	17%
Sequenzierung von CIII-<i>rrs</i>-cDNA-Bibliotheken; n=26 (HuF2, 55-1ph), 32 (3F-2)	42%	13%	38%

3.1.2.2 Anwendung der RT-qPCR mit Proben aus Biogasanlagen

C. thermocellum-16S rRNA

Die Quantifizierungsmethode für *C. thermocellum* 16S rRNA wurde mit Proben aus zwei thermophilen Anlagen getestet. Die C_T -Werte der Proben aus Anlage 4 lagen zwischen 23,0 und 25,3 und somit deutlich unter den C_T -Werten der Negativkontrollen (34,6–35,8, Abbildung 21).

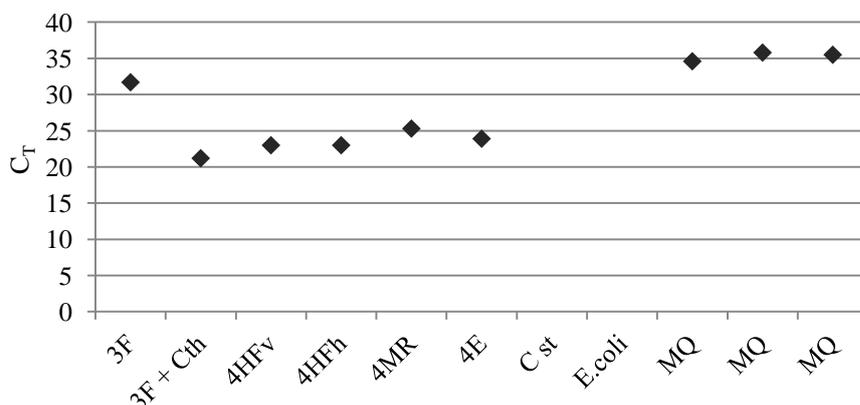


Abbildung 21: C_T -Werte der 16S rRNA-RT-qPCR mit spezifischen Primern für *C. thermocellum* und Proben aus zwei thermophilen Biogasanlagen; F: Fermenter; HFv: Hydrolysefermenter vorn; HFh: Hydrolysefermenter hinten; MR: Methanreaktor; E: Endlager

Die Negativkontrollen mit *C. stercorarium*- und *E.coli*-DNA lieferte keinen C_T -Wert. Der C_T -Wert der Probe aus Anlage 3 war bei 31,7, der Unterschied zum niedrigsten C_T einer Negativkontrolle ist 2,9 Zyklen und somit zu gering für einen eindeutigen Nachweis von *C. thermocellum* in dieser Probe. In einer vor der DNA-Extraktion mit *C. thermocellum*-

Ergebnisse

Überstand versetzten Probe aus Anlage 3 war *C. thermocellum* eindeutig nachweisbar, der C_T lag bei 21,2, was die Funktionalität der *C. thermocellum*-Nachweismethode belegt.

Die berechneten 16S rRNA Kopienzahlen in den Fermenterproben aus Anlage 4 bewegen sich im Bereich 10^{11} pro Gramm TS (Abbildung 22). Bei angenommenen 10.000 16S rRNA-Kopien je Zelle wären das 10^7 *C. thermocellum* pro Gramm TS. Da der TS-Gehalt dieser Proben 10 % ausmacht, wären also 10^6 *C. thermocellum* in 1 g Fermenterinhalt. Das bedeutet, dass unter der Annahme von ca. 10^9 Bakterien pro g Fermenterinhalt in Anlage 4 1/1000 der Bakterien *C. thermocellum* sind.

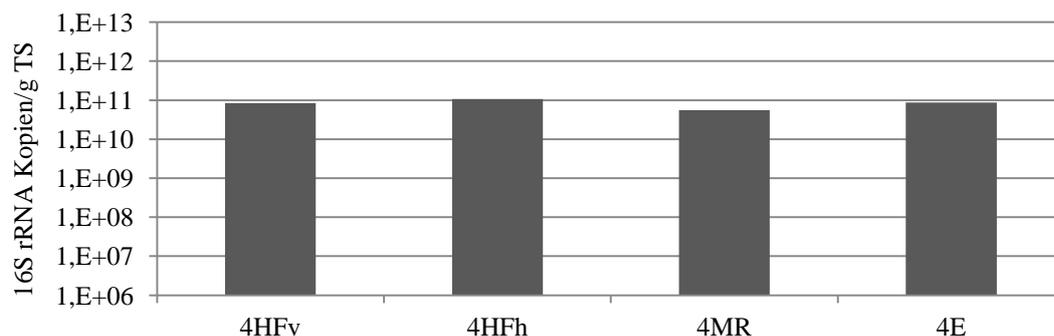


Abbildung 22: *C. thermocellum*-16S rRNA-Kopienzahlen in Fermentern der Biogasanlage 4, bestimmt mit RT-qPCR; HFv: Hydrolysefermenter vorn; HFh: Hydrolysefermenter hinten; MR: Methanreaktor; E: Endlager; n=1

C. thermocellum-*cels*-mRNA

Zusätzlich zu den *C. thermocellum*-16S rDNA-Primern wurden auch Primer für *cels* von *C. thermocellum* verwendet, um die Transkription der für den Celluloseabbau wichtigen Exoglucanase CelS messen zu können und die cellulolytische Aktivität von *C. thermocellum* quantifizieren zu können. Mit diesen Primern wurde die *cels*-mRNA in den Proben aus Anlage 4, in denen 16S rRNA von *C. thermocellum* nachgewiesen werden konnte, quantifiziert. Wie in Abbildung 23 ersichtlich, war in keiner der Proben eine für die Quantifizierung ausreichende *cels*-mRNA Konzentration vorhanden. Der Unterschied der C_T -Werte der Proben zu den Negativkontrollen war maximal 3,7 Zyklen und damit nicht signifikant.

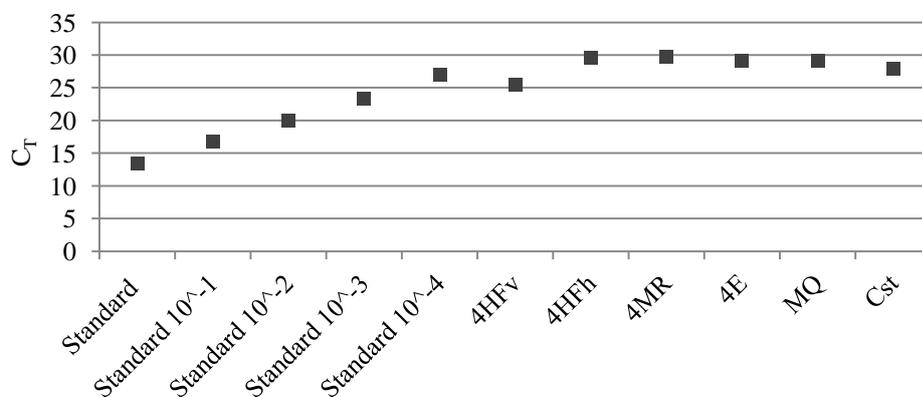


Abbildung 23: C_T -Werte der *cels*-RT-qPCR mit Proben 4HFv, 4HFh, 4MR und 4E aus Biogasanlage 4; HFv: Hydrolysefermenter vorn; HFh: Hydrolysefermenter hinten; MR: Methanreaktor; E: Endlager

3.1.3 FISH

Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) werden Bakterien über spezifische Sonden, die an die rRNA hybridisieren und mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden, nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden Sonden für *C. thermocellum* mit Reinkulturen in synthetischem Medium (GS2) erfolgreich getestet (Abbildung 24, links). In GR-Medium und Fermenterproben war der Nachweis von Bakterien aufgrund der Hintergrundfluoreszenz des ligninhaltigen Materials, das sich nicht vollständig abtrennen ließ, z.T. schwierig (Abbildung 24, rechts). Eine von Lunau *et al.* (2005) beschriebene und leicht modifizierte Methode, um Bakterien aus Sedimenten und trüben Umgebungen zu mikroskopieren, wurde angewandt. Die Bakterien wurden mit Ultraschallbehandlung von der Substratoberfläche gelöst und durch Zentrifugation getrennt. Ausschließlich mit der für die Sonde geeigneten Anregungswellenlänge konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, mit den anderen zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen nicht (Abbildung 25). Allerdings waren die Ergebnisse nicht für alle Proben reproduzierbar, und je nach Beschaffenheit der Fermenterproben war die Hintergrundfluoreszenz trotz der Vorbehandlung z.T. sehr stark. Weitere Vorbehandlungsmethoden, wie die Behandlung mit Toluidinblau nach Smith und McCully (1978) und Kryoschnitte, wurden getestet, aber ohne Erfolg. Deshalb wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung als Monitoring-Methode für Bakterien in Biogasanlagen nicht weiter verfolgt.

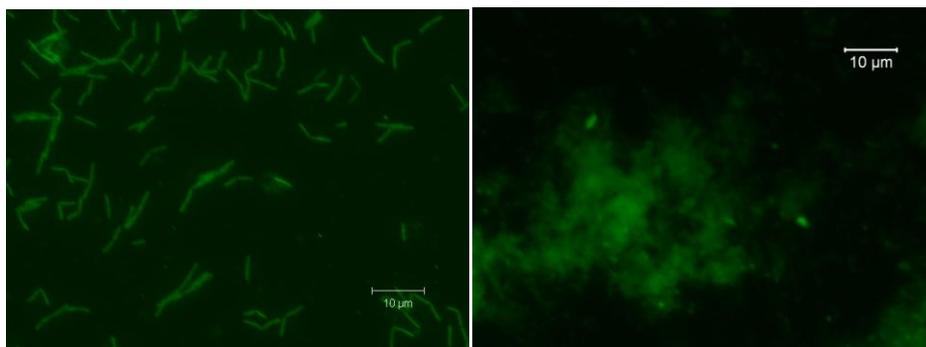


Abbildung 24: FISH mit *C. thermocellum*-Sonde (*C. thermocellum*1258; Burell *et al.* 2004), getestet mit *C. thermocellum*-Reinkultur in synthetischem Medium GS2 (links) und in GR-Medium (rechts)

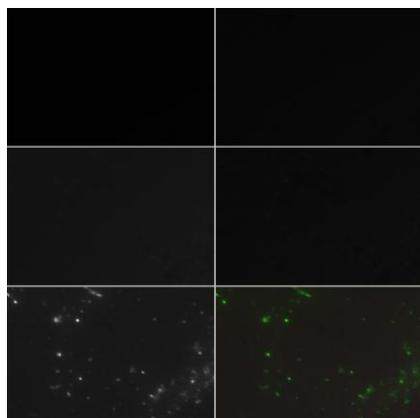


Abbildung 25: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung einer vorbehandelten Fermenterprobe mit der *C. thermocellum*-Sonde; Aufnahmen bei verschiedenen Anregungswellenlängen; unten rechts ist die Überlagerung aller Aufnahmen

3.1.4 Immunologische Nachweismethoden

Über eine phylogenetische Einordnung spezifischer Bakterien kann keine Aussage über die Fähigkeit zur Hydrolyse von Polysacchariden getroffen werden, da sich innerhalb eng verwandter Bakterien sowohl hydrolytische als auch nicht-hydrolytische Arten befinden können. Neben der Untersuchung der Transkription von Genen, die für hydrolytische Proteine codieren, stellen Proteom-Analysen eine geeignete Möglichkeit dar, hydrolytischen Hauptvertreter in Biogasanlagen zu identifizieren. Durch den Nachweis von Cellulasen könnten gezielt hydrolytisch aktive Bakterien quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurden immunologische Nachweismethoden für CelS von *C. thermocellum* entwickelt und getestet.

Die Isolierung von cellulolytischen Proteinen erfolgte durch Denaturierung mit Harnstoff und anschließender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung. Die Denaturierung mit SDS und eine Ultrafiltration mit 100 K Macrosep Säulen (Pall) erwiesen sich als ungeeignet, da die Membranen durch Partikel in der Fermenterprobe verstopften, und mit SDS nicht genügend Protein gewonnen werden konnte.

3.1.4.1 Western Blot

Proteinextraktion aus Fermenterproben und Antikörperspezifität

Um die Proteinextraktionsmethode und die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden extrazelluläre Proteine aus einer *C. thermocellum*-Reinkultur, einer Fermenterprobe versetzt mit *C. thermocellum*-Reinkultur 1:1 (v/v) (Positivkontrollen), einer Fermenterprobe, sowie *Clostridium saccharobutylicum*-Zellextrakt als Negativkontrolle mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot mit polyklonalen Anti-CelS-Antikörpern durchgeführt. Dabei konnte CelS (82 kDa) in den Positivkontrollen [Abbildung 26 (1), (2)] nachgewiesen werden. In der Fermenterprobe und der Negativkontrolle konnte CelS nicht nachgewiesen werden [Abbildung 26 (3), (4)].

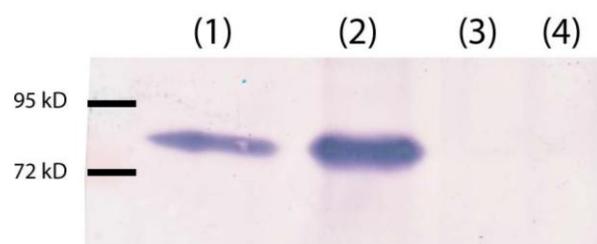


Abbildung 26: Western Blot mit Antikörpern gegen CelS von *C. thermocellum*; (1) *C. thermocellum*-Reinkultur in GR-Medium und Cellulose; (2) Fermenterprobe+*C. thermocellum*-Reinkultur (1:1, v/v) in GR-Medium; (3) Fermenterprobe; (4) Negativkontrolle *C. saccharobutylicum*; jeweils 3,54 µg Protein aufgetragen

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze der CelS-Antikörper im Western Blot wurde mit einer CelS-Konzentrationsreihe von 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,35, 0,5, 1 und 2 µg Protein (Überstand der *C. thermocellum*-Mutante SM901, die keine Cohesine exprimiert) bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass 1,2 % der Proteine CelS sind (Gold und Martin 2007), waren 2,4 ng CelS noch zu erkennen; das entspricht 0,2 µg Gesamtprotein (Abbildung 27).

Ergebnisse

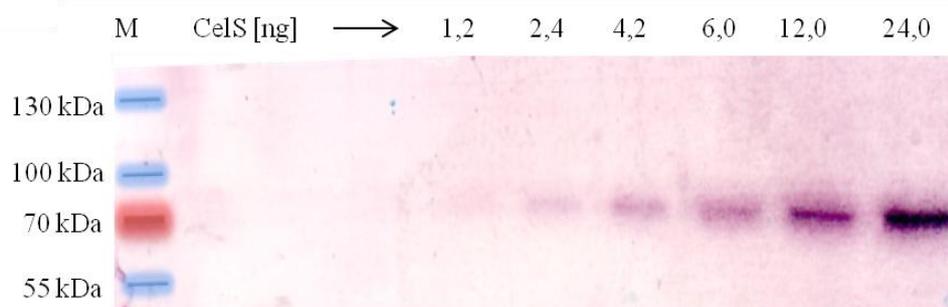


Abbildung 27: Bestimmung der Nachweisgrenze für *C. thermocellum*-CelS mit Anti-CelS-Antikörpern; aufgetragen wurde Protein aus Überstand der *C. thermocellum*-Mutante SM901, die keine Cohesine exprimiert; M: Protein-Größenstandard

Western Blot mit Fermenterproben

Um die Anwendung des Western Blots in der Praxis zu testen, wurde dieser mit Fermenterproben, in denen *C. thermocellum* mit RT-qPCR nachgewiesen werden konnte, durchgeführt. Im mit *C. thermocellum* inokulierten Modellfermenter der Universität Hohenheim (Kapitel 3.7.2, S. 89) konnte CelS jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 2828, HF+In). Die Verdünnung der *C. thermocellum*-Reinkultur durch die Inokulation in den Fermenter betrug 1:10 (v/v). In der Positivkontrolle HF+Cth (1:1), bei der die Fermenterprobe 1:1 (v/v) mit *C. thermocellum*-Reinkultur versetzt wurde, konnte die *C. thermocellum*-Cellulase CelS detektiert werden.

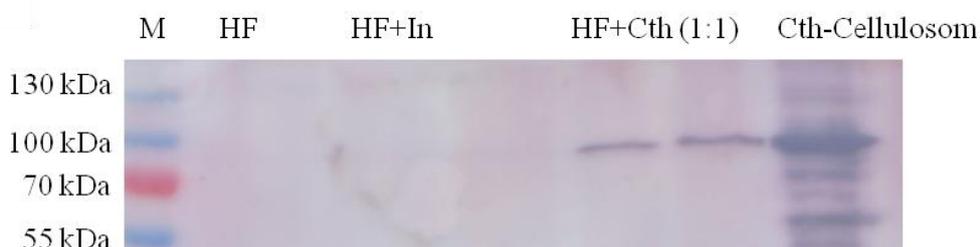


Abbildung 28: Anti-CelS Western Blot mit Proben aus Hydrolysefermenter Hohenheim vor Inokulation (HF), Hydrolysefermenter Hohenheim mit *C. thermocellum* NB2 (HF+In; 2x aufgetragen), Positivkontrollen Hydrolysefermenter mit *C. thermocellum*-Überstand [HF+Cth (1:1), 2x aufgetragen] und aus *C. thermocellum*-Kultur gereinigtes Cellulosom; jeweils 1/100 des Gesamtprotein aus 250 ml-Fermenterprobe bzw. 50 ml-Reinkultur aufgetragen; M: Protein-Größenstandard

3.1.4.2 ELISA

Da ein Proteinnachweis über einen Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) eine sensitive Quantifizierung der Proteinmenge erlaubt, wurde diese Methode mit den im Western Blot eingesetzten Antikörpern getestet.

Mit dem entwickelten ELISA konnte in den Batchkulturen mit *C. thermocellum* bzw. der *C. thermocellum*-enthaltenden Mischkultur #10 CelS nachgewiesen werden, sowohl auf Cellulose, als auch auf Substrat 1 gewachsen (Abbildung 29). Die CelS-Konzentration ist bei der auf Substrat 1 gewachsenen *C. thermocellum*-Reinkultur geringer (2,0 µg/ml) als in der auf Cellulose gewachsenen (2,8 µg/ml). In einer Fermenterprobe (250 ml) konnte CelS auch nach vorheriger Zugabe von Protein aus 50 ml *C. thermocellum*-Kulturüberstand nicht nachgewiesen werden, die Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle. Das zeigt, dass der

Ergebnisse

immunologische Nachweis der *C. thermocellum*-Cellulase CelS prinzipiell möglich ist. Um diesen Test in der Praxis anzuwenden, müsste er aber optimiert werden.

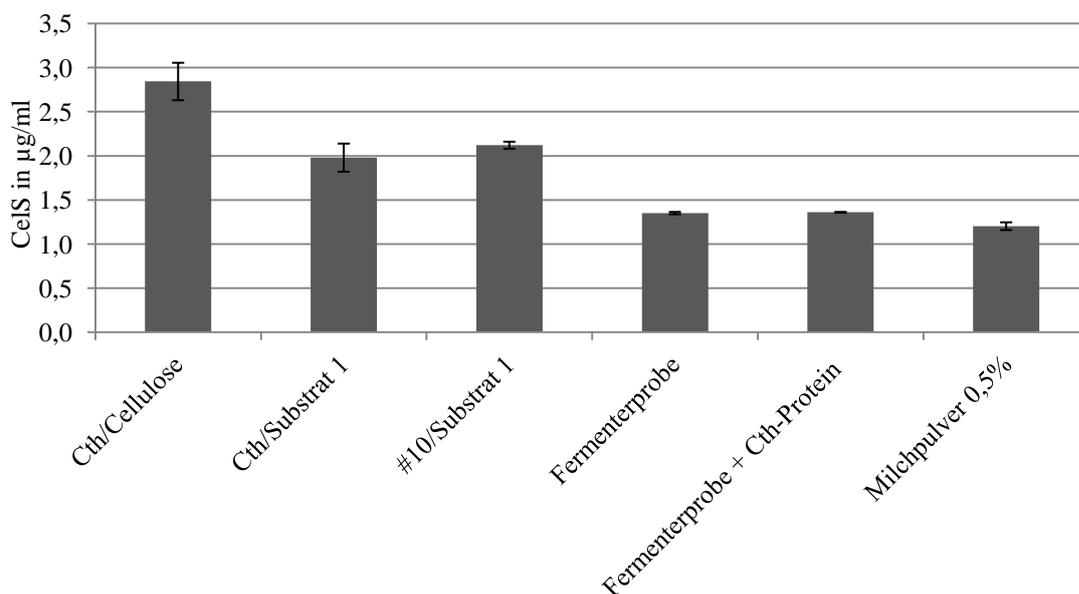


Abbildung 29: ELISA mit Anti-CelS-Antikörpern und Kulturüberständen von *C. thermocellum*- bzw. Anreicherung #10 als Positivkontrollen sowie einer mit RT-qPCR für *C. thermocellum* positiv getesteten Fermenterprobe, einer mit Protein aus *C. thermocellum*-Kulturüberstand gespickten Fermenterprobe und einer Negativkontrolle; n=2

3.2 Medium für cellulolytische Kulturen

Um cellulolytische Kulturen aus Umweltproben anzureichern, wurde ein Medium bestehend aus 25 % Gärrest in Leitungswasser (GR-Medium) getestet. Es zeigte sich, dass in einer Mischung aus flüssigem, abzentrifugiertem Gärrest aus einer einphasigen Biogasanlage (Pellmeyer) und Leitungswasser cellulolytische Kulturen angereichert werden konnten. Dabei hatte die Konzentration des Gärrestes einen Einfluss auf Wachstum und Abbaurate der hydrolytischen Kulturen. Weitergehende Versuche zeigten, dass hydrolytische Bakterienkulturen mit 25 % GR in Leitungswasser mindestens ebenso gut wachsen wie in synthetischen, speziell auf die Clostridien-Anzucht zugeschnittenen Labormedien.

3.2.1 Gärrest (GR)-Medium

Flüssiger GR hat sich als geeigneter Medienzusatz für hydrolytische Bakterien erwiesen. Die optimale Menge an flüssigem GR wurde mit der cellulolytischen Anreicherung #10 (Tabelle 13, S. 61) bei 60 °C und pH 7,4 ausgetestet, d.h. die Menge an Faserabbau (Abnahme der TS) in Gegenwart verschiedener Mengen an GR nach drei Tagen gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von GR zum Medium stimulierend auf den Abbau wirkt. Je höher der GR-Anteil ist, desto höher ist der Abbau. So wird ohne GR ein Substratabbau von 2,1 % erreicht, mit 20 % GR ein Abbau von 16,6 % und mit 40 % GR ein Substratabbau von 28,7 % nach drei Tagen erreicht (Abbildung 30). Der Anfangs-pH-Wert steigt mit zunehmendem GR-Anteil von 6,4 (0 % GR) auf 7,1 (40 % GR). Der End-pH nach drei Tagen ist mit 0 % GR bei 6,3, mit 40 % GR ist er bei 5,8. Die größere pH-Absenkung mit zunehmendem GR-Anteil spiegelt die vermehrte Säurebildung und somit auch eine höhere Hydrolyserate wider.

Ergebnisse

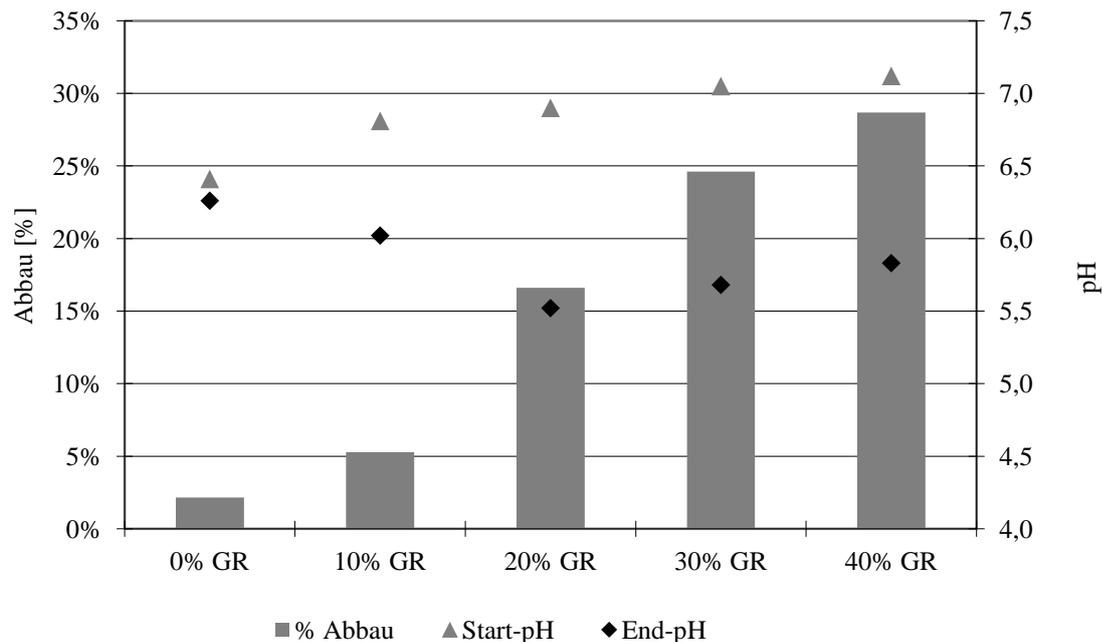


Abbildung 30: Substratabbau (Substrat 1) durch Kultur #10 nach 3 Tagen bei 60 °C mit verschiedenen GR-Anteilen, sowie entsprechende Anfangs- und End-pH-Werte; n=1

3.2.2 Medium für Einzelkolonieausstrich auf Platte

Auf Basis der Ergebnisse durch GR-Zugabe im Medium wurden GR in verschiedenen Konzentrationen zum Isolieren von cellulolytischen Reinstämmen ins Medium zugegeben. Es zeigte sich, dass ein geringer Gärrestanteil von 1 % (Tabelle 6, S. 25, Methoden 1 und 2) zum sichtbaren Wachstum von Kolonien mit Hofbildung durch Cellulose-Hydrolyse führte (Abbildung 31). Es wurden sowohl mit einem Verdünnungsausstrich als auch durch Mischen einer geeigneten Verdünnung mit dem Overlay-Agar vor dem Überschichten der Agarplatte in einer sauerstofffreien Stickstoffatmosphäre gute Ergebnisse erzielt. Nach 3-maligem Ausplattieren der cellulolytischen Stämme wurden diese in flüssiges GS2-Medium mit Cellulose (Filterpapier Whatman No. 1) überimpft und bei 60 °C inkubiert.

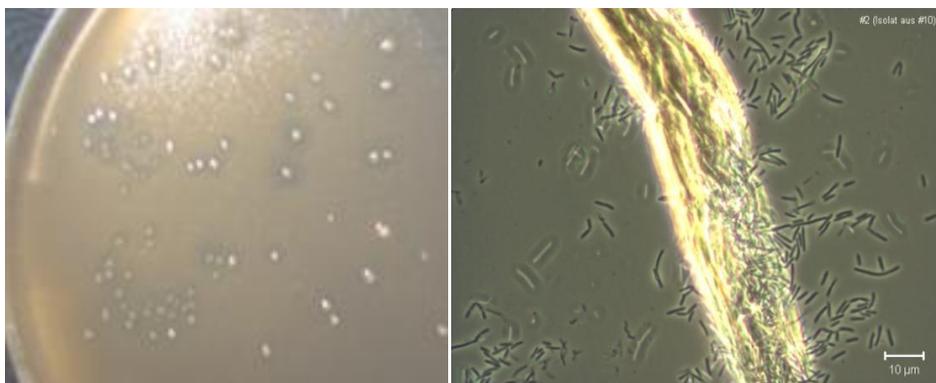


Abbildung 31: Platte mit Höfen (Cellulose-Hydrolyse) und lichtmikroskopische Aufnahme eines *C. thermocellum*-Isolats mit Cellulosefaser

3.3. Cellulolytische Kulturen: Zusammensetzung der Anreicherungen und phylogenetische Einordnung der Isolate

Die Hydrolyse von Lignocellulose stellt den „Flaschenhals“ bei der Methanisierung von Biomasse in Biogasanlagen dar. Da hier ein großes Potential zur Effizienzsteigerung von Biogasanlagen herrscht, war die Untersuchung cellulolytischer Bakterienkulturen ein wichtiger Punkt dieser Arbeit. Um das hydrolytische Potential von Mischkulturen zu untersuchen, wurden aus 30 verschiedenen Quellen (Mist, Kompost, Biogasfermenter, Viehweiden, Erde, Malztreber, Gärrest) Kulturen mit Cellulose als Kohlenhydratquelle angereichert. Durch Analyse des Abbaupotentials mit effektiv Cellulose-abbauenden Anreicherungen und deren Bakterienzusammensetzung sollten Hinweise auf für die Hydrolyse besonders geeignete Bakteriengattungen und -gruppen und der mögliche Einsatz solcher Anreicherungen als Inokula von Biogasanlagen erörtert werden. Die mit Filterpapier effizientesten Anreicherungen wurden für weitergehende Analysen ausgewählt. Die Anreicherungen wurden mit zwei Modellsubstraten inkubiert und das hydrolytische Potential über den erzielten Abbau bestimmt, sowie ihre bakterielle Zusammensetzung untersucht. Da eine der Anreicherungen als Inokulum für Modellfermenter eingesetzt werden sollte, wurden mit dieser Kultur die optimalen Bedingungen für die Hydrolyse getestet. Zusätzlich wurden aus den Anreicherungen cellulolytische Reinstämme isoliert. Die Reinstämme wurden phylogenetisch eingeordnet und ihre Abbaueffizienz bestimmt. Der beste (pH-Toleranz, hydrolytisches Potential) Reinstamm wurde ebenfalls als Inokulum eines Modellfermenters verwendet.

3.3.1 Cellulolytische Mischkulturen

3.3.1.1 Anreicherung

Aus 30 verschiedenen Quellen wurden cellulolytische Kulturen mit Cellulose (Filterpapier) als Substrat unter verschiedenen Bedingungen angereichert; die Kulturen, die den effizientesten Filterpapierabbau bei den jeweiligen Bedingungen zeigten, wurden für weitere Analysen ausgewählt. Ein Teil der Kulturen wurde pasteurisiert, um Sporenbildner selektiv anzureichern. Bei pH 7,4 und 60 °C (bzw. 65 °C) waren Anreicherungen #10 (aus Mist), BK (Biokompost Wurzer) und LfL (Kultur aus LfL-Fermenter; Maissilage, mesophil) die besten hydrolytischen Kulturen mit Filterpapier (Tabelle 13). Außerdem wurden im thermophilen Bereich (60 °C) Anreicherungen bei pH 5,6 durchgeführt, die drei Kulturen mit effizientem Filterpapierabbau waren Kulturen A, B und C. Der pH-Wert 5,6 war der niedrigste pH-Wert, bei welchem aus dem vorhandenen Probenmaterial cellulolytische Kulturen angereichert werden konnten. Niedrige pH-Werte sind eine Voraussetzung für eine reine Hydrolysestufe in Biogasfermentern, da dadurch eine Methanogenese unterdrückt werden kann (Prozessmodell Biogas IV, 2010). Zum Vergleich mit mesophilen Anreicherungen wurde mit Proben aus 13 Biogasanlagen zusätzlich bei 42 °C und pH 7,4 angereichert. Hier zeigten sich Kultur F14 und Kultur F102, beide aus Pilot-Biogasanlagen der LfL, als geeignete hydrolytische Kulturen. Zusätzlich wurden bei 60 °C und pH 7,4 cellulolytische Kulturen aus den 13 Biogasanlagen ohne Selektion besonders effizienter Celluloseabbauer angereichert, um das hydrolytische Potential der ausgewählten Anreicherungen #10, BK und LfL mit dem der Bakterien in Biogasanlagen vergleichen zu können.

Tabelle 13: Übersicht der analysierten Mischkulturen

Kultur	Quelle	Vorbehandlung	Temperatur	pH
#10	Misthaufen	pasteurisiert	65 °C	7,4
BK	Biokompost Wurzer	nicht pasteurisiert	60 °C	7,4
LfL	thermophiler einphasiger Fermenter der LfL (Mono-Mais)	nicht pasteurisiert	60 °C	7,4
F14	Pilotanlage 14	nicht pasteurisiert	42 °C	7,4
F102	Pilotanlage 102	nicht pasteurisiert	42 °C	7,4
A	Trockenvergärungsanlage AWM	nicht pasteurisiert	60 °C	5,6
B	HuF2	nicht pasteurisiert	60 °C	5,6
C	TraNG	nicht pasteurisiert	60 °C	5,6

3.3.1.1 Bakterienzusammensetzung

Die besten Anreicherungen (effizientester Filterpapierabbau) wurden auf ihre Bakterienzusammensetzung hin untersucht. Dazu wurden 16S rDNA-Genbanken sequenziert und z.T. durch ARDRA eine Gruppierung von OTUs (operational taxonomic unit) als Vorauswahl durchgeführt (Kultur #10, BK und LfL). Aus jeder Gruppe wurden mindestens zwei Klone sequenziert. Von Kultur #10 wurden ca. 1450 bp der 16S rDNA sequenziert, von den anderen Kulturen Partialsequenzen mit ca. 900 – 1000 bp.

Thermophile Anreicherungen, pH 7,4

In Kultur BK (40 Klone analysiert) waren Bakterien mit 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zu *Clostridium caenicola* (23 %, Shiratori *et al.* 2009, Sequenzähnlichkeit ≥ 92 %), *C. thermocellum* (5 %, Sequenzähnlichkeit 94 %), zu bisher nicht kultivierten *Firmicutes* (8 %) und *Clostridiaceae* Bakterium Aso3 (3 %; Sequenzähnlichkeit 92 %) und 63 % *Bacillus* sp. (Abbildung 32). In Anreicherung #10 (30 Klone analysiert) waren zu *C. thermocellum* (50 %, Sequenzähnlichkeit 98 %) und *Thermoanaerobacter* sp. (17 %, Sequenzähnlichkeit 97 %) verwandte Bakterien sowie 17 % *Clostridiaceae* Bakterium Aso3 (Sequenzähnlichkeit 97 %) und 17 % Bakterien, deren 16S rDNA-Sequenzen 91 % Übereinstimmung mit bisher unkultivierten Bakterien des Phylum *Firmicutes* zeigten. Anreicherung LfL zeigte bei der Analyse von 23 Klonen die größte Diversität der drei thermophilen Anreicherungen (bei pH 7,4). Diese Anreicherung enthielt Bakterien mit Sequenzähnlichkeit zu *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (26 %, McClung 1935, Sequenzähnlichkeit ≥ 94 %), *Clostridium thermopalmarium* (22 %, Soh *et al.* 1991, Sequenzähnlichkeit 98 %), *C. stercorarium* (9 %, Sequenzähnlichkeit 94 %), *Thermobrachium celere* (4 %, Sequenzähnlichkeit 98 %) und unkultivierte Bakterien des Phylum *Firmicutes* (39 %), darunter 17 % *Bacillus* sp. In Anreicherungen #10 und LfL ist der Anteil an Bakterien der Klasse *Clostridia* mit jeweils 83 % sehr hoch. In Anreicherung BK war ein hoher Anteil an *Bacilli* (63 %) der Anteil an *Clostridia* lag bei 30 %. Der Anteil Bakterien mit hoher Sequenzähnlichkeit zu bekannten und kultivierten cellulolytischen Spezies ist in den nicht-pasteurisierten Anreicherungen BK und LfL mit 5 % zu *C. thermocellum* verwandten bzw. 9 % zu *C. stercorarium* verwandten sehr gering, in der pasteurisierten Anreicherung #10 mit 50 % zu *C. thermocellum* verwandten Bakterien deutlich höher.

Ergebnisse

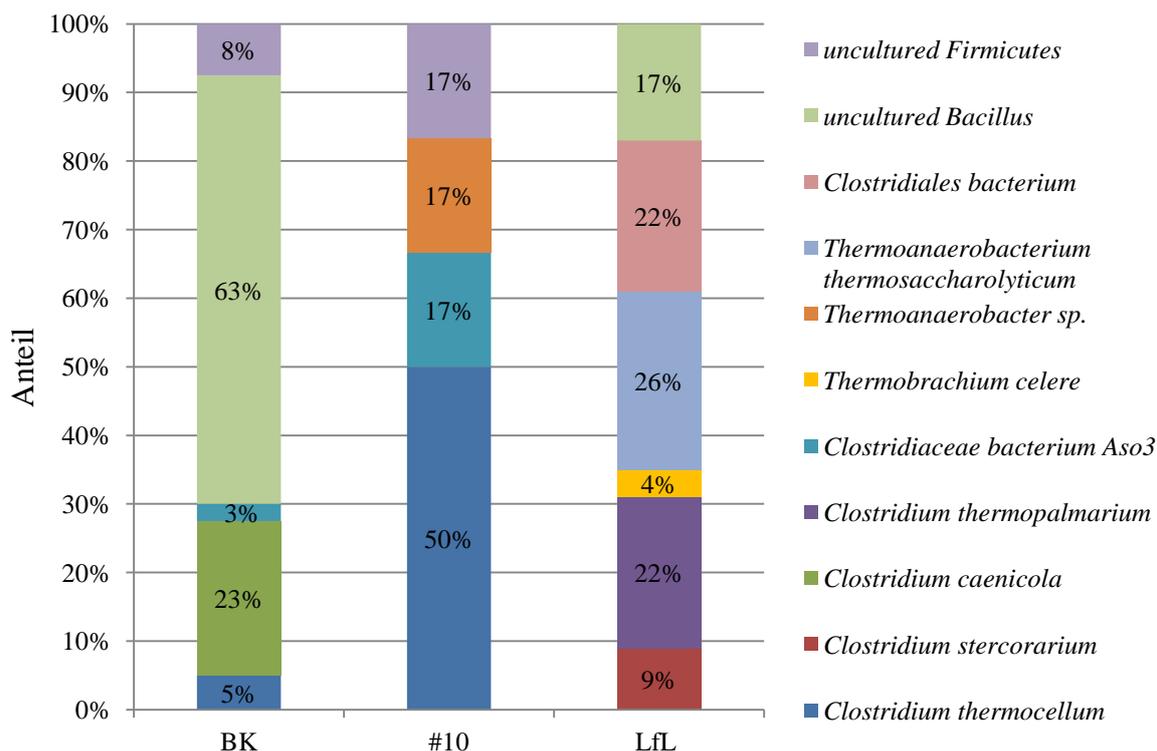


Abbildung 32: Nächste verwandte Bakterien der bei 60 °C und pH 7,4 angereicherten cellulolytischen Kulturen; Sequenzen erhalten mit allgemeinen *Bacteria*-16S rDNA-Primern (616/630); Gruppierung mit ARDRA (für Anreicherung #10 und LfL); Auswertung mit BLAST; BK: n=40, #10: n=30, LfL: n=23

Einfluss des Substrats auf die Bakterienzusammensetzung

Der Einfluss des Substrats auf die Bakterienzusammensetzung wurde mit Kultur #10 bei 60 °C in 10 % sterilfiltriertem GR-Medium untersucht. Als Substrat wurden Cellulose (Whatman Filterpapier) und Silage (Substrat 1) verwendet.

Tabelle 14: Substratabhängige Zusammensetzung der thermophilen Anreicherungen #10; Sequenzen erhalten mit allgemeinen *Bacteria*-16S rDNA-Primern (616/630), Auswertung mit BLAST

BLAST-Ergebnis	Anteil [%]		Sequenzähnlichkeit
	Cellulose n=30	Silage n=46	
<i>Clostridium thermocellum</i>	50	35	96-100 %
<i>Clostridium stercorarium</i>		28	91-100 %
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	17	4	95-100 %
<i>Clostridiaceae</i> Bakterium Aso3	17	22	99-100 %
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863		4	92 %
uncultured <i>Firmicutes</i>	17	4	
uncultured <i>Bacillus sp.</i>		2	
Gesamt	100 %	100 %	

Ergebnisse

Mit dem Mischsubstrat Silage (Substrat 1) war die Diversität höher als mit Cellulose, es wurden sieben OTUs gefunden (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu tauchten in der auf Cellulose gewachsenen Kultur nur vier OTUs auf. Zu *C. stercorarium* verwandte Bakterien taucht nur nach Kultivierung mit Silage auf (28 %), außerdem waren in Anreicherung #10 nach Wachstum auf Silage zu *Symbiobacterium thermophilum* verwandte Bakterien (4 %, Ohno *et al.* 2000) und nicht-kultivierte *Bacillus* sp. (2 %). Der Anteil an *Thermoanaerobacter* sp. und an *C. thermocellum* nahm nach Wachstum auf Silage ab (von 17% auf 4 % und von 50 % auf 35 %), auch der Anteil an nicht-kultivierten *Firmicutes* nahm von 17 % auf 4 % ab.

Thermophile Anreicherungen, pH 5,6

Die Sequenzierung von jeweils 31 Klonen aus Anreicherungen A, B und C zeigte, dass der Anteil an *Clostridia* in den drei thermophilen Anreicherungen bei pH 5,6 jeweils 100 % betrug; die Anreicherungen A, B und C enthielten zu *C. cellulosi* (He *et al.* 1991, Sequenzähnlichkeit 94-99 %) verwandte Spezies (81, 68 und 10 %) als vermutlich cellulolytische Mikroorganismen (Abbildung 33). In Anreicherung C war neben *C. cellulosi* Bakterien mit 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* (77 %, Sequenzähnlichkeit 98-99 %) vermutlich cellulolytisch. In Anreicherung A kamen zusätzlich 13 % *Caloramator* sp. vor. In Kultur B kam ein Bakterien-Cluster vor, welches die größte Sequenzähnlichkeit zu *Clostridium thermosuccinogenes* (Drent *et al.* 1991) hat (3 %, Sequenzähnlichkeit 97 %) und ein weiteres mit Sequenzähnlichkeit zu *Coprothermobacter proteolyticus* (26 %, Ollivier *et al.* 1985, Sequenzähnlichkeit 99 %). Anreicherung C enthielt zu *C. thermosuccinogenes* (10 %, Sequenzähnlichkeit > 96 %) verwandte Bakterien. In allen drei Anreicherungen waren weitere *Clostridium* sp. (6 und 3 %).

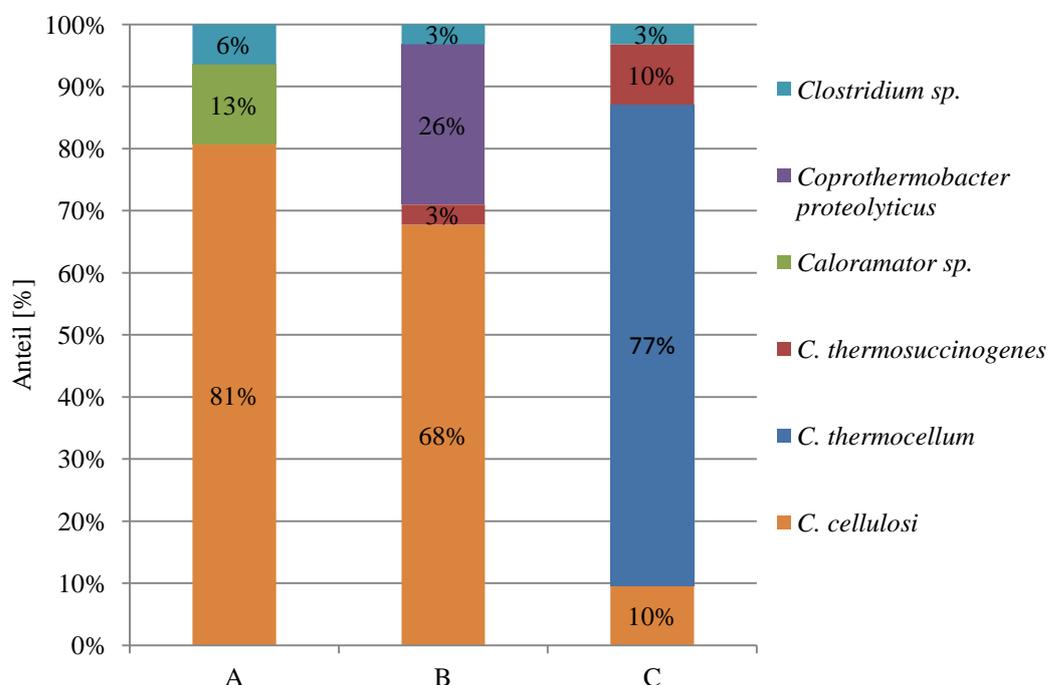


Abbildung 33: Nächste verwandte Bakterien der bei pH 5,6 und 60 °C angereicherten cellulolytischen Kulturen; Sequenzen erhalten mit allgemeinen *Bacteria*- 16S rDNA-Primern (616/630), ausgewertet mit BLAST; A, B, C jeweils n=31

Mesophile Anreicherungen, pH 7,4

Die Analyse der beiden mesophilen Anreicherungen F14 und F102 ergab, dass 64 % bzw. 59 % der Bakterien zur Klasse *Clostridia* gehören. Als dominante Gattung ist in Anreicherung F14 mit 42 % der Sequenzen *Clostridium*, in Anreicherung F102 mit 36 % der Sequenzen *Streptococcus* vertreten (Abbildung 34). Die einzige als cellulolytische bekannte Spezies der Anreicherungen mit jeweils 7 % ist *C. straminisolvens* (Kato *et al.* 2004a, Sequenzähnlichkeit > 98 %). Bakterien mit naher Verwandtschaft zu nicht-kultivierten *Clostridiaceae* machen einen Anteil von 13 bzw. 20 % aus.

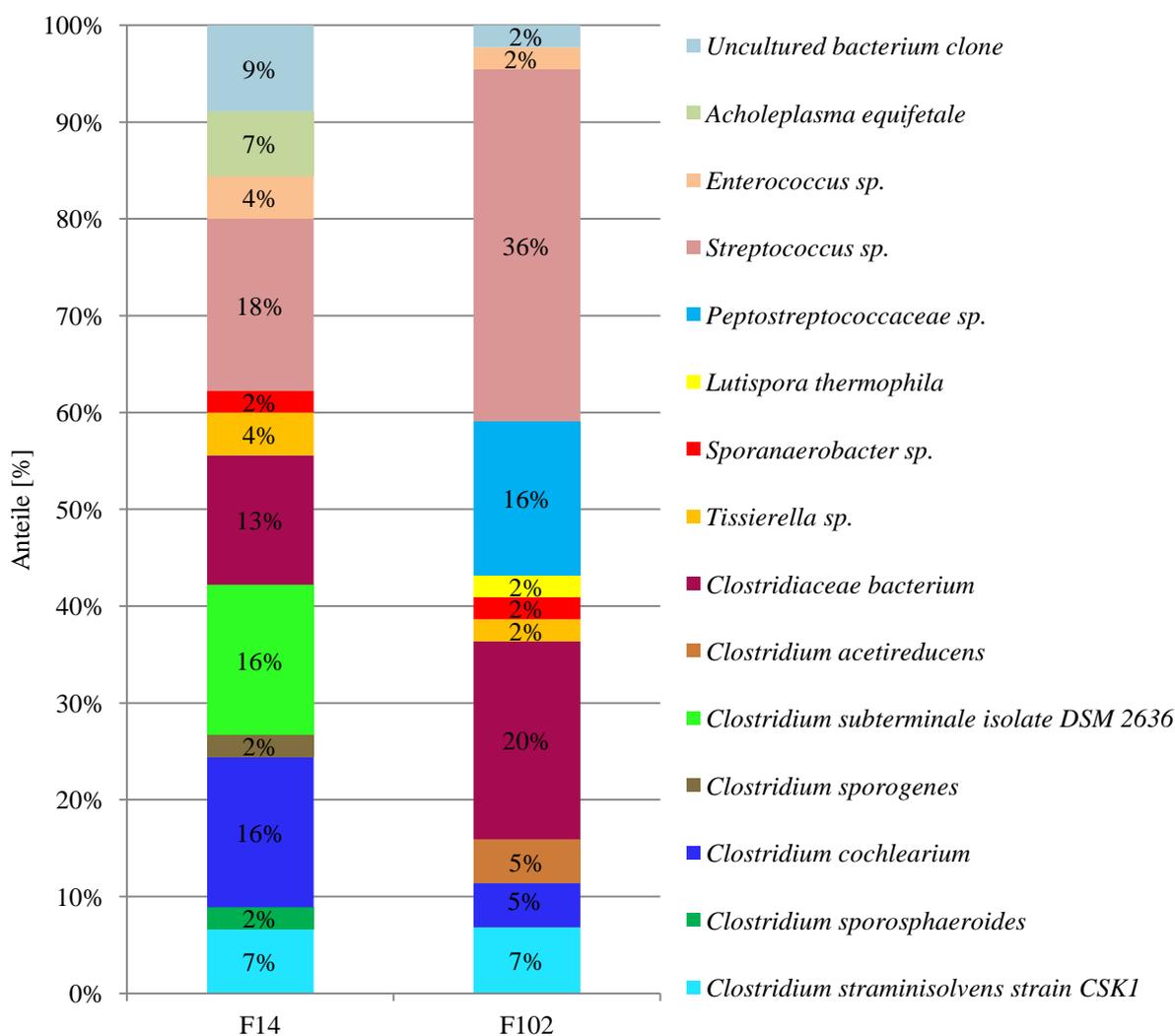


Abbildung 34: Nächste verwandte Bakterien der bei pH 7,4 und 42 °C angereicherten Kulturen; Sequenzen erhalten mit allgemeinen *Bacteria*-16S rDNA-Primern (616/630), ausgewertet mit BLAST; F14: n=45, F102: n=44

Diversität

Die Diversität der Bakterien in den Anreicherungen wurde mit dem Shannon-Wiener-Index bestimmt. Die mesophilen Mischkulturen F14 und F102, angereichert bei pH 7,4, wiesen die größte Diversität auf, hier ist der Shannon-Wiener-Index am höchsten (2,26 und 1,88, Tabelle 15). Bei den thermophilen bei pH 7,4 angereicherten Kulturen BK, #10 und LfL ist der Shannon-Wiener-Index 1,07, 1,24 und 1,67. Die bei pH 5,6 angereicherten Kulturen A, B und

Ergebnisse

C haben die geringste Diversität (Shannon-Wiener-Index 0,40, 0,72 und 0,64), was vermutlich auf den niedrigen pH zurückzuführen ist, welcher für eine geringere Spezieszahl geeignet zu sein scheint.

Tabelle 15: Shannon-Wiener-Diversitäts-Index der angereicherten cellulolytischen Kulturen

Kultur	Anreicherungsbedingungen Temperatur [°C]/pH	Shannon-Wiener-Index
BK	60/7,4	1,07
#10	65/7,4	1,24
LfL	60/7,4	1,67
A	60/5,6	0,40
B	60/5,6	0,72
C	60/5,6	0,64
F14	42/7,4	2,26
F102	42/7,4	1,88

3.3.2 Reinkulturen

Aus den cellulolytischen Mischkulturen konnten zehn Reinkulturen isoliert werden. Zur phylogenetischen Analyse der isolierten Stämme wurde die gDNA isoliert und die 16S rDNA amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Alle isolierten Reinstämme zeigten mindestens 99 % Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* ATCC 27405 (Tabelle 16; Sequenzen im Anhang).

Tabelle 16: Isolierte cellulolytische Reinstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
<i>C. thermocellum</i> 5g	Starke Gelbfärbung des Mediums	Anreicherung #10
<i>C. thermocellum</i> NB2	Schwache Gelbfärbung des Mediums, besonders schneller Filterpapierabbau	Thermophile Biogasanlage NB
<i>C. thermocellum</i> T2	Schwache Gelbfärbung des Mediums	Thermophile Biogasanlage Traritz
<i>C. thermocellum</i> BC1	Starke Gelbfärbung des Mediums, besonders schneller Filterpapierabbau	Anreicherung BK (aus Biokompost der Firma Wurzer)
<i>C. thermocellum</i> LfL1		Thermophiler Fermenter der LfL
<i>C. thermocellum</i> LfL2		Thermophiler Fermenter der LfL
<i>C. thermocellum</i> 2g		Anreicherung #10
<i>C. thermocellum</i> #12		Anreicherung #10
<i>C. thermocellum</i> #17		Anreicherung #10
<i>C. thermocellum</i> #18		Anreicherung #10

Ergebnisse

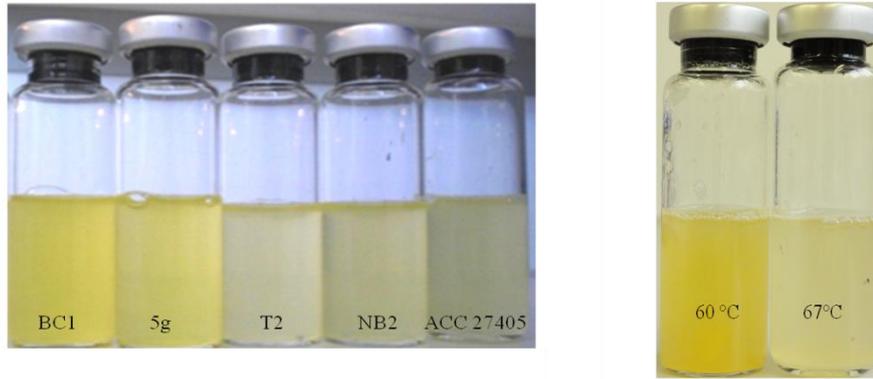


Abbildung 35: Vier der isolierten *C. thermocellum*-Stämme bei 60 °C (links) und Stamm BC1 bei 60 °C und 67 °C (rechts) in GS2-Medium

Da die Sequenzchromatogramme ohne Hintergrund waren wurde angenommen, dass es sich um Reinstämme handelt. Die Stämme zeigten Unterschiede in der Koloniefarbe, bei den Flüssigkulturen zeigte sich bei den Stämme BC1 und 5g eine besonders starke Gelbfärbung, die mit steigender Inkubationstemperatur abnahm (Abbildung 35). Die Stämme LfL1, LfL2, 2g, #12, #17 und #18 wurden nicht näher untersucht.

3.4 Cellulolytische Clostridien in Biogasanlagen

3.4.1 Quantifizierung von *C. thermocellum*, *C. stercorarium* und CIII-Clostridien mit RT-qPCR

Um Erkenntnisse über Möglichkeiten und Nutzen einer Inokulation von Biogasanlagen mit spezialisierten Bakterienkulturen zu gewinnen, wurde das Vorkommen von *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, die als bekannte cellulolytische Spezies in den thermophilen Anreicherungen vorkamen und bereits als wichtige cellulolytische Spezies beschrieben wurden (Zverlov *et al.* 2010), in Biogasanlagen untersucht. In den untersuchten Biogasanlagen Tabelle 5, S. 20) konnte jedoch *C. thermocellum* mit der verwendeten qPCR-Technologie nicht nachgewiesen werden, die C_T -Werte waren im Bereich der Negativkontrollen; der niedrigste C_T einer Probe war 29,5, der niedrigste C_T bei den Negativkontrollen war 33,8 (Abbildung 36). Der Unterschied der Zyklenzahl bis zum detektierbaren Fluoreszenzsignal zwischen Proben und Negativkontrollen von maximal 4,3 Zyklen wurde in dieser Arbeit als nicht signifikant angesehen.

Ergebnisse

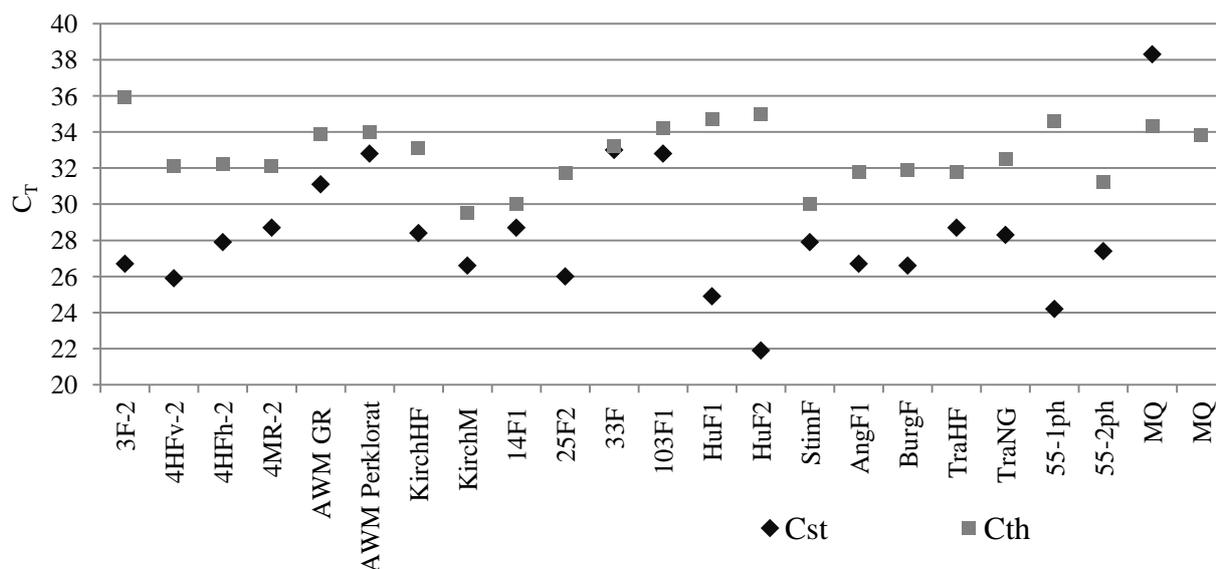


Abbildung 36: C_T -Werte der RT-qPCR mit Proben aus Biogasanlagen und den *C. stercorarium*- bzw. *C. thermocellum*-Primern; Negativkontrolle: Milli-Q-Wasser (MQ)

C. stercorarium dagegen konnte in allen 21 Proben eindeutig nachgewiesen werden. Die höchsten C_T -Werte der *C. stercorarium*-RT-qPCR wurden mit Proben aus Anlage 103F1 und AWM Perchlorat erhalten und waren bei 33,0 und damit deutlich unter den C_T -Werten der Negativkontrollen, die bei 38,3 lagen bzw. kein Fluoreszenzsignal zeigten. Somit war dC_T mindestens 5,3 Zyklen und wurde damit in dieser Arbeit als signifikant angesehen. Der größte *C. stercorarium*-Anteil an CIII-Clostridien wurde in Anlagen HuF1 (32 %), BurgF (28 %) und AWM GR (21 %) gemessen, 17-19 % der CIII-Clostridien macht *C. stercorarium* in Anlagen HuF2, StimF und 55-1ph aus (Abbildung 37). In den anderen Anlagen war der Anteil 3 % oder weniger, in Anlagen KirchM und 14F1 war der Anteil 0 %. Bezogen auf die Gesamtbakterienzahl ist jedoch auch der *C. stercorarium*-Anteil sehr gering (max. 4 %, in Anlage 55-1ph). Die in den hydrolytischen Anreicherungen vorkommenden Bakterien *C. stercorarium* und *C. thermocellum* scheinen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen mengenmäßig nicht dominant zu sein, jedoch lieferte die RT-qPCR mit Cluster III-Clostridien-Primer für alle untersuchten Fermenterproben ein Produkt, was die Anwesenheit dieser Bakteriengruppe zeigt. Bei der CIII-RT-qPCR war der C_T -Unterschied zwischen den Proben und den Negativkontrollen mindesten 8,1 Zyklen. In Anlage 4 (thermophil) war der mit RT-qPCR bestimmte CIII-Clostridien-Anteil 36-38 % der Bakterien im Hydrolysefermenter (Abbildung 38). In den thermophilen Anlagen 3F-2 und 55-1ph war der Anteil 16 und 22 %, in allen anderen (überwiegend mesophilen) Anlagen war der CIII-Anteil unter 10 %, in Anlage StimF und TraNG war der Anteil des Clostridien Cluster III an der Gesamtbakterienzahl 0 %.

Ergebnisse

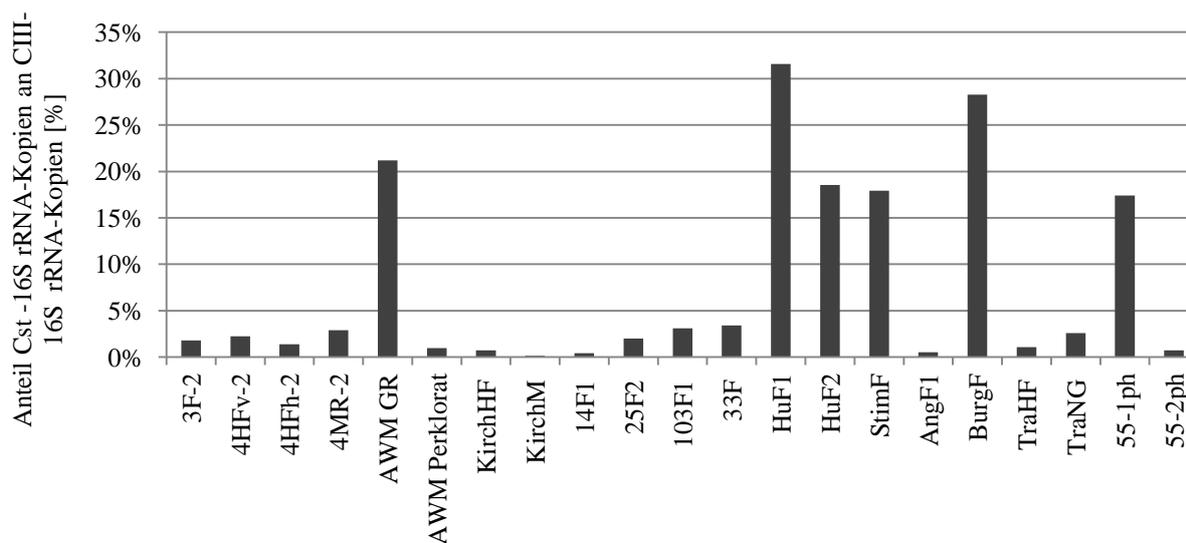


Abbildung 37: Anteil *C. stercorarium* an CIII-Clostridien in Fermenterproben (Mittelwert, n=4)

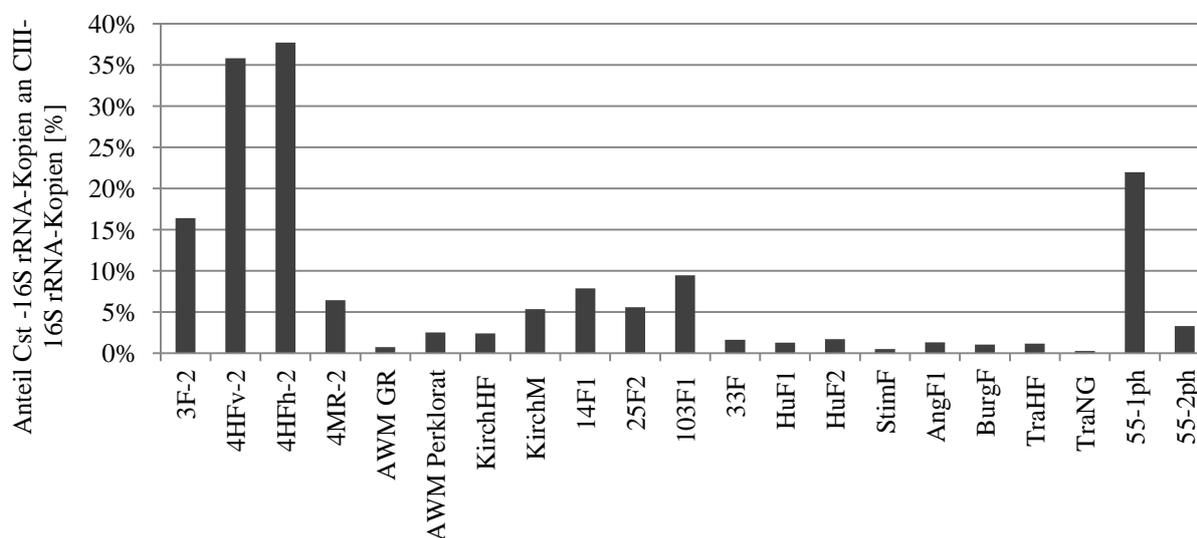


Abbildung 38: Anteile CIII-Clostridia an Bacteria in Fermenterproben (Mittelwert, n=4)

3.4.2 Analyse der Cluster III-Clostridien

Die RT-qPCR mit Cluster III-Clostridien-Primern lieferte für alle 21 Fermenterproben ein Produkt. Um zu klären, welche Bakterien aus diesem Clostridien-Cluster eine Rolle beim Celluloseabbau in Biogasanlagen spielen, wurde das RT-qPCR-Produkt mit den Clostridien Cluster III-spezifischen Primern (CIII-*rrs*-cDNA) der drei Biogasanlagen HuF2, 3F-2, 55-1ph (betrieben bei 45, 52 und 55 °C) kloniert und je 26-32 Klone sequenziert. Die Bindestellen der CIII-Primer liegen in den variablen Regionen V4 und V5 (Abbildung 8, S. 13) der 16S rDNA, das Amplikon sollte wegen der Verwendung der Primer für die qPCR möglichst kurz sein. Dies schränkt jedoch die Möglichkeit der phylogenetischen Einordnung der amplifizierten Sequenzabschnitte ein.

Der mit RT-qPCR bestimmte CIII-Anteil dieser Anlagen lag bei 2, 16 und 22 %, darunter waren 19, 2 und 17 % *C. stercorarium* (Abbildungen 38 und 37). Die Sequenzierung des klonierten CIII-PCR-Produkts (328 bp) ergab zehn CIII-Subcluster (Abbildung 39). Die größten Ähnlichkeiten aller Sequenzen waren zu bisher nicht-kultivierten Bakterien der

Ergebnisse

NCBI- und Silva-Datenbanken (Stand April 2012), was bedeutet, dass die Clostridien des Cluster III - und damit wichtige cellulolytische Bakterien - in Biogasanlagen vermutlich zum Großteil bisher nicht kultivierte Spezies sind. Aufgrund der kurzen Sequenz von 328 bp wurden die Cluster Bakteriengruppen zugeordnet.

Tabelle 17: Nächste verwandte und kultivierte Bakteriengruppen der 328 bp-CIII-16S rRNA-Sequenzen aus den Biogasfermentern HuF2, HeiBF und 55-1ph; Zuordnung mit BLAST und ARB

	Cluster	Anlage HuF2		Anlage 3F-2		Anlage 55-1ph	
Gruppe		Klone	Anteil	Klone	Anteil	Klone	Anteil
<i>C. clariflavum/C. straminisolvens/C. alkallicellulosi</i>	CIII-1	2	8 %	14	44 %	9	35 %
<i>C. termitidis/C. cellobioparum/C. josui/C. papyrosolvens/C. cellulolyticum</i>	CIII-2	8	31 %	9	28 %	5	19 %
<i>C. caenicola/C. stercorarium</i>	CIII-3	11	42 %	4	13 %	10	38 %
<i>C. thermosuccinogenes</i>	CIII-4			2	6 %		
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	CIII-5			2	6 %		
<i>Gracilibacter thermotolerans</i>	CIII-6					1	4 %
<i>Acidaminococcus intestinii</i>	CIII-7	1	4 %				
unc. <i>Firmicutes</i>	CIII-8	3	12 %				
<i>C. thermocellum</i>	CIII-9			1	3 %	1	4 %
unc. <i>Clostridia</i>	CIII-10	1	4 %				
Gesamt		26		32		26	

Subcluster CIII-1 hatte als nächste kultivierte Spezies die Gruppe der cellulolytischen Clostridien-Spezies *C. clariflavum* (Shiratori *et al.* 2009)/*C. straminisolvens/C. alkallicellulosi* (Zhilina *et al.* 2005, Tabelle 17). Vertreter dieses Subclusters kamen in allen drei Biogasanlagen vor (8, 44 und 35 % der Cluster III-Clostridien-Sequenzen). Subcluster *C. termitidis* (Hethener *et al.* 1992)/*C. cellobioparum* (Hungate 1944)/*C. josui* (Sukhumavasi *et al.* 1988)/*C. papyrosolvens* (Madden *et al.* 1982)/*C. cellulolyticum* (Petitdemange *et al.* 1984) (CIII-2) war für 31, 28 und 19 % der CIII-Sequenzen die nächste verwandte und kultivierte Bakteriengruppe, und Subcluster *C. caenicola/ C. stercorarium* (CIII-3) für 42, 13 und 38 % der CIII-Sequenzen. In Anlage 3F-2 war zudem ein Subcluster (CIII-4) mit *C. thermosuccinogenes* als nächste verwandte und kultivierte Spezies vorhanden (6 %). Verwandtschaft zu *Acetivibrio cellulolyticus* (Patel *et al.* 1980) haben 6 % der Sequenzen aus Anlage 3F-2 (CIII-5); 4 % der CIII-Sequenzen aus Anlage 55-1ph waren zu *Gracilibacter thermotolerans* (Lee *et al.* 2006) verwandt (CIII-6), der nächste zu *Gracilibacter thermotolerans* verwandte und kultivierte Mikroorganismus ist *Clostridium thermosuccinogenes*. 4 % der CIII-Sequenzen von HuF2 gehören zur Gruppe *Acidaminococcus intestinii* (Jumas-Bilak *et al.* 2007; CIII-7), und somit ebenfalls zum Phylum *Firmicutes*. In HuF2 war das Subcluster mit 12 % vertreten, welches nur als *uncultured Firmicutes environmental sample* eingeordnet werden konnte (CIII-8). CIII-9 hat als nächstes in Reinkultur kultiviertes verwandtes Bakterium *C. thermocellum* (3 und 4 % der Sequenzen in Anlagen 3F-2 und 55-1ph); Subcluster CIII-10 wurde in dieser Arbeit als *uncultured Clostridia* bezeichnet (4 % aus Anlage HuF2).

Ergebnisse

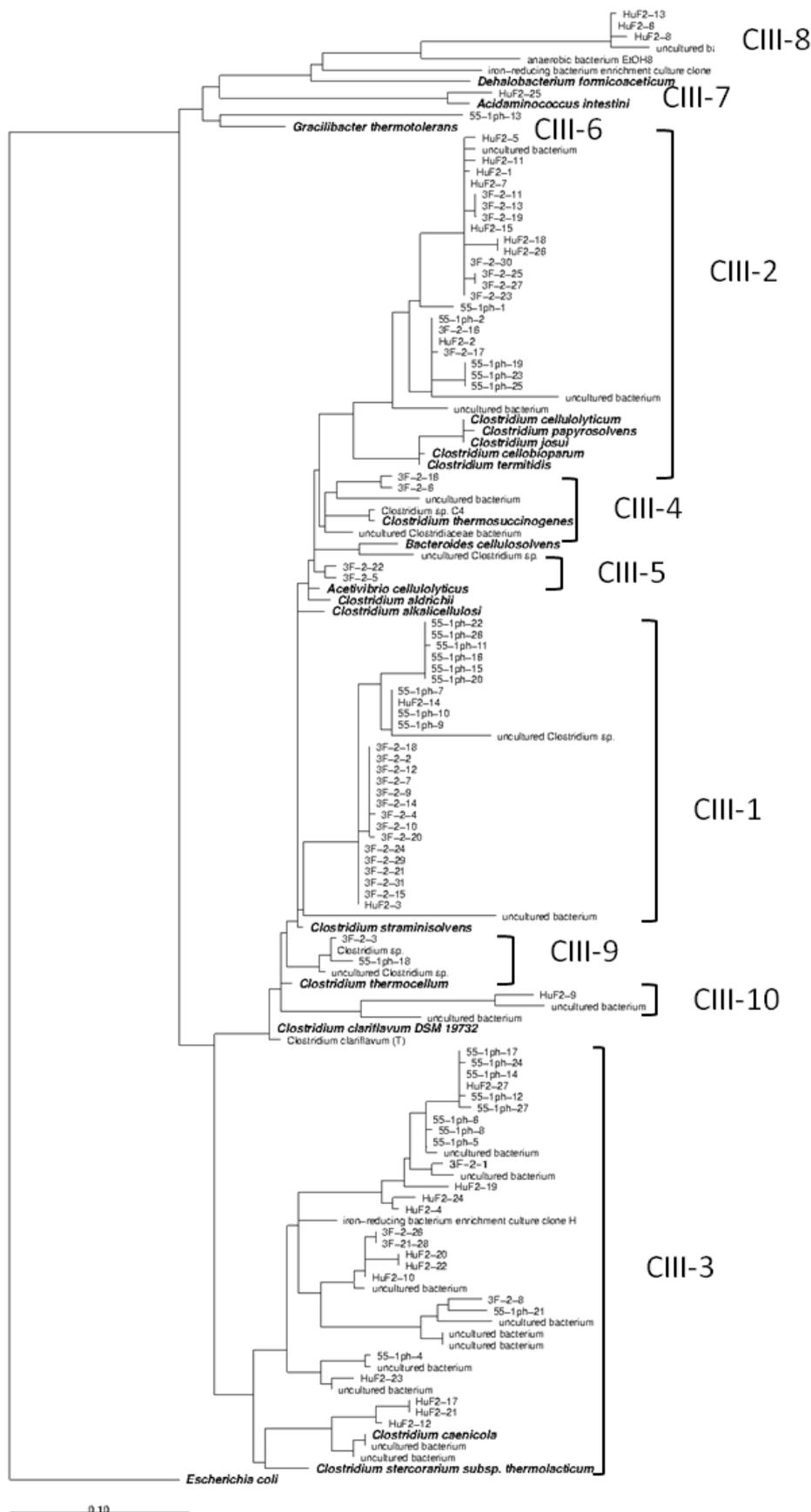


Abbildung 39: Phylogenetisches Dendrogramm der Sequenzen der CIII-*rrs*-cDNA-Bibliotheken aus Biogasfermentern HuF2, 3F-2 und 55-1ph; erstellt mit der Software ARB unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode

3.5 Hydrolytisches Potential und optimale Bedingungen für thermophile hydrolytische Kulturen

3.5.1 Hydrolytisches Potential

Um das hydrolytische Potential der cellulolytischen Kulturen zu bestimmen, wurde der Substratabbau (TS-Abnahme) mit den Modellsubstraten bei 60 °C und Inkubation über mehrere Tage (je nach Versuch zwischen 1 und 7 Tage) bestimmt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der Analyse thermophiler Bakterien. Die Hydrolyse läuft im thermophilen Temperaturbereich schneller ab (Sánchez *et al.* 2000, Zabranska *et al.* 2000), was auch in Abbaueversuchen bei 42 und 60 °C mit aus Biogasanlagen angereicherten Kulturen bestätigt werden konnte.

3.5.1.1 Selektierte Kulturen

Substratabbau der Anreicherungen #10, BK und LfL

Die Abbauleistung der bei pH 7,4 angereicherten thermophilen Mischkulturen #10, BK und LfL wurde mit Substrat 2 untersucht. Es wurde 1, 3 und 7 Tage bei 60 °C inkubiert. Die Abbauleistung von *C. thermocellum* ATCC 27405 wurde zum Vergleich ebenfalls bestimmt. Die Mischkulturen bauten schon nach einem Tag Substrat 1 ab (12-14 %), wobei #10 mit 14 % am meisten abgebaut hat (Abbildung 40). Nach 3 Tagen war der Abbau der Mischkulturen zwischen 24 und 27 %, *C. thermocellum* ATCC 27405 hat nach 3 Tagen mit 19 % am wenigsten abgebaut. Auch nach 7 Tagen waren die Abbauraten der Mischkulturen mit Werten zwischen 28 und 32 % höher als bei *C. thermocellum* ATCC 27405, der mit 27 % die geringste Abbaurate hatte. Die größte oTS-Abnahme wurde nach 7 Tagen mit Kultur BK erzielt (32 %).

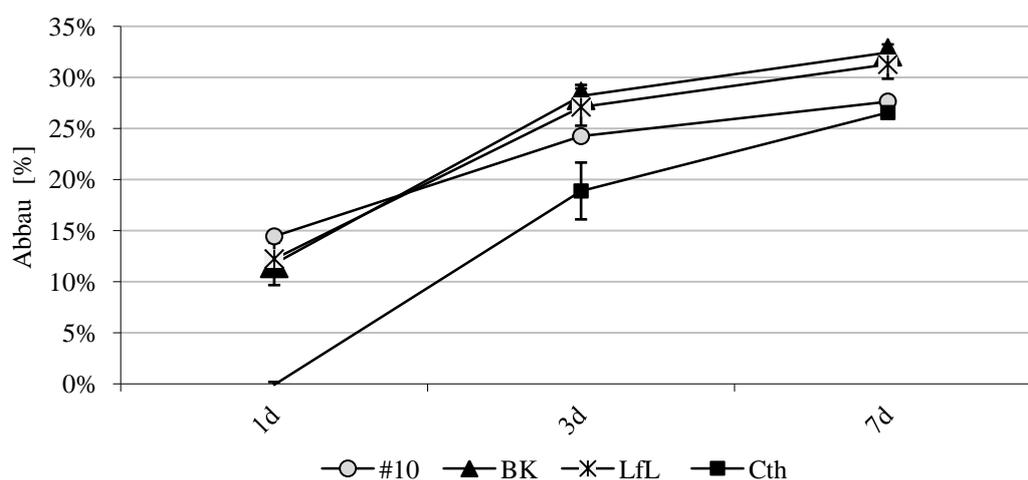


Abbildung 40: Substratabbau (Substrat 2) der Mischkulturen #10, BK und LfL sowie von *C. thermocellum* ATCC 27405 nach 1, 3 und 7 Tagen bei 60 °C (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Gasanalyse

Um evtl. vorhandene Methangasbildung zu untersuchen, wurde mit den Mischkulturen BK, #10 und LfL eine Analyse des gebildeten Gases durchgeführt. Es wurde kein nennenswerter CH₄-Anteil gemessen (0-0,2 %; Tabelle 18), Kultur #10 wurde im Gegensatz zu Kulturen BK

Ergebnisse

und LfL pasteurisiert, was den Unterschied von 0,2 % CH₄ erklären kann, da in den nicht-pasteurisierten Kulturen evtl. ein geringer Anteil methanogener Archaea vorhanden sein könnte. In allen Anreicherungen findet im Inkubationszeitraum von 7 Tagen also ein reiner Hydrolyse- und Versäuerungsprozess statt. Da kein CH₄ entsteht, kann davon ausgegangen werden, dass sich die gebildeten Fermentationsprodukte im Medium akkumulieren und ein Verbrauch der gebildeten Säuren nicht der Grund für den besseren Abbau durch die Mischkulturen im Vergleich zu *C. thermocellum* ATCC 27405 ist.

Tabelle 18: Gasanalyse der Mischkulturen; Inkubation für 10 Tage bei 60 °C, Substrat: Cellulose

Kultur	CH ₄ [%]	O ₂ [%]	CO ₂ [%]
BK	0,2	0,7	57,9
#10	0,0	1,0	52,5
LFL	0,2	1,0	64,2

Abbaukinetik Kultur #10

Um den Zeitraum, in dem der Abbau stattfindet, genauer zu bestimmen, wurde die thermophile Anreicherung #10 über 18, 24, 48, 66, 72, 89 und 96 Stunden bei 60 °C mit Substrat 1 inkubiert und der Abbau bestimmt. In den ersten 18 Stunden war der Abbaugrad mit 1,4 % sehr gering, stieg dann aber auf 5,1 % nach 24 Stunden und 17,4 % nach 48 Stunden (Abbildung 41). Nach 66 Stunden wurde ein Abbau von 27,5 % erreicht. Der pH-Wert sank nach den Inkubationszeiträumen auf 7,16 (18 Std.) bis 5,81 nach 66 Stunden. Der End-pH fiel auch nach längerer Inkubation bis 96 Stunden nicht unter 5,6, der maximale Abbau war 28,7 % nach 96 Stunden. Die Hydrolyse und somit der oTS-Abbau des Substrats fand v.a. im Zeitraum zwischen 18 und 66 Stunden statt.

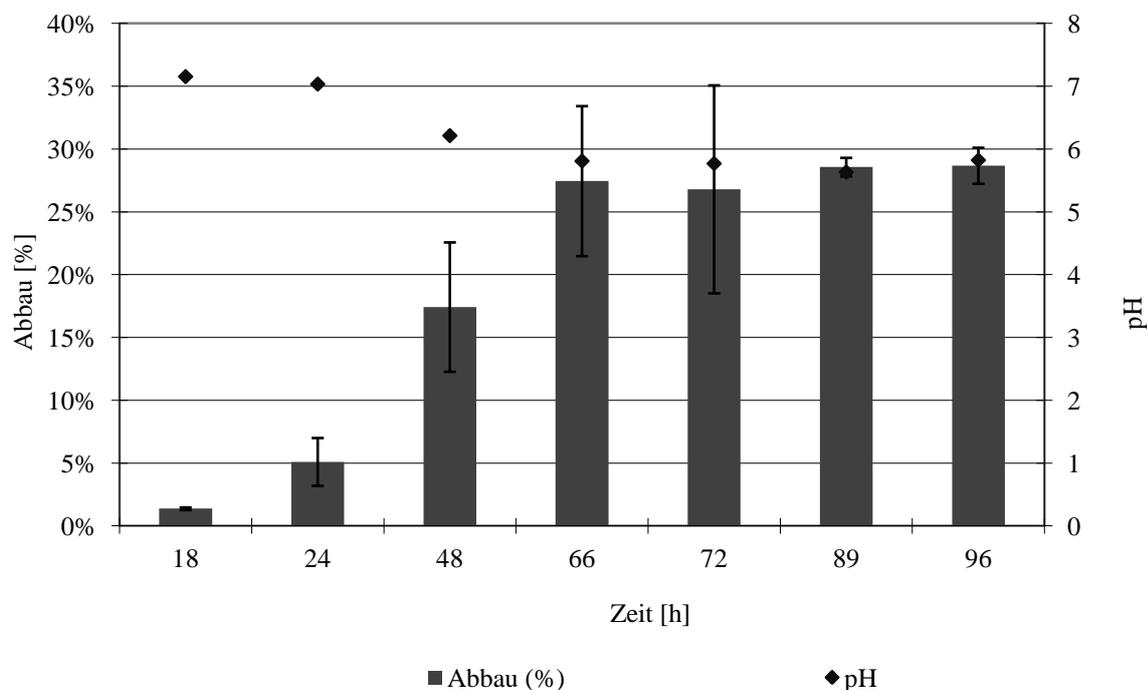


Abbildung 41: Substratabbau (Substrat 1) und End-pH der Anreicherung #10 bei 60 °C nach verschiedenen Inkubationszeiten (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

3.5.1.2 Fermenterkulturen

Substratabbau von Fermenter-Anreicherungen

Um das Potential der Anreicherungen im Vergleich mit hydrolytischen Bakterien aus Biogasanlagen einschätzen zu können, wurden aus Biogasanlagen cellulolytische Kulturen ohne Selektion besonders effektiver Kulturen angereichert. Die Anreicherungen fanden bei pH 7,4 und 60 °C statt wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben.

Die 13 Anreicherungen aus Biogasanlagen unterscheiden sich stark im mit Substrat 1 hervorgerufenen Abbau. Die Abbauraten nach 5 Tagen bei 60 °C lagen zwischen 12 und 22 % (Abbildung 42). Die schlechteste Kultur wurde aus einem Nachgärer angereichert (NG06), die beste Kultur aus dem Gärrestlager (GRL) der Biogasanlage 101. Die selektierte Kultur LfL zeigte mit 27 % einen deutlich höheren Abbau.

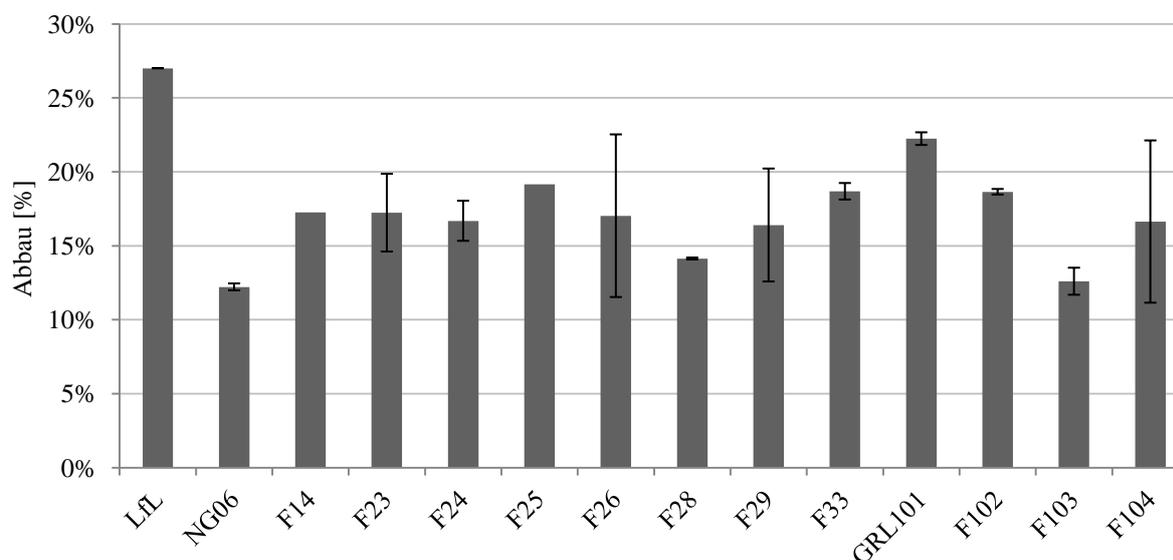


Abbildung 42: Substratabbau (Substrat 1) von Kulturen aus Biogasanlagen nach 5 Tagen bei 60 °C; Anreicherung mit Cellulose, ohne Selektion hydrolytisch besonders effizienter Kulturen; Anreicherung LfL als selektierte Kultur zum Vergleich des Abbaupotentials (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

3.5.1.3 Substratabbau der Isolate

Die Abbauleistung der isolierten *C. thermocellum*-Stämme wurde mit Substrat 2 nach 2 und 5 Tagen Inkubation bei 60 °C bestimmt. Die isolierten *C. thermocellum*-Stämme bauten unterschiedlich gut ab. Außer Stamm T2 bauten alle neu isolierten *C. thermocellum*-Stämme besser ab als der Typstamm *C. thermocellum* ATCC 27405 (11,7 % nach 2 Tagen, 25,4 % nach 5 Tagen; Abbildung 43). Stamm T2 hat mit 8,0 und 23,3 % nach 2 und 5 Tagen am wenigsten abgebaut. Nach 2 Tagen hat Isolat BC1 nach der Co-Kultur aus BC1 und *C. stercorarium* am meisten Substrat hydrolysiert (27,5 % vs. 28,9 %), nach 5 Tagen hat Kultur NB2 mit 39,1 % sogar mehr abgebaut als die Co-Kulturen aus BC1 und *Thermoanaerobacter mathranii* (38,8 %) und BC1 und *C. stercorarium* (38,1 %). Durch Co-Kultivierung von *C. thermocellum* BC1 mit einem saccharolytischen oder hemicellulolytischen Bakterium konnte der Substratabbau nicht signifikant erhöht werden.

Ergebnisse

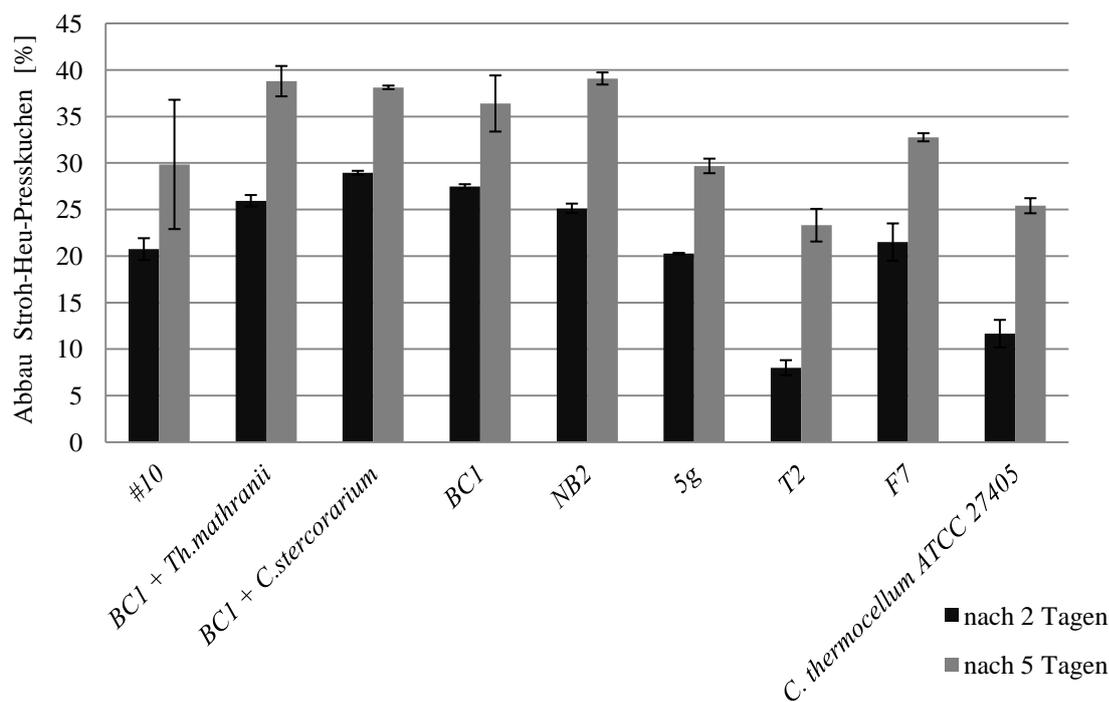


Abbildung 43: Substratabbau (Substrat 2) der Anreicherung #10, definierter Co-Kulturen und *C. thermocellum*-Reinstämmen nach 2 und 5 Tagen bei 60 °C (Mittelwert und Standardabweichung, n=2)

3.5.2 Optimale Bedingungen für Hydrolyse

Für die Bestimmung der Bedingungen für einen maximalen Substratabbau die Parameter GR-Anteil, Temperatur und pH getestet. Diese Parameter können im Modellfermenter leicht eingestellt werden, um die Bedingungen für ein Inokulum zu optimieren und dieses im Fermenter zu etablieren.

3.5.2.1 Temperatur

Um die am besten geeignete Temperatur für eine effiziente Hydrolyse der Anreicherung #10 zu bestimmen und die Bedingungen im Fermenter für das Inokulum zu optimieren, wurde die Abbaurate mit Substrat 1 bei 55, 60 und 65 °C nach einem und drei Tagen Inkubation bestimmt und eine Faserstoffanalyse nach van Soest durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose bei 60 °C im Vergleich zu 55 und 65 °C deutlich besser abläuft (Abbildung 44), obwohl die Kultur ursprünglich bei 65 °C angereichert worden war. Der Abbau von Cellulose war nach einem Tag bei 60 °C 10 %, bei 55 bzw. 65 °C wurde nur 7 bzw. 8 % der Cellulose hydrolysiert. Nach drei Tagen lag der Celluloseabbau bei 60 °C bei 18 %, bei 55 bzw. 65 °C lag er nach drei Tagen bei 15 %. Auch der Hemicelluloseabbau war nach einem und nach drei Tagen bei 60 °C am größten (5 und 9 %). Bei 55 bzw. 65 °C wurden nach einem Tag 4 % der Hemicellulose abgebaut, nach drei Tagen 9 bzw. 7 %.

Ergebnisse

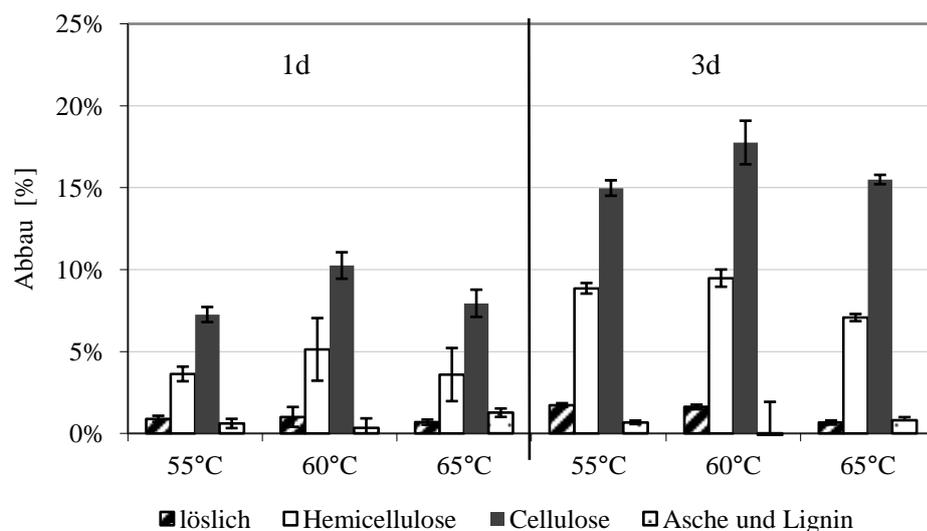


Abbildung 44: Substratabbau (Substrat 1) von Anreicherung #10 nach 1 und 3 Tagen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen; Differenzierung der Stoffgruppenanteile mit Van-Soest-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

3.5.2.2 Start-pH

Der Parameter pH spielt eine zentrale Rolle im Biogasprozess. Literaturdaten zeigen, dass für hydrolytische und acidogene Bakterien leicht saure pH-Werte geeigneter sind (Kaltschmitt und Hartmann, 2001); vom Biogasforum Bayern wird für die hydrolytischen Bakterien ein pH-Optimum von 4,7 bis 6,5 angegeben (Prozessmodell Biogas III, 2010). In einphasigen Anlagen wird das entstandene Acetat durch die parallel stattfindende Methanogenese verbraucht, was zu einer Stabilisierung des pH im neutralen oder leicht alkalischen Bereich führt. Durch Senkung des pH auf Werte zwischen 4,5 und 5,0 kann die Methanogenese in der Hydrolysestufe zweiphasiger Anlagen unterdrückt werden, weil methanogene Bakterien empfindlich auf solch niedrige pH-Werte reagieren (Prozessmodell Biogas IV, 2010). Der für die Hydrolyse geeignetste Anfangs-pH-Wert wurde sowohl mit Substrat 2 als auch mit Filterpapier für die Mischkulturen und *C. thermocellum*-Reinkulturen bestimmt.

pH-Änderung GR- und GS2-Medium

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Hydrolyse zu untersuchen wurde der Abbau hydrolytischer Kulturen bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Vorversuche zeigten, dass sich der pH durch das Autoklavieren in Abhängigkeit vom Substrat unterschiedlich ändert. Deshalb werden als pH-Werte immer die aktuell gemessenen Werte nach dem Autoklavieren angegeben. Die pH-Wert-Änderungen sind in Abbildung 45 dargestellt.

Ergebnisse

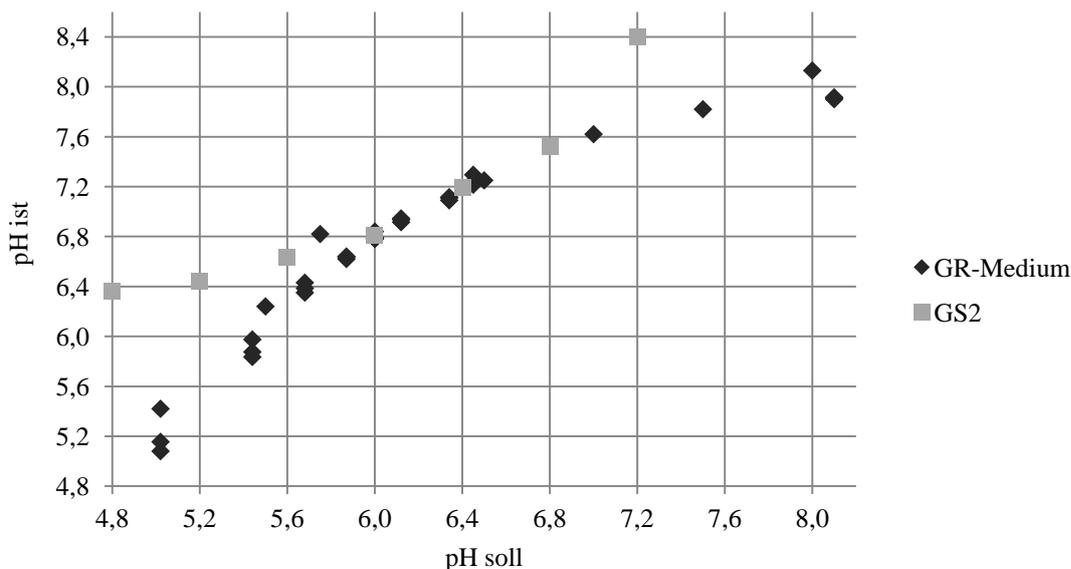


Abbildung 45: pH-Änderung mit GS2-Medium und GR-Medium; soll: eingestellter pH; ist: nach dem Autoklavieren gemessener pH

Abbauversuche mit Modellsubstraten

Kulturen #10 und LfL wurden 7 Tage bei 60 °C und Anfangs-pH-Werten von 4,8 bis 7,9 inkubiert. Der Abbau wurde über die TS-Abnahme bestimmt. Dabei zeigte sich, dass mit Kultur #10 bei Anfangs-pH-Werten unter 6,2 kein Abbau mehr stattgefunden hat; mit Kultur LfL war ab einer pH-Untergrenze von 5,7 kein Abbau mehr feststellbar (Abbildung 46). Bei pH 7,9 war der Abbau mit Kultur LfL am besten (29 %). Auch für Kultur #10 war der Substratabbau bei höheren pH-Werten über 7,0 am besten (25 % Abbau bei pH 7,4). Der Abbau nimmt bei beiden Anreicherungen mit steigenden pH-Werten von ca. 6,0 bis 7,25 stark zu und erreicht bei pH-Werten von ca. 7,5 bis 7,9 ein Maximum. Die pH 5,6-Anreicherungen A, B und C, deren Abbauleistung bei einem pH-Wert von 6,4 und ansonsten gleichen Bedingungen ebenfalls untersucht wurde, lagen mit 18-20 % Abbau unter dem maximalen Abbau der pH 7,4-Anreicherungen, bei pH 6,4 waren sie aber deutlich besser als #10 und LfL, welche bei diesem pH nur 4 % (und LfL ca. 6 %; Wert bei pH 6,3) des Substrats abgebaut hatten. Dieser Versuch zeigt, dass für die Hydrolyse pH-Werte zwischen ca. 7,25 und 7,9 am geeignetsten sind und dieses pH-Optimum nicht durch den für die Anreicherung der Kulturen gewählten pH-Wert begründet ist. Allerdings ist zu beachten, dass durch die metabolische Tätigkeit der Bakterien der pH-Wert absinkt und der End-pH deutlich niedriger liegt.

Ergebnisse

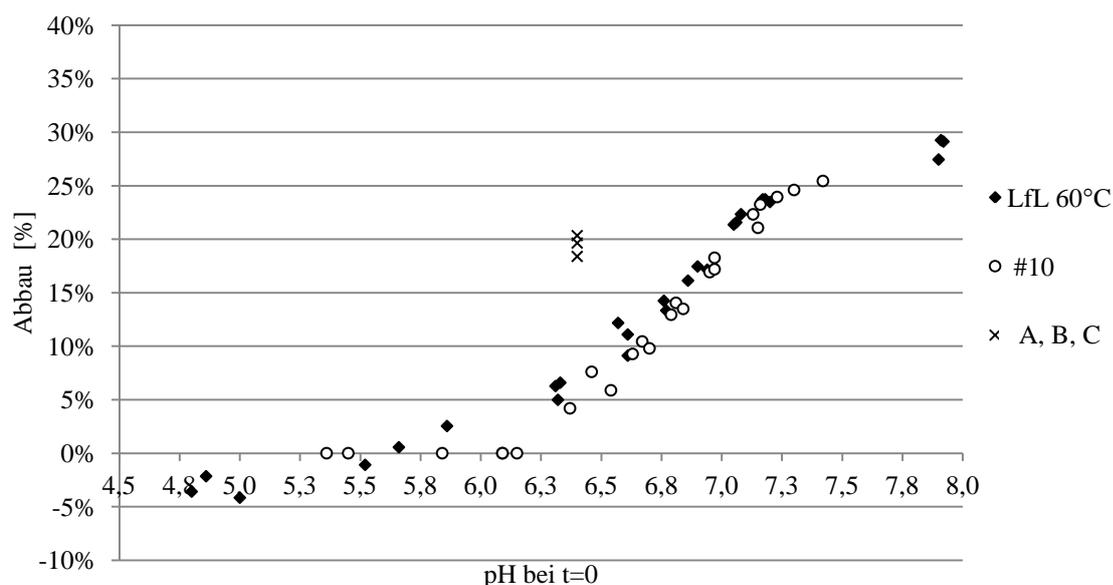


Abbildung 46: Substratabbau (Substrat 2) der bei pH 7,4 angereicherten Kulturen #10 und LfL sowie der bei pH 5,6 angereicherten Kulturen A, B, C nach 7 Tagen bei 60 °C, Start-pH mit HCl bzw. NaOH eingestellt

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Hydrolyse mit der untersuchten Kultur erst nach ca. 18 Stunden beginnt und nach 24 Stunden bereits messbarer TS-Verlust stattfindet (Abbildung 41). Die ersten Stunden des Substratabbaus zeigen, bei welchem pH die hydrolytischen Bakterien in der Mischkultur am besten wachsen und extrazelluläre hydrolytische Enzyme herstellen, welche das Substrat spalten. In dieser Phase ist noch keine Endproduktthemmung z.B. durch entstehende Cellobiose-moleküle oder einen für die Bakterien hemmend wirkenden pH zu erwarten. Im Falle einer längeren Inkubation ist die Aussage über den optimalen pH-Wert im Batch schwierig, da die Einflüsse des bei der Hydrolyse stetig sinkenden pH-Werts und der Pufferwirkung des Mediums schwer zu berücksichtigen sind.

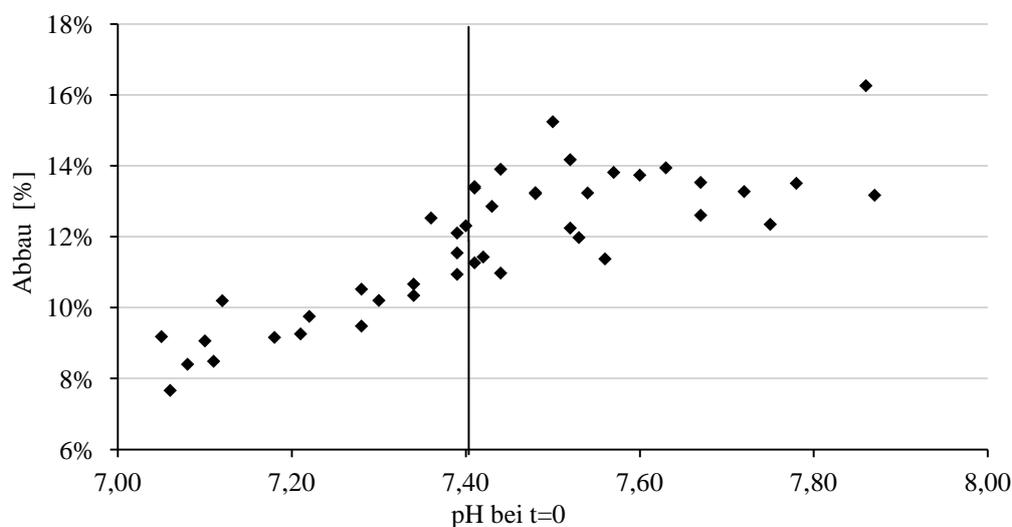


Abbildung 47: Substratabbau (Substrat 2) von Kultur #10 nach 21 Stunden bei 60 °C; der Start-pH wurde nach dem Autoklavieren gemessen

Ergebnisse

Der geeignetste pH-Wert für Kultur #10 wurde bestimmt, indem der pH auf Werte zwischen 7,0 und 7,9 eingestellt wurde und der Abbau bei 60 °C nach möglichst kurzer Inkubation (21 Std.) verglichen wurde. In diesem Versuch zeigt sich deutlich eine Grenze bei pH 7,4 (Abbildung 47). Von diesem pH-Bereich in Richtung pH 7,0 sinkt die Abbaurate stetig (von ca. 14 % auf ca. 8 %), bei Erhöhung des Anfangs-pH Richtung 7,9 liegt die Abbaurate konstant bei etwa 12-14 %

Abbauversuche mit Filterpapier

Ein weiterer Versuch bei 60 °C mit Filterpapier in GR-Medium und Anfangs-pH-Werten zwischen 5,72 und 8,50 wurde mit allen Anreicherungen, den *C. thermocellum* Isolaten BC1 und NB2 und *C. thermocellum* ATCC 27405 durchgeführt. Der Filterpapierabbau wurde visuell bestimmt und in vier Stufen (vollständiger Zerfall des Filterpapiers, ca. 60-80 % zerfallen, ca. 20-40 % zerfallen und nicht abgebaut) eingeteilt.

Bei pH 8,50 und pH 6,79 wurde das Filterpapier von allen Kulturen nach 6 Tagen abgebaut, bei pH 8,13 und 7,25 war das Filterpapier schon nach 4 Tagen abgebaut (Tabelle 19). Bei pH 6,18 war mit Kulturen F14, F102 und dem Typstamm kein Filterpapierabbau zu erkennen, bei Kulturen LfL, BK und A, B, C dauerte es mehr als 7 Tage, bis ein leichter Abbau zu erkennen war. Kulturen #10, und die *C. thermocellum*-Stämme BC1 und NB2 zeigten nach 7 Tagen einen leichten Abbau des Filterpapiers (20-40 % Abbau). Bei pH 5,72 dauerte es 10 Tage, bis ein leichter Abbau (20-40 %) von Kulturen LfL, BK, A, B und C zu erkennen war, wobei Kulturen A und B etwas mehr Filterpapier abgebaut hatten (60-80 %).

Tabelle 19: Filterpapierabbau bei unterschiedlichen Start-pH-Werten; vollständiger Abbau (+++), ca. 60-80 % Abbau (++), ca. 20-40 % Abbau (+), kein Abbau (-); Inkubation bei 60 °C in GR-Medium

Kultur	pH Inkubationszeit	5,72	6,18	6,79		7,25	8,13	8,50
		10 d	7 d	1 d	6 d	4 d	4 d	6 d
#10		-	+	++	+++	+++	+++	+++
LfL		+	+ (>7d)	+	+++	+++	+++	+++
BK		+	+ (>7d)	+	+++	+++	+++	+++
F14		-	-	-	+++	+++	+++	+++
F102		-	-	-	+++	+++	+++	+++
A		++	+ (>7d)	++	+++	+++	+++	+++
B		++	+ (>7d)	++	+++	+++	+++	+++
C		+	+ (>7d)	++	+++	+++	+++	+++
<i>C. thermocellum</i> BC1		-	+	+	+++	+++	+++	+++
<i>C. thermocellum</i> NB2		-	+	+	+++	+++	+++	+++
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405		-	-	-	+++	+++	+++	+++

Der für die Hydrolyse beste pH-Bereich liegt für die getesteten Kulturen zwischen ca. 8,13 und 7,25. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis für die Hydrolyse mit Substrat 2; jedoch wurde der Filterpapierabbau nur visuell bestimmt, weshalb der Abbau nicht genauer differenziert werden konnte. Der Versuch untermauert aber die Erkenntnis, dass pH-Werte unter 7,25 eher ungeeignet für die Hydrolyse sind; der Filterpapierabbau dauert in diesem pH-Bereich länger (mind. 6 Tage für vollständigen Abbau). Bei pH-Werten von 7,25 und 8,13 ist das Filterpapier von allen Kulturen nach 4 Tagen vollständig abgebaut. Bei pH-Werten unter 6,18 kommt es bei keiner der getesteten Kulturen zu einem vollständigen Abbau des Filterpapiers.

3.6 Unterschiede der *C. thermocellum*-Stämme

Ein wichtiger Ansatz, um die Hydrolyse in Biogasanlagen zu optimieren ist, Erkenntnisse über die am Prozess beteiligten Mikroorganismen und ihr Zusammenwirken zu gewinnen. Da Mischkulturen aufgrund der gegenseitigen Wechselwirkungen, der komplexen Vorgänge und Synergismen der beteiligten Mikroorganismen schwer bezüglich des Potentials einzelner Bakterien zu untersuchen sind, ist es wichtig, neue cellulolytische Bakterien zu isolieren und zu charakterisieren. In dieser Arbeit konnten zehn neue *C. thermocellum*-Isolate aus Mischkulturen gereinigt werden, die Unterschiede in hydrolytischem Potential und Morphologie zeigten. Die 16S rDNA-Sequenzen dieser Stämme waren in einem Bereich von mindestens 1375 bp mindestens 99 % identisch. Vier dieser neu isolierten Stämme wurden genauer untersucht. Teile der cellulolytischen Enzymsysteme (CipA, CelR) wurden mit Sequenzvergleichen charakterisiert und mit bereits kultivierten *C. thermocellum*-Stämmen verglichen. Außerdem wurden physiologische Untersuchungen durchgeführt, um evtl. weitere Unterschiede der *C. thermocellum*-Stämme festzustellen.

3.6.1 Sequenzvergleiche

Weitere Verwandtschaftsbeziehungen der isolierten Stämme wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten der Cellulosom-Komponenten CelR und CipA untersucht. CelR stellt eine wichtige Endoglucanase von *C. thermocellum* dar. Es handelt sich um eine prozessive Cellotetrahydrolase aus der Gykosid-Hydrolase-Familie 9 (GH9), die beim Aufbau des Cellulosoms eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Zverlov *et al.* 2005). Die Strukturkomponente des Cellulosoms CipA bildet die nichtkatalytische Basis des synergistisch wirkenden Enzymkomplexes, weshalb ihr eine große Bedeutung zukommt.

3.6.1.1 CelR

Die DNA-Sequenzen der Cellulase CelR zeigen bei den Stämmen NB2, 5g, T2, BC1, F7, DSM 1313 und JW20 im Vergleich zu *C. thermocellum* ATCC 27405 weniger als 1 % Unterschied. Es wurden drei Unterschiede in der Nukleotidsequenz (SNP) festgestellt (Tabelle 20). Diese liegen an Position 729, 771 und 1753 der Typstammsequenz. SNP 1 ist ein Austausch bei BC1 und T2 von Cytosin in Thymin, SNP 2 ist ebenfalls ein Austausch von Cytosin in Thymin bei NB2 und 5g. SNP 3 ist ein Austausch von Adenin in Guanin bei den Stämmen BC1, NB2, 5g, und F7, der auch bei *C. thermocellum* DSM 1313 und JW20 vorliegt und zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin führt.

Tabelle 20: Punktmutationen im *celR*-Gen der isolierten *C. thermocellum*-Stämme sowie der Stämme DSM 1313 und JW20 verglichen mit dem *C. thermocellum*-Stamm ATCC 27405

Position	Mutation	Stamm
Nukleotid/Aminosäure		
729/243	C>T/keine	BC1, T2
771/257	C>T/keine	NB2, 5g
1753/585	A>G/I>V	BC1, NB2, 5g, F7, DSM1313, JW20

3.6.1.2 *CipA*

Die Strukturkomponente des Cellulosoms von *C. thermocellum* ATCC 27405, *CipA*, hat eine Größe von ca. 200 kDa (ca. 5900 bp). Sie ist aus 9 Cohesin-Domänen mit jeweils ca. 150 Aminosäuren sowie einem CBM (carbohydrate-binding module), zwei Prolin- und Threoninreichen Linker-Domänen und zwei Dockerin-Domänen zusammengesetzt (Abbildung 7, S. 12).

CipA der *C. thermocellum*-Stämme NB2, 5g, T2, BC1 und F7 zeigten Größenunterschiede sowohl auf Proteinebene (Abbildung 48) als auch auf DNA-Ebene (Abbildung 49). Die Längenunterschiede des *CipA* im SDS-Polyacrylamidgel stimmten mit den Längenunterschieden der PCR-Produkte mit *cipA*-spezifischen Primern überein.

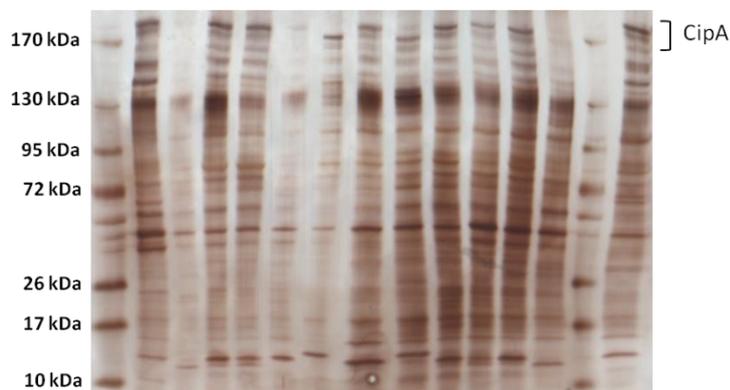


Abbildung 48: Proteine aus Kultur-Überstand der *C. thermocellum*-Isolate aufgetrennt in einem Polyacrylamid-Gradientengel (4-20%); je 2µg Protein aufgetragen; links und 2. Spur von rechts: Protein-Größenstandard

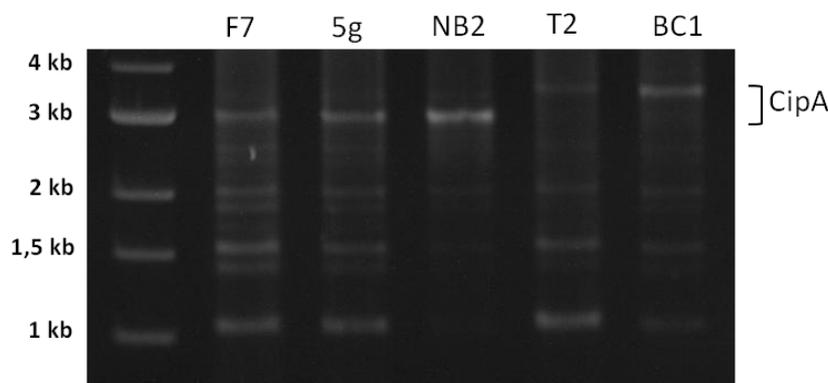


Abbildung 49: *cipA*-PCR-Produkte (Primer *Cip7F/Cip8R*) von genomischer DNA aus *C. thermocellum* F7 und den Isolaten 5g, NB2, T2 und BC1; links: Größenstandard

Ergebnisse

Um die festgestellten Größenunterschiede und Sequenzunterschiede von *cipA* zu identifizieren, wurde das Gen der Stämme NB2, BC1, 5g, T2 und F7 sequenziert. Aufgrund der stark homologen, repetitiven Cohesin-Domänen ist die Sequenzierung des Gens nicht trivial, ein Alignment der ca. 900 bp langen, sequenzierten Reads oft schwierig.

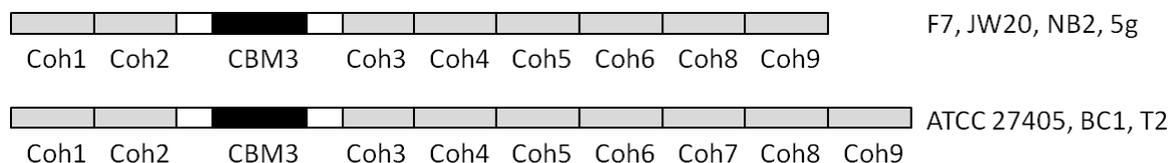


Abbildung 50: Bezeichnung der Cohesine der analysierten *C. thermocellum*-Stämme

Der auffälligste Unterschied des *cipA* der verschiedenen *C. thermocellum*-Stämme ist, dass die Stämme NB2, 5g, F7 und JW 20 im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC 27405, T2 und BC1 nur 8 statt 9 Cohesine besitzen (Abbildung 50). Die Aminosäuresequenz des Gerüstproteins CipA der untersuchten Stämme zeigt zahlreiche Unterschiede (Tabelle 21). Aminosäureaustausche in den Regionen zwischen den Cohesinen kommen ausschließlich bei den Stämmen NB2, 5g, BC1 und JW20 vor. Weiter fällt auf, dass es bei Cohesin 1 keinen, bei Cohesin 2 einen (bei Stamm F7) und bei Cohesin 8 und 9 jeweils zwei Aminosäureaustausche, und damit sehr wenige Unterschiede zwischen den Stämmen gibt. Cohesine 4, 5 und 6 haben mehrere Mutationen auf Aminosäureebene gegenüber dem Typstamm ATCC 27405.

Tabelle 21: Unterschiede in der Aminosäuresequenz von CipA der *C. thermocellum*-Stämme NB2, 5g, T2, F7, JW20 und ATCC 27405; fett: nicht-konservative Aminosäureaustausche, Deletionen und Insertionen; Aminosäurepositionen beziehen sich auf CipA von *C. thermocellum* ATCC 27405

Stamm	Austausch	Deletion	Domäne
F7	G300V	G301	Cohesin 2
5g, NB2	I437V		CBM3
5g, NB2, JW20, BC1, F7		PATTKP543	PT-reiche Linker-Domäne
NB2, BC1	S556T		
5g, NB2, JW20, BC1	R692K		
5g, NB2, JW20, BC1	F596S		Cohesin 3
5g, NB2, JW20, BC1	D704G		
5g, NB2, JW20, BC1	T712P	T713	
5g, NB2, JW20, BC1	PV714AS		
BC1	S722P		
BC1	VR725IK		
5g, NB2, JW20, BC1	R741N		Cohesin 4
5g, NB2, JW20	E774A		
BC1	E774K		
5g, NB2, JW20, BC1	DI777EL		

Ergebnisse

5g	FA803LT		
T2	FA846LN	N849	
JW 20	K855R		
5g, NB2, JW20, BC1	E870V	TT882	
5g, NB2, JW20, BC1	A872T		
5g, NB2, JW20, BC1	LD887PN		
5g	P901T		
T2		905+S	
F7	P940L		Cohesin 5
F7	A986V	T987	
F7, BC1	S994E		
JW20	E1035V		
JW20	A1037T	TT1047	
JW20	DLD1051DSN		
BC1	D1051G		
T2	VR1055KG		
T2	V1059A		
NB2	G1078S		
JW20	D1115T		Cohesin 6
5g, NB2, JW 20, BC1, T2	E1159S		
5g, NB2, JW20	K1185R		
BC1	D1216G, EL1272DI, T1280D, M1293I, E1311K, K1350R		Cohesin 7
5g, NB2, JW20, F7		1192-1356	
5g, NB2, BC1	E1365V		
5g, NB2, BC1	A1367T	TT1377	
5g, NB2, BC1	LD1382SN		
JW20, F7	D1445T		Cohesin 8
5g, NB2	E1489S		
5g, NB2, JW20, BC1	T1545A		
JW 20	V1585I		Cohesin 9
JW 20	EL1601DI		
5g, NB2	P1693T		

Ergebnisse

Ein ClustalW-Alignment der Aminosäuresequenzen der einzelnen Cohesine zeigte, dass die Cohesine 1 aller Stämme starke Ähnlichkeiten aufweisen, ebenso die Cohesine 2 und die Cohesine 9 (Tabelle 22 und Abbildung 64, S.135; Bezeichnung der Cohesine siehe Abbildung 50). Die Cohesine 4 der Stämme NB2, 5g, BC1 und JW20 und der Cohesine 3 aller Stämme zeigen ebenfalls eine große Sequenzähnlichkeit. Coh4 von F7, Coh5 von NB2 und JW20 sowie Coh8 von NB2 und 5g haben die größte Sequenzähnlichkeit zu Cohesin 4 des Typstamms, Coh6 von BC1 zu Cohesin 5 des Typstamms, Coh6 von F7 zu Cohesin 6. Coh5 von 5g und T2 haben die größte Sequenzübereinstimmung mit den Cohesinen 4 und 5 des Typstamms, Coh5 von BC1, Coh8 von BC1, T2, F7 und JW20 mit Cohesinen 6 und 8. Coh4 von T2, Coh5 von F7, Coh6 von NB2, 5g, T2 und JW20 sowie Coh7 von BC1 haben mit Cohesinen 4, 5, 6 oder 8 des Typstamms Sequenzübereinstimmungen, diese können keinem dieser vier Typstamm-Cohesin direkt zugeordnet werden. Zu ATCC 27405 Cohesin 7 hat nur Coh7 von T2 die größte Sequenzähnlichkeit, was den Schluss zulässt, dass dieses Cohesin bei den Stämmen mit 8 Cohesinen fehlt.

Tabelle 22: Aminosäuresequenzähnlichkeit der einzelnen Cohesine zu den Cohesinen des Typstamms *C. thermocellum* ATCC 27405; hellgrau: größte Ähnlichkeit zu Cohesin 4 und 5 von *C. thermocellum* ATCC 27405; mittelgrau: größte Ähnlichkeit zu Cohesin 6 und 8 von ATCC 27405; dunkelgrau: größte Ähnlichkeit zu Cohesin 4, 5, 6 und 8 von *C. thermocellum* ATCC 27405

Cohesine der Stämme JW20, F7, NB2, 5g, BC1 und T2	Coh1 aller Stämme	Coh2 aller Stämme	Coh3 aller Stämme Coh4 (BC1, NB2, 5g, JW20)	Coh4 (F7)	Coh6 (BC1)	Coh6 (F7)	Coh7 (T2)	Coh9 aller Stämme		
				Coh5 (NB2, JW20)					Coh5 (5g, T2)	Coh 5 (BC1) Coh8 (BC1, T2, F7, JW20)
				Coh8 (NB2, 5g)					Coh4 (T2), Coh5 (F7), Coh6 (NB2, 5g, T2, JW20), Coh7 (BC1)	
Entsprechendes Cohesin des Stamms ATCC 27405	1	2	3	4	5	6	8	7	9	

3.6.2 Physiologische Eigenschaften

Um die isolierten *C. thermocellum*-Stämme näher zu charakterisieren, wurden physiologische Eigenschaften wie Substrat- und Produktspektrum sowie Temperaturmaximum und unteres pH-Limit für Filterpapierabbau analysiert. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Stamm NB2 als Repräsentanten der Gruppe mit acht Cohesinen gelegt. *C. thermocellum* ATCC 27405 wurde in allen Versuchen zum Vergleich mitgeführt.

3.6.2.1 Substratspektrum

Das Substratspektrum der *C. thermocellum*-Stämme F7, NB2, BC1, 5g und T2 wurde untersucht. Von den Substraten Glucose, Sorbitol, Arabinose, Galactose, Saccharose, Xylose, Xylan und Stärke konnten nur die Stämme NB2, BC1 und F7 Glucose verwerten, BC1 konnte nach der langen Inkubationszeit von vier Tagen auch mit Sorbitol wachsen (Tabelle 23). Jedoch war das Wachstum erst nach vier Tagen nachweisbar. Die anderen Substrate wurden von keinem der Stämme, Cellulose und Cellubiose von allen Stämmen verwertet.

Tabelle 23: Wachstumsverhalten einer Auswahl von Stämmen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen; + = Wachstum, - = kein Wachstum (n=2)

Stamm	Glucose	Sorbitol	Arabinose	Galactose	Saccharose	Xylose	Xylan	Stärke
BC1	+	+	-	-	-	-	-	-
NB2	+	-	-	-	-	-	-	-
F7	+	-	-	-	-	-	-	-
5g	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	-	-	-	-	-	-	-	-

3.6.2.2 Produkte

Bei der Untersuchung des Produktspektrums der Stämme BC1, NB2, 5g, T2, F7 und ATCC 27405 mit 1 % Cellulose (Filterpapier) als Substrat mittels GC-Analyse wurde überwiegend Ethanol detektiert (0,05-0,1 %), außerdem Acetat (0,01-0,03 %) und Isopropanol (0,003-0,008 %) (Abbildung 51). Es zeigten sich Unterschiede zwischen den Stämmen; so hat F7 am meisten Ethanol (0,1 %) und Acetat (0,03 %) produziert, NB2 hat am meisten Isopropanol produziert (0,008 %). Am wenigsten Ethanol, Acetat und Isopropanol produziert hat Stamm BC1 (0,05, 0,01 und 0,003 %). Aceton, Methanol, Butanol, Propionat und Butyrat wurden von keinem der Stämme gebildet.

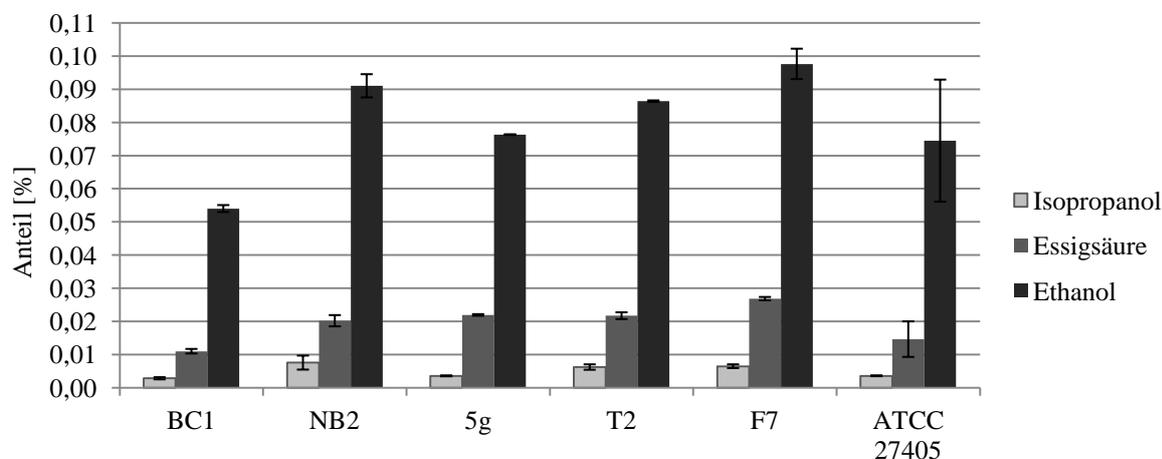


Abbildung 51: Gebildete Produkte der *C. thermocellum*-Stämme bei 60 °C in GS2-Medium mit 1 % Cellulose (Mittelwert und Standardabweichung, n=2)

3.6.2.3 Temperaturlimit

Um das Wachstumsverhalten und die cellulolytische Aktivität bei höheren Temperaturen bis zu 69 °C zu untersuchen, wurden die Stämme in GS2-Medium mit Filterpapier inkubiert und der Abbau visuell dokumentiert (Abbildung 10, S. 22).

Bei 65 °C konnten alle Stämme das Filterpapier vollständig abbauen, jedoch waren die Stämme BC1 und NB2 deutlich schneller als die anderen *C. thermocellum*-Stämme (Tabelle 24). Die Stämme NB2 und BC1 bauten das Filterpapier auch noch bei 67 °C ab. Bei 69 °C zeigte keiner der untersuchten *C. thermocellum*-Stämme mehr hydrolytische Aktivität mit Cellulose.

Tabelle 24: Filterpapierabbau der *C. thermocellum*-Isolate bei verschiedenen Temperaturen; ++ = schneller Abbau (2 d) ; + = langsamer Abbau (> 2 d); - = kein Abbau (n=2)

Stamm	65 °C	67 °C	69 °C
BC1	++	+	-
NB2	++	+	-
5g	+	-	-
F7	+	-	-
T2	+	-	-
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	+	-	-

3.6.2.4 pH

Für eine reine Hydrolysestufe in Biogasanlagen spielt der pH eine entscheidende Rolle. Niedrige pH-Werte zwischen 4,7 und 6,5 sind optimal für eine Hydrolysestufe; mit pH-Werten zwischen 4,5 und 5,0 kann eine Methanogenese weitestgehend unterdrückt werden, da methanogene Archaea bei solch niedrigen pH-Werten nicht mehr wachsen (Prozessmodell Biogas IV, 2010). Aus diesem Grund sind hydrolytische Bakterienstämme, die möglichst niedrige pH-Werte tolerieren, gut für eine reine Hydrolysestufe in Biogasanlagen geeignet. Bei den folgenden Versuchen wurde der nach dem Autoklavieren gemessene pH-Wert angegeben.

Filterpapierabbau

Um den Celluloseabbau der *C. thermocellum*-Stämme NB2, BC1 und ATCC 27405 bei verschiedenen pH-Werten zu vergleichen, wurden diese bei Anfangs-pH-Werten von 6,23 bis 8,40 (nach dem Autoklavieren gemessen) und 60 °C mit Cellulose in GS2-Medium inkubiert. Der Filterpapierabbau wurde visuell bestimmt (siehe Abbildung 10, S. 22).

Die Stämme unterschieden sich in der Geschwindigkeit der Cellulosehydrolyse. Bei pH 6,23 zeigte nur Stamm NB2 einen ca. 40-60 %-igen Filterpapierabbau nach 7 Tagen (Abbildung 52); BC1 zeigte noch geringe cellulolytische Aktivität (ca. 10 % Abbau nach 7 Tagen; Daten nicht gezeigt). Bei einem pH 6,35 erreichten Stämme NB2 und BC1 ebenfalls nach ca. 7 Tagen einen 40-60 %-igen Abbau des Filterpapiers. Bei einem pH-Wert von 6,44 bauten die Stämme NB2 und BC1 das Filterpapier nach ca. 7 Tagen vollständig ab, *C. thermocellum*

Ergebnisse

ATCC 27405 hat das Filterpapier nach dieser Inkubationszeit erst zu ca. 40-60 % abgebaut und erreichte bei diesem pH keinen vollständigen Abbau (Abbildung 53). Eine sichtbare Hydrolyse trat bei pH 6,35 und pH 6,44 bei Stamm NB2 am schnellsten ein. Bei pH 6,63 erreichten alle Stämme einen vollständigen Abbau nach 7 Tagen, bei pH 6,81 dauerte es bei den Stämmen BC1 und ATCC 27405 mit 4 Tagen weniger lang bis zum vollständigen Abbau des Filterpapiers als bei Stamm NB2 (7 d). 100 %-Filterpapierabbau erreichte am schnellsten Stamm BC1 bei pH 7,19 und 7,51 (2 d.), ATCC benötigte bei diesen pH-Werten jeweils 3 Tage und NB2 4 Tage bzw. 3 Tage. Alle Stämme waren bei pH 7,98 und 8,40 etwas weniger effizient als bei pH 7,51. Die für den Filterpapierabbau geeignetsten pH-Werte waren für Stamm BC1 und ATCC 27405 7,19 und 7,51 und für Stamm NB2 7,51 und 7,98.

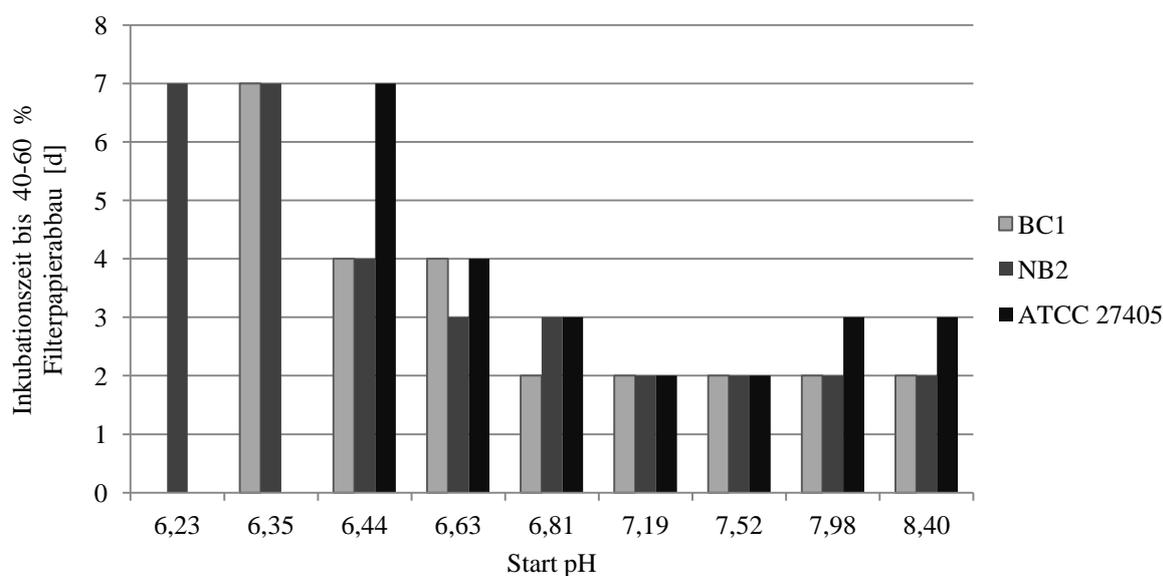


Abbildung 52: Inkubationszeit bis 40-60 % Filterpapierabbau bei 60 °C in GS2-Medium (n=2)

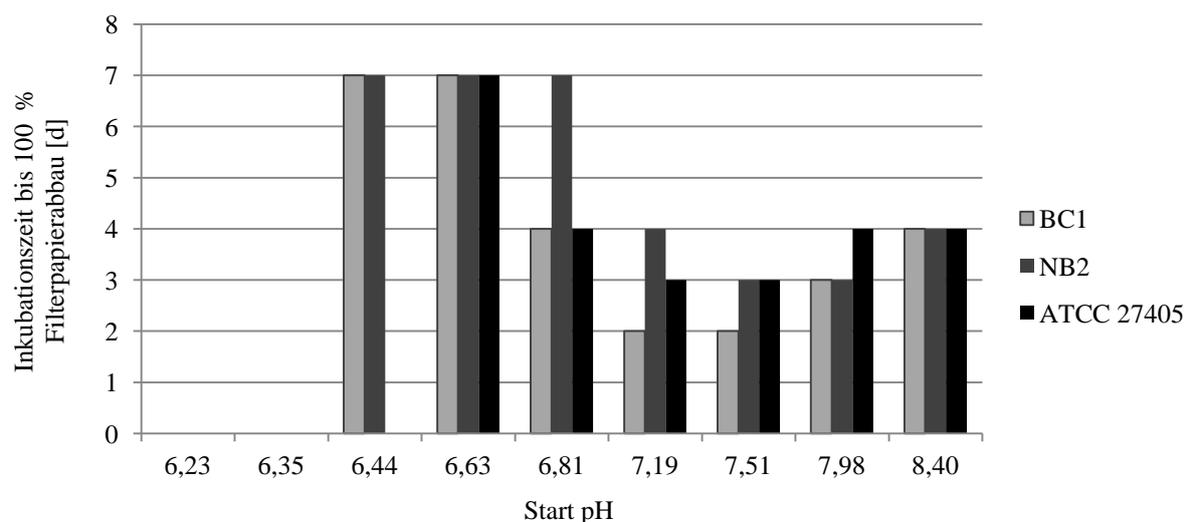


Abbildung 53: Inkubationszeit bis 100 % Filterpapierabbau bei 60 °C in GS2-Medium (n=2)

Biomasseabbau

Die hydrolytischen Eigenschaften der Stämme ATCC 27405, NB2 und BC1 bei zwei verschiedenen pH-Werten wurden zusätzlich mit Substrat 2 untersucht. Dazu wurde bei 60 °C mit Substrat 2 in GR-Medium inkubiert und der TS-Abbau nach 5 Tagen bei pH 7,4 bzw. nach 7 Tagen bei pH 6,8 bestimmt.

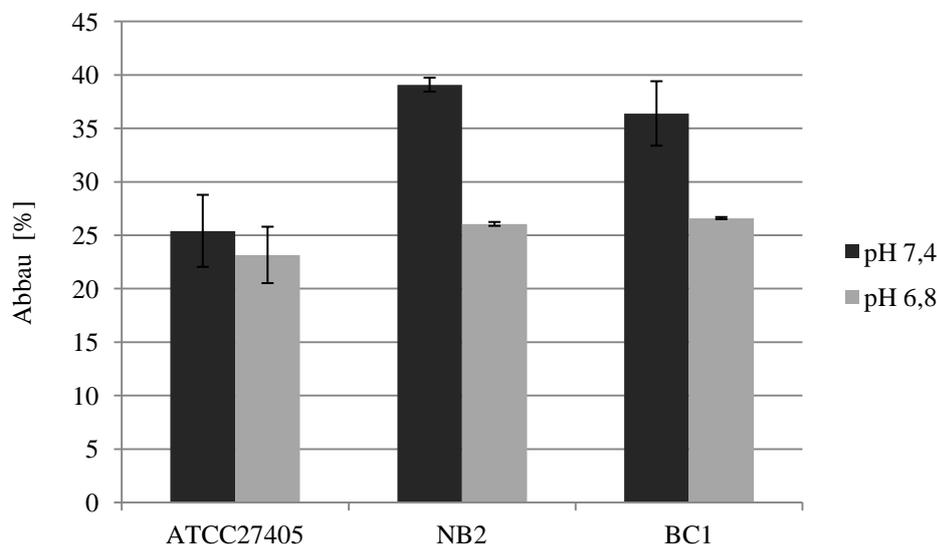


Abbildung 54: Substratabbau (Substrat 2) des *C. thermocellum*-Typstamms ATCC 27405 und der Isolate NB2 und BC1 bei pH 7,4 und 6,8 nach 5 bzw. 7 Tagen (Mittelwert und Standardabweichung, n=2)

Es zeigt sich, dass der Abbau der untersuchten Stämme bei pH 7,4 größer war (Abbildung 54). Stamm NB2 hat von allen Stämmen bei pH 7,4 am besten abgebaut, aber auch Stamm BC1 war besser als der Typstamm. Bei pH 7,4 war der Abbau der Stämme ATCC 27405, NB2 und BC1 25,4 %, 39,1 % und 36,4 %, bei pH 6,8 war der Abbau 23,2 %, 26,0 % und 26,6 %.

3.7 Inokulationsversuche

Die gewonnenen Erkenntnisse über Anforderung und Potential hydrolytischer Kulturen sollten letztendlich zur Auswahl und Etablierung geeigneter Inokula und damit zur Verbesserung der Hydrolyse lignocellulosereicher Substrate führen. Um dies zu testen, wurden Inokulationsversuche im Labor- und Technikumsmaßstab durchgeführt.

3.7.1 Labormaßstab

Um die Bedingungen in Biogasanlagen zu simulieren und die Auswirkung von Inokulation auf die Hydrolyse zu untersuchen, wurde die cellulolytische Anreicherung #10 im Batch als Inokulum getestet, dabei wurden verschiedene Ausgangsbedingungen gewählt. Es wurde entweder der ganze Ansatz autoklaviert (Substrat und GR-Medium), um ausschließlich den durch das Inokulum hervorgerufenen Substratabbau zu bestimmen. Ein weiterer Ansatz wurde nicht autoklaviert, um den Einfluss des GR und der darin enthaltenen Bakterien auf den Abbau zu untersuchen. Zum Vergleich wurde in einem dritten Ansatz nur der GR autoklaviert. Zur Kontrolle wurde jeder Ansatz ohne Inokulum mitgeführt. Es wurde 7 Tage bei 60 °C inkubiert und der Substratabbau bestimmt.

Ergebnisse

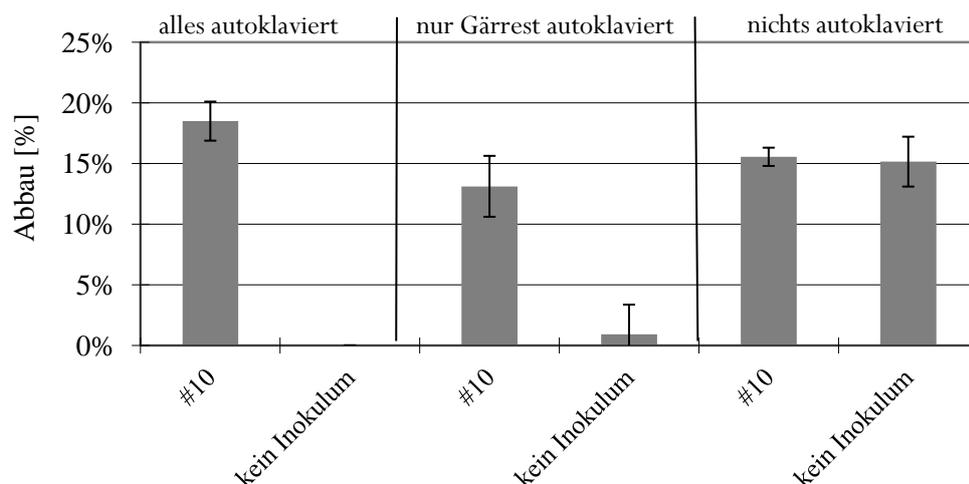


Abbildung 55: Substratabbau (Substrat 1) mit bzw. ohne Inokulum (Anreicherung #10) nach 7 Tagen bei 60 °C unter dem Einfluss des Autoklavierens der Medien-Komponenten (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem GR hydrolytische Bakterien zugeführt werden, die für einen ähnlichen guten Abbau von Substrat 1 sorgen, wie die selektierte Kultur (Abbildung 55). Mit den gewählten Bedingungen konnte durch Inokulation keine signifikante Steigerung des Substratabbaus erzielt werden, der Abbau mit Kultur #10 als Inokulum lag zwischen 13 % (mit autoklaviertem GR) und 18 % (ganzer Ansatz autoklaviert). Ohne Inokulum #10 war mit autoklaviertem GR kein oder sehr geringer Abbau zu verzeichnen (ganzer Ansatz autoklaviert: 0 % und GR autoklaviert: 1 %) mit nicht-autoklaviertem GR wurde ein Abbau von 15 % erreicht. Somit liegt der allein durch die Bakterien im GR erzielte Abbau im Bereich des mit dem Inokulum #10 erzielten Abbaus. Allerdings war in diesem Versuch der Abbau von Kultur #10 nach 7 Tagen um ca. 10 % niedriger als in vorherigen Versuchen, was durch eine andere GR-Charge verursacht worden sein könnte.

Mit RT-qPCR wurde überprüft, ob in den nicht-inokulierten Batch-Ansätzen mit unsterilem GR wie in #10 *C. thermocellum* als cellulolytisches Bakterium vorkommt. Es zeigte sich, dass in den „GR-Ansätzen“ ohne Inokulum ebenfalls ein messbarer Anteil stoffwechselaktiver *C. thermocellum* vorhanden war (7 % der *Bacteria*-16S rRNA; Abbildung 56), der für den Substratabbau in diesem Ansatz verantwortlich sein könnte.

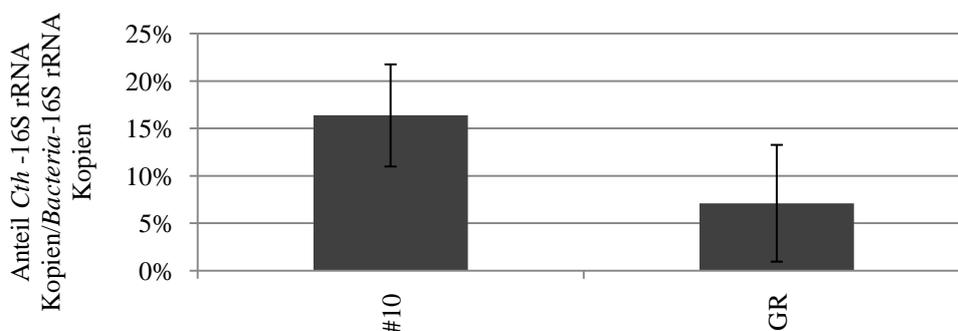


Abbildung 56: *C. thermocellum*-16S rRNA-Anteile an *Bacteria*-16S rRNA in Laboransätzen (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

3.7.2 Modellfermenter

Um den Effekt einer Inokulation mit einer hydrolytischen Kultur und deren Verbleib im Fermenter zu untersuchen, wurden 2 Modellfermenter (LfL, Hoh) mit Kultur #10 bzw. *C. thermocellum*-Isolat NB2 inokuliert (1:10). Die Betriebstemperatur der Fermenter war 60 °C, gefüttert wurde mit Substrat 2, als Puffer diente 25 % GR im Leitungswasser. In Fermenter LfL lag der pH zwischen 6,7 und 7,3; es wurde alle 3-4 Tage inokuliert. In Fermenter Hoh war der pH bei 6,5; es wurde einmalig zum Anfahren der Anlage inokuliert, der GR wurde autoklaviert.

LfL

Es wurde jeweils vor (und einmal nach) der Inokulation eine Probe entnommen und die 16S rRNA-Kopien der Leitbakterien des Inokulums, *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, quantifiziert. In Abbildung 57 ist der Anteil von *C. thermocellum* (16S rRNA-Kopien) und *C. stercorarium* im LfL-Fermenter bezogen auf die Gesamtbakterienzahl (16S rRNA) im zeitlichen Verlauf (Versuchszeitraum 6 Wochen) dargestellt. Zur Kontrolle wurde der Versuch ohne Inokulum wiederholt.

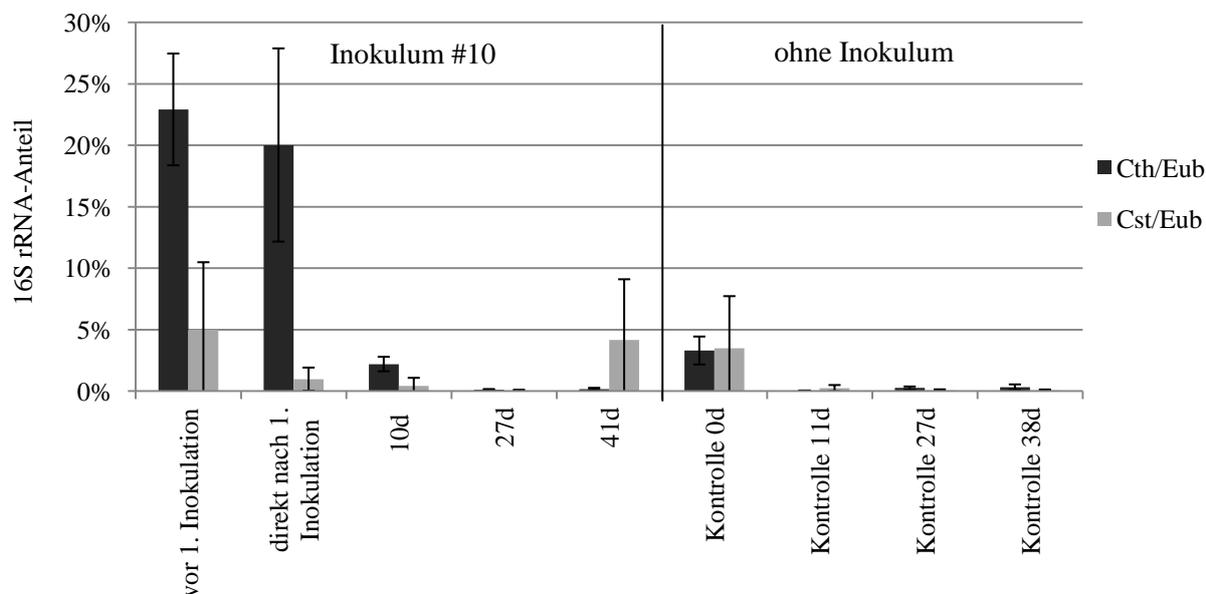


Abbildung 57: Anteile von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* an *Bacteria* in inokulierten und nicht-inokuliertem (Kontrolle) Technikumsfermenter (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

Es stellte sich heraus, dass der *C. thermocellum*-Anteil schon vor der ersten Inokulation sehr hoch war (23 % der Bakterien), der Fermenter aber zu diesem Zeitpunkt schon einen Tag bei 60 °C mit 25 % GR lief. Nach 4 und 6 Wochen (27 und 41 d) konnte *C. thermocellum* trotz mehrmaliger Inokulationen nicht im Fermenter etabliert werden. Auch im Kontrollfermenter (ohne Inokulum) war *C. thermocellum* zu Beginn mit 3 % der *Bacteria* vorhanden, dann aber über einen Zeitraum von 5 Wochen (38 d) nicht mehr nachweisbar. Auch *C. stercorarium* war im inokulierten Fermenter und im Kontrollfermenter zu Beginn des Versuchs nachweisbar (5 bzw. 1 % und 3 % der Bakterien). Es konnte aber kein Zusammenhang mit der Inokulation festgestellt werden. Nach 4 und 5 Wochen lag der Anteil in beiden Fermentern bei 0 %.

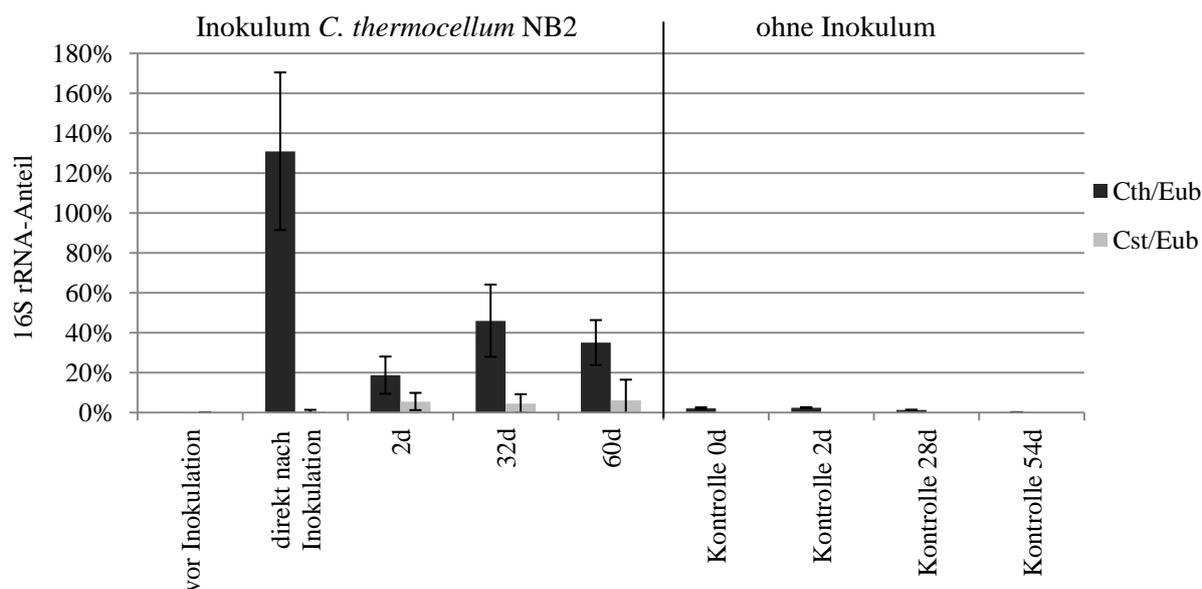
Hohenheim

Abbildung 58: Anteile von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* an *Bacteria* in inokulierten und nicht-inokuliertem (Kontrolle) Technikumsfermenter; in der Kontrolle wurde der *C. stercorarium*-Anteil nicht bestimmt (Mittelwert und Standardabweichung, n=2-4)

Der Modellfermenter Hohenheim wurde einmalig mit *C. thermocellum*-Isolat NB2 inokuliert, der zum Start verwendete GR wurde autoklaviert, so dass keine Bakterien aus dem GR in den Fermenter eingetragen wurden. Nach der Inokulation wurde ein *C. thermocellum*-Anteil von 131 % (bezogen auf die Gesamtbakterienzahl; =100 %) gemessen (Abbildung 58). Der *C. thermocellum*-Anteil sinkt im Zeitraum von 2 Tagen bis neun Wochen (60 d) nach der Inokulation auf Werte zwischen 19 und 35 %. *C. thermocellum* NB2 konnte mit einmaligem Autoklavieren des GR zu Beginn des Versuchs besser etabliert werden als die Mischkultur #10 im LfL-Fermenter. Es konnte auch *C. stercorarium* nachgewiesen werden, der vermutlich mit dem Substrat in den Fermenter eingetragen wurde, da erst nach 3 Tagen unsteriler GR in den Fermenter kam. Der *C. stercorarium*-Anteil lag zwischen 1 und 6 %. Bei der Kontrolle ohne Inokulum war der *C. thermocellum*-Anteil über den gesamten Versuchszeitraum mit maximal 2 % sehr gering (der *C. stercorarium*-Anteil wurde nicht bestimmt), was den positiven Effekt der Inokulation bezüglich der Bakterienzusammensetzung im Fermenter und der Etablierung des Inokulums bestätigt. Analysen der Universität Hohenheim zeigten im Versuch 1 (mit Inokulum) mit 159,1 l/kg oTS einen höheren substratspezifischen Methanertrag als in der Kontrolle ohne Inokulum (116,9 l/kg oTS).

4 Diskussion

Um die Gesamtökobilanz von Biogas als klimafreundlichem Energieträger im Vergleich zu Wind- und Solarenergie zu verbessern und der Konkurrenz mit Lebensmitteln entgegenzuwirken, ist der verstärkte Einsatz lignocellulosereicher Biomasse und die Optimierung des Celluloseabbaus ein entscheidender Schritt. Durch ein besseres Verständnis des Biogasprozesses kann evtl. auch die Auswahl von Energiepflanzen und die Zucht effizienterer Sorten gezielt angegangen werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse sollen einen Beitrag dazu leisten.

4.1 Nachweismethoden für Bakterien in Biogasanlagen

Ein Hauptziel in mikrobieller Ökologie ist es, mikrobielle Populationen mit Umweltprozessen in Verbindung zu bringen. Die quantitative Analyse bakterieller Populationen in Biogasfermentern ist wichtig für ein besseres Verständnis dafür, wie Bakterienpopulationen zusammenwirken und was ihre metabolische Aktivität zu einem gesteigerten Methanertrag beeinflusst (Weiss *et al.* 2008). Dabei ist die Wahl der Methode entscheidend für die daraus resultierenden Schlussfolgerungen. So liefern die Analyse von mRNA oder Proteinen Aussagen über die Aktivitäten, rRNA und DNA liefern Informationen über die Struktur der Bakteriengemeinschaft (Bürgmann *et al.* 2003).

Die Quantifizierung der art- oder gruppenspezifischen 16S rDNA mit qPCR war eine der in dieser Arbeit getesteten Methoden zum Monitoring von Bakterien in Biogasfermentern. Für die Quantifizierung der 16S rDNA Kopien wurde die SYBR Green-Methode verwendet, bei der das gebildete Produkt mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals des in doppelsträngige Nukleinsäure interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green gemessen wird. Die Datenbanken SILVA (Pruesse *et al.* 2007) und RDP (Cole *et al.* 2007) enthalten eine große Zahl von zugeordneten DNA-Sequenzen, die es möglich machen, spezifische Sonden und Primer zu designen.

Die entwickelte qPCR zum Nachweis von *C. thermocellum* bzw. *C. stercorarium* war mit den getesteten Kontrollen spezifisch, auch die Schmelzkurve zeigte nur einen spezifischen Peak, d.h. dass neben *C. thermocellum* und *C. stercorarium* keine anderen Mikroorganismen mit den entwickelten Primern erfasst wurden. Dies wurde auch *in-silico* mit der ARB-Software überprüft. Die Spezifität der CIII-Clostridien-qPCR wurde ebenfalls *in silico* mit der ARB-Software überprüft, aufgrund der Größe des Clusters und den Unterschieden in der 16S rDNA zwischen den CIII-Clostridien war hier ein Nachweis der Primerspezifität über die Schmelzkurvenanalyse aber nicht eindeutig möglich.

Ein Vergleich der qPCR-Ergebnisse mit Daten aus der Sequenzierung der 16S rDNA-Bank der Anreicherung #10 zeigte mit 30 bzw. 35 % Anteil an der Gesamtbakterienzahl für *C. thermocellum* ähnliche Werte (Abweichung um Faktor 1,2), der CIII- und *C. stercorarium*-Anteil in der untersuchten Probe war mit qPCR um den Faktor 1,8 bzw. 2,5 höher als mit Sequenzierung des klonierten 16S rDNA-PCR-Produkts. Der Unterschied ist vermutlich auf Effizienzunterschiede der PCR mit den verschiedenen Primern (CIII/Cst bzw. *Bacteria*) oder der Klonierung zurückzuführen, da die gDNA für beide Analysen dieselbe war. Evtl. amplifizieren die Primer andere in der Probe vorhandene Bakteriengruppen, die eine geringere Klonierungseffizienz hatten und somit bei der Sequenzierung der Genbank nicht

auftauchen. Die Größenordnung der Ergebnisse der qPCR und der Sequenzdaten ist jedoch vergleichbar, so dass auf in der Größenordnung zuverlässige qPCR-Daten geschlossen werden kann.

Ein Nachteil der qPCR ist, dass nur Genkopien quantifiziert werden, die Zahl der Genkopien pro Genom aber oft unbekannt ist (Daims und Wagner 2007). Deshalb ist eine exakte Quantifizierung von Bakterien mit qPCR nur möglich, wenn die Anzahl der Genkopien im Genom bekannt ist. 16S rRNA Gene können bei Bakterien in 1-15 Kopien pro Genom vorliegen. 89 % der *Bacteria* haben 1-7 16S rRNA Gene, 11 % der *Bacteria* haben 8 oder mehr 16S rRNA Gene, diese gehören zum Phylum *Firmicutes* oder zur Klasse γ -*Proteobacteria* (Lee *et al.* 2008). Das 16S rRNA-Gen liegt im Genom von *C. thermocellum* ATCC 27405 in 4 Kopien vor, bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 in 11 (Tabelle 25). Außerdem kann die Zahl der Genomkopien pro Zelle in verschiedenen Wachstumsphasen variieren (Ludwig und Schleifer 2000).

Tabelle 25: 16S rDNA-Kopien im Genom ausgewählter Clostridien

Gattung	Art	Stamm	16S rDNA-Kopien
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	SM 102	10
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	ATCC 13124	8
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	630	11
<i>Clostridium</i>	<i>thermocellum</i>	ATCC 27405	4
<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	ATCC 824	11
<i>Clostridium</i>	<i>botulinum</i>	ATCC 19397	8
<i>Clostridium</i>	<i>botulinum</i>	ATCC 3502	9

Weitere Probleme und Fehlerquellen bei der Quantifizierung mit qPCR könnten in der Methodik liegen, z.B. bei der Zell-Lyse, der DNA-Extraktion und Reinigung und unterschiedlicher Effizienz bei der PCR mit verschiedenen Primern und beim Klonieren.

Die entwickelte qPCR-Methode wurde mit Proben aus neun Biogasanlagen getestet. Dabei zeigte sich, dass der qPCR-Nachweis für die Anwendung mit Proben aus Biogasanlagen nicht gut geeignet war. *C. thermocellum* konnte mit der entwickelten qPCR-Methode in den neun Biogasanlagen nicht quantifiziert werden, die C_T -Werte lagen im Bereich der Negativkontrollen. Da nach Anreicherung bei 60 °C auf Cellulose *C. thermocellum* in drei getesteten Proben mit qPCR nachweisbar war, kann darauf geschlossen werden, dass *C. thermocellum* in den Fermenterproben vorhanden war, aber die qPCR nicht sensitiv genug ist, um das Bakterium zu detektieren. Eine Anreicherung bei 60 °C auf Cellulose verschiebt die Anteile der Mikroorganismen; thermophile, cellulolytische Bakterien wie *C. thermocellum* werden selektiv angereichert. Der *C. thermocellum*-Anteil war nun mit qPCR detektierbar, die C_T -Werte lagen deutlich unter den C_T -Werten der Negativkontrollen.

Eine Schwierigkeit bei der Quantifizierung von Bakterien in Proben aus Biogasanlagen bestehen in der Anwesenheit von Huminstoffen, welche die PCR (Taq Polymerase) inhibieren (Smalla *et al.* 1993, Tsai und Olson 1992, Tebbe und Vahjen 1993). Dies kann aber in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da mit den Bakterien-Primern für alle Fermenterproben ein Produkt deutlich vor den Negativkontrollen erhalten wurde.

Ein Grund dafür, dass die *C. thermocellum*-DNA in den Proben nicht zur Quantifizierung ausreichte, könnte auf eine sehr große Menge anderer (nicht-Target) DNA von anderen Prokaryonten, Eukaryonten oder Pflanzen zurückzuführen sein. Sakai *et al.* (2004) zeigten,

dass bei der DNA-Extraktion aus Pflanzen-assoziierten Mikroorganismen die Co-Extraktion pflanzlicher DNA ein Problem darstellt. Evtl. war der Anteil der gDNA einzelner Bakterienspezies durch die große DNA-Menge, die mitextrahiert wurde, verschwindend gering und mit qPCR nicht mehr detektierbar. Somit wäre der Anteil der 16S rDNA-Kopien einzelner Bakterienspezies unter der Nachweisgrenze, obwohl diese Bakterien in der Probe vorhanden sind, was durch Isolierung von *C. thermocellum* aus solchen Proben und qPCR-Nachweis nach Anreicherung gezeigt werden konnte.

Ein weiteres Problem, das zur Erhöhung der Nachweisgrenze führte, war der niedrige C_T der Negativkontrollen. Mit den *C. thermocellum*-Primern wurden z.T. sehr niedrige C_T -Werte um 30 gemessen. Primerdimere und andere unspezifische Produkte wurden durch Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen. Die Schmelzkurven der Negativkontrollen hatten wie die der Plasmidstandards (Targets) einen Peak bei 85 °C, was auf Kontamination der Proben mit *C. thermocellum*-DNA hindeutet. Auch durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (wie z.B. separate Pipetten, nukleasefreie Einmalspitzen) konnte dieses Problem nicht beseitigt werden, so dass die Nachweisgrenze für die Spezies *C. thermocellum* mit diesem Assay relativ hoch ist. Unter der Voraussetzung, dass zwischen dem Fluoreszenzsignal der Probe und der Negativkontrolle mindestens 5 Zyklen Abstand sind, konnten $2 \cdot 10^6$ 16S rDNA-Kopien pro ng DNA noch eindeutig nachgewiesen werden. Das Problem früher C_T -Werte bei Negativkontrollen scheint auch in anderen Arbeiten aufzutreten, jedoch wurde in Publikationen bisher wenig darüber berichtet (Mulé *et al.* 2006, Smith und Osborn 2009). Bei der Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl kam es bei den Negativkontrollen ebenfalls zu einem Fluoreszenzsignal. Jedoch waren die C_T -Unterschiede zwischen Proben aus Biogasanlagen und den Negativkontrollen mindestens 12,3 Zyklen, was eine Quantifizierung erlaubt.

Grundsätzlich ist ein Bakteriennachweis in Biogasanlagen mit qPCR möglich, in der Literatur sind zahlreiche Anwendungen der qPCR zum Nachweis und zur Quantifizierung von Bakterien in Umweltproben (z.B. Bodenproben), aber auch technischen Systemen wie Biogasanlagen beschrieben (Fierer *et al.* 2005, Dohrmann *et al.* 2010, Lim *et al.* 2008). Um die entwickelte qPCR zum Nachweis der Spezies *C. thermocellum* und *C. stercorarium* in Biogasanlagen anwenden zu können, müsste aber das Problem mit den Negativkontrollen gelöst werden, was weitergehende Experimente erfordern würde.

Eine weitere getestete Quantifizierungsmethode war die RT-qPCR. Diese wurde auch schon von Matsuda *et al.* zur Quantifizierung von Bakterien in Kot angewandt. Matsuda *et al.* (2007) konnten die Nachweisgrenze für Bakterienspezies pro g Kot von 10^5 bis 10^6 Zellen, was mit qPCR erreicht wird, auf 10^3 Zellen mit RT-qPCR (rRNA) senken.

Bei der RT-qPCR werden rRNA- oder mRNA-Kopien nach reverser Transkription über quantitative PCR nachgewiesen. Somit werden nur metabolisch aktive Mikroorganismen erfasst, was die Aussagekraft des Ergebnisses über am Prozess beteiligte Mikroorganismen im Vergleich zur qPCR verbessert. Für die Quantifizierung von *C. thermocellum*-, *C. stercorarium*- und CIII-16S rRNA wurden die für die 16S rDNA-qPCR entwickelten Primer verwendet. Die mit Plasmidstandards bestimmten Nachweisgrenzen waren unter der Voraussetzung von mindestens 5 Zyklen zwischen Fluoreszenzsignal der Probe und der Negativkontrolle für *C. thermocellum* $2,0 \cdot 10^6$ 16S rRNA Kopien, für *C. stercorarium* $2 \cdot 10^5$ und für CIII $1 \cdot 10^5$ in einem Probenvolumen von 0,3 g.

Eine Schwierigkeit stellte aufgrund der geringen Halbwertszeit der RNA der Probentransport dar. Vergleichende Untersuchungen mit unterschiedlich transportierten Proben zeigten, dass die rRNA beim Transport der Fermenterproben in verschlossenen Plastikbehältern und Styroporboxen über mindestens vier Stunden stabil blieb.

Weiter stellte sich heraus, dass der vollständige DNA-Verdau z.T. problematisch war, bei einigen Proben wurden geringe DNA-Mengen nach dem Verdau festgestellt. Somit war die Überprüfung des vollständigen Verdau sehr wichtig, er wurde mit Agarosegelelektrophorese und z.T. mit Kontrollansätzen ohne Reverse Transkriptase, die bei der qPCR kein Produkt liefern sollten, überprüft. Ein Grund für die Schwierigkeiten beim DNA-Verdau könnte sein, dass das Enzym DNase von Verbindungen in den Proben, wie z.B. Huminstoffen, gehemmt wird (Holben *et al.* 1988).

Zur Validierung der Methode wurde der *C. stercorarium*-Anteil an CIII-Clostridien in drei Biogasanlagen mit RT-qPCR und mit Sequenzierung des klonierten Produkts der CIII-Clostridien Primer bestimmt. Sowohl mit RT-qPCR als auch mit Sequenzierung der CIII-*rrs*-cDNA-Bibliotheken war der geringste *C. stercorarium*-Anteil in Anlage 3F-2 (2 bzw 13 %), der höchsten *C. stercorarium*-Anteil in HuF2 (19 bzw. 42 %). Durch die Kürze der PCR-Produkte (328 bp) war die Zuordnung der Sequenzen zu Bakterienspezies nicht eindeutig und nah verwandte Clostridien aus Cluster III wurden eventuell mit erfasst. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass eine Aussage über die Tendenz (mehr/weniger) des *C. stercorarium*-Anteils an CIII-Clostridien in verschiedenen Biogasanlagen möglich ist.

Die entwickelte RT-qPCR Methode zum quantitativen Nachweis von *C. thermocellum*-16S rRNA wurde mit Proben aus 13 Biogasanlagen, vier Technikumsfermentern und Batch-Ansätzen im Labor angewandt. Im Technikumsfermenter Hohenheim konnte die Inokulation mit *C. thermocellum* mit RT-qPCR der rRNA nachverfolgt werden, ebenso konnte *C. thermocellum* in Batch-Ansätzen quantifiziert werden. *C. thermocellum* 16S rRNA war aber nur in einer (Proben 4HFv, 4HFh, 4MR, 4E) von 13 Biogasanlagen nachweisbar; aus den Daten ergaben sich 10^7 *C. thermocellum* pro Gramm TS oder 10^6 *C. thermocellum* in 1 g Fermenterinhalt. In den anderen 12 untersuchten landwirtschaftlichen Biogasanlagen war die *C. thermocellum*-16S rRNA immer unter der Nachweisgrenze, ebenso in einer zweiten Messung der Anlage 4 (4HFv-2, 4HFh-2, 4MR-2), deren Probenahme ein Jahr später stattgefunden hat.

Bindung von RNA an Bodenbestandteile (Deutscher 2006) nach dem Zellaufschluss kann ein Grund dafür sein, dass die Nachweisgrenze auch mit RT-qPCR relativ hoch ist. Außerdem kommt der RNA-Extraktionsmethode eine große Bedeutung zu, da hiervon das qPCR Ergebnis ebenfalls beeinflusst wird (Sessitsch *et al.* 2002). Möglicherweise könnte es bei der RNA-Extraktion zum Abbau der RNA durch RNasen gekommen sein. Auch Huminstoffe, die die Taq Polymerase inhibieren, könnten die Quantifizierung von RNA beeinflusst haben (Smalla *et al.* 1993, Tsai und Olson 1992). Außerdem könnten Sekundärstrukturen der rRNA ein Problem darstellen (Engel *et al.* 2009).

Trotz der immanenten Schwierigkeiten bei Arbeiten mit RNA stellt die Quantifizierung der rRNA (RT-qPCR) im Vergleich zur Quantifizierung von rDNA (qPCR) eine bessere Monitoring-Methode auf Speziesebene dar, vermutlich aufgrund der hohen rRNA-Kopienzahl in den aktiven Zellen; je nach Wachstumsphase und Mikroorganismus liegt rRNA in bis zu 15.000 Kopien pro Zelle vor (Cammarano *et al.* 1986 und Woese *et al.* 1980). Positiv wirkte

sich vermutlich auch die geringe Halbwertszeit der RNA aus, so dass bei der RNA-Extraktion kaum pflanzliche RNA vorhanden sein sollte.

Neben der rRNA Quantifizierung wurde auch ein Assay zur Quantifizierung der *celS*-mRNA von *C. thermocellum* entwickelt. Cel48S ist eine der am stärksten exprimierten Cellulase von *C. thermocellum* und kommt im *C. thermocellum*-Cellulosom von auf Cellobiose gewachsenen Kulturen mit einem Anteil von 1,2 % vor (Gold und Martin 2007). Die Anwendung des Assays mit der für *C. thermocellum* positiv getesteten Proben aus Anlage 4 (Proben 4HFv, 4HFh, 4MR, 4E) zeigte, dass *celS*-mRNA von *C. thermocellum* in keiner der 4 Proben eindeutig detektiert werden konnte, was wiederum an den mit 29,2 und 27,9 niedrigen C_T -Werten der Negativkontrollen lag. Der C_T -Unterschied zwischen Proben und Negativkontrollen war maximal 3,7 Zyklen. Ein weiterer Grund für die geringere Sensitivität des *celS*-mRNA-Nachweises ist sicher, dass mRNA in geringerer Kopienzahl in der Zelle vorliegt als rRNA. Durch eine Verbesserung des Assays sollte die Quantifizierung von mRNA in Fermenterproben aber grundsätzlich möglich sein. Die Expression bestimmter Gene wurde bereits in Bodenproben quantifiziert (Baelum *et al.* 2008, Bürgmann *et al.* 2003, Gubry-Rangin *et al.* 2010, Wawer *et al.* 1997).

Eine weitere Methode, die auf der Quantifizierung von rRNA beruht, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Hier werden Bakterienzellen mit an rRNA hybridisierenden Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Mikroorganismen in ihrer natürlichen räumlichen Verteilung detektieren zu können, und somit Erkenntnisse über deren Zusammenwirken zu gewinnen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die schnelle und einfache Durchführung sowie die Möglichkeit, Zellen zu quantifizieren. Außerdem ist es möglich, bis zu sieben Spezies in einem Experiment nachzuweisen (Amann *et al.* 1996).

Die *C. thermocellum*- bzw. *C. stercorarium*-Sonden (Burrell *et al.* 2004) und das verwendete Hybridisierungsprotokoll waren für die Bakterien in Reinkultur gut geeignet und die Zellen konnten detektiert werden. Bei Proben aus Biogasanlagen traten jedoch durch die starke Hintergrundfluoreszenz von Lignin häufig Probleme auf. Auch anorganische Partikel behindern die Anwendung der Methode mit Umweltproben oft durch Interferenz, die Zellen von den Partikeln zu unterscheiden ist oft schwierig. Daher sind Methoden nötig, um die Bakterien von störenden Partikeln zu trennen (Caracciolo *et al.* 2005, Lunau *et al.* 2005). Diese Methoden erfordern meist eine Optimierung entsprechend der Beschaffenheit des Probenmaterials.

Die Vorbehandlung nach Lunau *et al.* 2005 mit 10 % Methanol und Ultraschall erwies sich mit einigen Probe als geeignet; da die Beschaffenheit der Proben sehr unterschiedlich war, konnte nicht für alle Proben ein gutes Ergebnis erzielt werden. Somit müsste die Vorbehandlung entsprechend der jeweiligen Probe angepasst werden. Ein Nachteil der Vorbehandlung ist außerdem, dass durch die harsche Behandlung Zellen zerstört werden und die räumliche Struktur der Bakteriengemeinschaft nicht erhalten bleibt.

Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kann außerdem nicht sichergestellt werden, dass das geringe Probenvolumen (10 μ l) auf dem Objektträger die Bakterienzusammensetzung in der Biogasanlage exakt widerspiegelt. Auch innerhalb einer FISH-Aufnahme ist die Bakterienverteilung oft nicht homogen, was eine Quantifizierung ebenfalls beeinträchtigen könnte. Es gibt aber einige Publikationen (Cirne *et al.* 2007, Burrell *et al.* 2004, Caracciolo *et*

al. 2005, O'Sullivan *et al.* 2007), in denen die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit Umweltproben (z.B. aus Böden, Biogasfermenter oder Klärschlamm) angewandt wurde. Für andere Anwendungen, wie z.B. zum Nachweis von Lebensmittelkontaminationen ist dies eine verbreitete Methode (Angelidis *et al.* 2011, Bisha und Brehm-Stecher 2010, Almeida *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2012).

Neben dem Nachweis von Nukleinsäuren stehen Methoden zur Quantifizierung von bakteriellen Proteinen, wie z.B. Western Blot oder ELISA, zur Verfügung. Dabei wird die Menge des Zielproteins über eine enzymatische Farbreaktion gemessen. Jedoch sind immunologische Methoden zur Bakterienquantifizierung für Umweltproben noch wenig verbreitet, vermutlich weil die Proteinextraktion aus Umweltproben oft schwierig ist. Ein Vorteil des Proteinnachweises wäre, dass Proteine direkt mit der Aktivität der Mikroorganismen in Verbindung gebracht werden können. Außerdem sind immunologische Nachweise schnell und einfach durchzuführen.

In dieser Arbeit wurden Methoden zum Nachweis der Exocellulase Cel48S von *C. thermocellum* getestet, da Enzyme der GH-Familie 48 eine wichtige Rolle beim Celluloseabbau spielen (Devillard *et al.* 2004, Dror *et al.* 2003, Kakiuchi *et al.* 1998), und CelS die katalytische Hauptkomponente des Cellulosom von *C. thermocellum* ist (Gold und Martin 2007).

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von CelS wurde eine Methode zur Proteinextraktion aus Fermenterproben entwickelt. Zum Lösen der Bindung zwischen CBM und Cellulose, welche sehr stabil ist, müssen verschiedene Interaktionen simultan gebrochen werden (Machado *et al.* 2009, Shoseyov und Warren 1997). Dies war mit 6 M Harnstoff und anschließender Ammoniumsulfat-Fällung möglich, es konnte aus Mischkulturen mit den Modellsubstraten in GR-Medium genügend Protein zum Nachweis von CelS gewonnen werden. Die Denaturierung mit SDS und Ultrafiltration erwiesen sich als ungeeignet. Zum einen konnte damit die Bindung von CelS ans Substrat nicht gelöst werden, zum anderen verstopften die Membranen durch Partikel in der Fermenterprobe, es konnte kein Protein-Eluat aufgefangen werden.

Für den Nachweis und die Quantifizierung der Exoglucanase CelS wurde ein Western Blot und ein ELISA getestet. Dabei konnte CelS von *C. thermocellum* mit polyklonale Antikörper und Bindung von mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern und Farbreaktion quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze des Western Blots für CelS lag bei 2,4 ng. Bei der Anwendung des Western Blots mit Fermenterproben stellte sich heraus, dass CelS auch nach vorheriger Inokulation mit einer *C. thermocellum*-Reinkultur nicht nachgewiesen werden konnte (Fermenter Hohenheim + Inokulum), die Verdünnung der *C. thermocellum*-Kultur durch die Inokulation war 1:10. In Labor-Versuchen allerdings konnte CelS nach einer 1:1-Verdünnung einer *C. thermocellum*-Kultur mit Fermenterproben mit Western Blot nachgewiesen werden. Hemmende Stoffe in der Fermenterprobe sind also vermutlich keine Gründe für die geringe Sensitivität des Proteinnachweises. Der entwickelte immunologische Nachweis der *C. thermocellum*-Cellulase CelS ist prinzipiell möglich, aber in der Praxis nicht anwendbar, da der Nachweis nicht sensitiv genug ist. Methoden zur Signalverstärkung müssten ausgearbeitet werden. Es gibt auch Beispiele, in denen Proteomanalysen mit Umweltproben angewandt wurden. So nutzte Benndorf *et al.* 2007 diese Methode, um v.a. funktionelle Aspekte in Boden und Grundwasserproben zu untersuchen.

Evtl. müsste auch die Methode zur Proteinextraktion verbessert werden, um den CelS-Nachweis sensitiver zu machen.

Die mit ELISA bestimmte CelS-Konzentration war bei einer *C. thermocellum*-Kultur, die mit Substrat 1 gewachsen ist, geringer (2,0 µg/ml) als bei einer auf Cellulose gewachsenen Kultur (2,8 µg/ml). Dieses Ergebnis stimmt mit einer Publikation von Gold und Martin (2007) überein, die zeigt, dass die Enzymzusammensetzung des Cellulosoms vom Substrat abhängt. In Fermenterproben mit vor der Proteinextraktion zugegebenem Protein aus *C. thermocellum*-Überstand konnte CelS aber nicht nachgewiesen werden. Um diesen Nachweis in der Praxis anwenden zu können, müsste er optimiert werden.

4.2 Thermophile, hydrolytische Bakterien für den Abbau lignocellulosereicher Biomasse

Für ein vertieftes Verständnis der Hydrolyse lignocellulosereicher Biomasse, das eine Effizienzsteigerung von Biogasanlagen verspricht, ist es wichtig, bessere Kenntnisse über cellulolytische Bakterien und deren Anforderungen zu gewinnen. Mehrere Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Bakterienzusammensetzung in Biogasanlagen. So ist bekannt, dass Bakterien der Gattungen *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Petrotoga*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio*, *Pseudorambibacter*, *Enterococcus* und *Eubacterium* zu den fermentativen Mikroorganismen in Biogasanlagen gehören. Sie produzieren kurzkettige Fettsäuren wie z.B. Formiat, Acetat, Lactat, Butyrat, Caproat, Aminosäuren, Alkohole (Ethanol, 2-Propanol, Propandiol, n-Butanol), CO₂ und H₂, die von acidogenen und acetogenen Bakterien sowie methanogenen Archaea weiter verstoffwechselt werden (Prozessmodell Biogas III, 2010). Insbesondere aus Untersuchungen an der Mikroflora des Rumen sind Bakterien bekannt, die an der Hydrolyse der schwer verdaulichen Bestandteile der Pflanzenzellwand beteiligt sind. Jedoch sind die Bedingungen in Biogasanlagen andere und deshalb unterscheidet sich auch die Zusammensetzung der Bakterien grundlegend.

In dieser Arbeit wurden cellulolytische Mischkulturen aus Umweltproben angereichert. Dazu wurde ein Medium mit flüssigem Gärrest als Zusatz ausgearbeitet, der sich bereits in anderen Arbeiten als geeigneter Medienzusatz für hydrolytische Bakterien erwiesen hat. Es zeigte sich, dass bei Erhöhung des GR-Anteils im Medium von 0 bis 40 % der Abbau durch Mischkultur #10 verbessert werden kann. Mit zunehmendem GR-Anteil wurde eine größere pH-Absenkung von 0,1 Einheiten (0 % GR) auf 1,4 Einheiten (bei 20 und 30 % GR) beobachtet, was die vermehrte Säurebildung und somit auch höhere Hydrolyserate widerspiegelt; dabei war die pH-Absenkung der Kulturen maximal 1,4 Einheiten. GR ist aufgrund der guten Pufferwirkung (was sich durch „Titration“ von Silage herausgestellt hatte, Daten nicht gezeigt) ein geeigneter Medienzusatz für hydrolytische Bakterien, der pH des Mediums steigt mit zunehmenden GR-Anteil von 6,4 (0 % GR) auf 7,1 (30 und 40 % GR). Jarvis *et al.* (1995) zeigten, dass eine GR-Rückführung den pH von 5,2 auf 6,0 erhöhte, jedoch konnte durch die Rezirkulation keine positive Wirkung auf den Substratabbau festgestellt werden (2-20 % TS-Abnahme im Durchfluss). Da reiner GR trotz Zentrifugation aber immer noch einen hohen Feststoffanteil enthält, der einerseits bei der Messung des Substratabbaus die eingesetzte Substratmenge beeinflusst und andererseits durch die Trübung die Beobachtung im Flaschenversuch stark erschwert, wurde als optimaler Kompromisswert

Diskussion

für alle Versuche 25% GR-Zugabe zum Leitungswasser festgelegt. Weitergehende Versuche zeigten, dass hydrolytische Bakterien-Kulturen mit 25 % GR in Leitungswasser mindestens ebenso gut, im Fall der Kulturen A, B, C, die bei pH 5,6 angereichert wurden, sogar besser wachsen wie im synthetischen, speziell auf die Clostridien-Anzucht zugeschnittenen Labormedium GS2. Die Versorgung mit allen notwendigen Mineralstoffen, Vitaminen, Fettsäuren etc. scheint also in diesem Medium sichergestellt zu sein.

Aus verschiedensten Umwelt- (Erde, Kompost, Mist) und Fermenterproben konnten cellulolytische Bakterienkulturen bei 42 °C (pH 7,4) und 60 °C (pH 7,4 bzw. 5,6) angereichert werden. Die Anreicherungen mit dem effizientesten Filterpapierabbau kamen aus Mist, Biogasfermentern und Biokompost und wurden hinsichtlich ihrer Bakterienzusammensetzung analysiert, um die Mikroorganismen, die für die Hydrolyse von Cellulose besonders wichtig sind, zu identifizieren. Dazu wurden 16S rDNA-Genbanken (z.T. mit vorgeschalteter ADRDA) der Anreicherungen F14, F102, BK, #10, LfL, A, B und C sequenziert. Da das Anreicherungsmedium GR enthielt und somit den Bedingungen in Biogasanlagen sehr ähnlich ist, wurde davon ausgegangen, dass die Bakterienzusammensetzung der Anreicherungen die für die Hydrolyse wichtigen Bakterien, die auch in Biogasanlagen vorkommen, enthalten.

Die Anreicherungen enthielten fast ausschließlich Bakterien des Phylum *Firmicutes* (7 % *Tenericutes* in Anreicherung F14). Darunter waren die Klassen *Clostridia* und *Bacilli* vertreten. Wie auch von Lynd *et al.* (2002) und Izquierdo *et al.* (2010) publiziert, scheinen *Clostridia* beim anaeroben Abbau von Cellulose eine wichtige Rolle zu spielen. In den thermophilen Anreicherungen bei pH 7,4 machen sie in Kultur BK einen Anteil von 30 % aus, in Kultur #10 und LfL einen Anteil von 83 %. In den Anreicherungen bei pH 5,6 machen *Clostridia* einen Anteil von 100 % aus, bei 42 °C und pH 7,4 einen Anteil von 64 und 59 %.

Am häufigsten in den thermophilen Anreicherungen #10 und LfL war die Gattung *Clostridium*, in Anreicherung BK *Bacillus*. Die Gattung *Clostridium* hatte in den thermophilen Anreicherungen bei pH 7,4 einen Anteil von 28, 50 und 31 %, bei pH 5,6 einen Anteil von 81, 71 und 97 % und in den 42 °C-Anreicherungen (bei pH 7,4) einen Anteil von 43 und 17 %. In den mesophilen war die Gattung *Streptococcus* am häufigsten.

Als Kennzahl für die Biodiversität in den Anreicherungen wurde der Shannon-Wiener-Index herangezogen. Der höchste Wert (größte Diversität) zeigte sich bei den mesophilen Mischkulturen (angereichert bei pH 7,4), vor den thermophilen Kulturen, die bei pH 7,4 angereichert wurden. Die bei pH 5,6 angereicherten Kulturen haben den niedrigsten Wert und somit die geringste Diversität. Das ist dadurch zu begründen, dass für die meisten cellulolytischen und acidogenen Bakterien der mesophile Temperaturbereich (Rastogi *et al.* 2009) und der neutrale pH-Bereich geeigneter ist.

Alle Anreicherungen haben eine unterschiedliche Zusammensetzung, d.h. in den verschiedenen Quellen waren jeweils andere cellulolytische Bakterien. Trotz gleicher Anreicherungsbedingungen stellten sich sehr unterschiedliche Bakterienpopulationen ein. Dass die Anreicherungen einen ähnlich effizienten Filterpapierabbau zeigten, lässt auf unterschiedliche cellulolytische Spezies mit vergleichbarem hydrolytischem Potential schließen.

Als vermutlich cellulolytische Spezies kommen Bakterien mit größter Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum*, *C. stercorarium*, *C. cellulosi* und *C. straminisolvens* in den Anreicherungen

vor, die als cellulolytisch charakterisiert worden sind. Die große Bedeutung der Clostridien beim Abbau von Cellulose konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. So waren in thermophilen cellulolytischen Anreicherungen von Sizova *et al.* (2011) verwandte Spezies der Clostridien *C. straminisolvens*, *C. thermocellum* und *C. clariflavum*; die GH 48-Analyse lieferte ebenfalls Gene von *C. straminisolvens*, *C. thermocellum*, *C. clariflavum* (Sizova *et al.* 2011). In thermophilen cellulolytischen Anreicherungen von Zverlov *et al.* (2010) wurden *C. thermocellum* und Clostridien mit Sequenzähnlichkeit zu *C. cellulosi* als cellulolytische Spezies identifiziert. *C. straminisolvens*-Verwandte kamen in allen drei Anreicherungen von Izquierdo *et al.* (2010) vor, in einer kam *C. clariflavum* als häufigster OTU vor.

In zwei der drei thermophilen Anreicherungen (pH 7,4) kommt ein OTU mit großer Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* vor (BK 5 %, #10 50 %), der als cellulolytisch anzusehen ist. *C. thermocellum* wurde als guter Celluloseabbauer beschrieben und daher extensiv untersucht (Viljoen *et al.* 1926). *C. thermocellum* ist weit verbreitet und wurde schon aus Pferdemist, menschlichen Fäkalien, Erde und marinem Schlamm isoliert (Freier *et al.* 1988). Somit ist es naheliegend, dass Bakterien dieser Spezies bei den gewählten Bedingungen angereichert werden. *C. thermocellum* hat das Temperaturoptimum 60 °C, das pH-Optimum ist bei pH 6,7-7,0, was den Anreicherungsbedingungen in etwa entspricht. Der mit 50 % hohe Anteil an *C. thermocellum* in Anreicherung #10 ist durch den Pasteurisierungsschritt erklärbar, bei dem Nicht-Sporenbildner abgetötet wurden und welcher bei allen anderen Anreicherungen nicht stattfand. In Anreicherung LfL (60 °C, pH 7,4) ist ein OTU (9 %) mit großer Sequenzähnlichkeit zu *C. stercorarium* wahrscheinlich cellulolytisch. *C. stercorarium* ist neben seiner moderaten cellulolytischen Eigenschaft besonders aufgrund der Vielzahl an Hemicellulasen ein interessanter Mikroorganismus für die Hydrolyse lignocellulosereicher Substrate in thermophilen Biogasanlagen (Poehlein *et al.* 2013). *C. stercorarium* ist in der Lage, Cellulose bei 65 °C und pH 7,3 optimal zu verwerten. Im Gegensatz zu *C. thermocellum* kann *C. stercorarium* auch Xylan verwerten (Madden 1993). Ein in den bei pH 5,6 angereicherten thermophilen Kulturen vorkommender, vermutlich cellulolytischer OTU ist zu *C. cellulosi* verwandt. Dieser OTU macht 81, 68, 10 % in den drei Anreicherungen A, B und C aus. *C. cellulosi* gehört zum Clostridien Cluster IV und kann im Unterschied zu *C. thermocellum* zahlreiche Kohlenhydrate als Substrate verwerten, wie beispielsweise Cellobiose, Xylose, Maltose und Glucose. Als Hauptprodukte entstehen neben CO₂ und Wasserstoff auch Ethanol und Acetat. Das Temperaturoptimum von *C. cellulosi* liegt bei 55-60 °C, das pH-Optimum bei 7,3 bis 7,5 (He *et al.* 1991). In Kultur C kommt außerdem ein OTU mit Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* vor (77 %). Evtl. handelt es sich bei den Bakterien der Anreicherungen A, B und C um säuretolerante Stämme, da das pH-Minimum von *C. cellulosi* und *C. thermocellum* normalerweise bei 6,2 liegt (He *et al.* 1991, Freier *et al.* 1988). Da bei pH-Werten unter 5,6 aus dem vorhandenen Probenmaterial (Kompost, Fermenterproben, Mist, Erde) keine cellulolytischen Kulturen angereichert werden konnten, ist anzunehmen, dass anaerobe Mikroorganismen, die bei diesem pH im verwendeten GR-Medium wachsen, sehr selten oder gar nicht vorhanden sind. Dies ist besonders für Biogasanlagen mit Hydrolysestufe von Bedeutung. In den mesophilen Anreicherungen (pH 7,4) ist der OTU mit Ähnlichkeit zu *C. straminisolvens* wahrscheinlich cellulolytisch (je 7 %). *C. straminisolvens* ist ein cellulolytisches Bakterium aus dem Clostridien-Cluster III und wurde von Kato *et al.* (2004a) erstmals isoliert. Das Temperaturoptimum des Bakteriums liegt

bei 50-55 °C, das pH-Optimum bei 7,5. Trotz der Anreicherungstemperatur von 42 °C war *C. straminisolvens* mit 7 % in den Anreicherungen vertreten. Weitere als cellulolytische bekannte Bakterien kamen in den mesophilen Anreicherungen nicht vor. Da die anderen OTUs (84 und 91 % der Bakterien) Sequenzähnlichkeit zu beschriebenen, nicht cellulolytischen Gattungen oder Spezies aufwiesen, ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Bakterien in diesen Anreicherungen nicht cellulolytisch ist.

Der geringe Anteil der als cellulolytisch bekannten Bakterien in den thermophilen Anreicherungen bei pH 7,4 lässt vermuten, dass cellulolytische unter den nicht-kultivierten Bakterien sind. Auch in drei thermophilen cellulolytischen Anreicherungen von Izquierdo *et al.* (2010) kamen ebenfalls nicht-kultivierte Celluloseabbauer vor, was durch Analyse der GH48-Gene gezeigt wurde. Die Zuordnung zu einer phylogenetischen Gruppe lässt jedoch nicht zwangsläufig eine Aussage über die physiologische Aktivität der darin vertretenen Bakterien zu. Außerdem wäre es möglich, dass in diesen cellulolytischen Anreicherungen die cellulolytischen Bakterien mengenmäßig nicht die Hauptvertreter sind, wie es in Anreicherung F14 und F102 (bei 42 °C und pH 7,4) der Fall ist. Acidogene und acetogene Bakterien, die Hydrolyse- und Stoffwechselprodukte der hydrolytischen Bakterien verwerten, könnten in cellulolytischen Anreicherungen überwiegen, was auch in Biogasanlagen der Fall sein könnte. Allerdings ist wegen der unterschiedlichen Kopienzahl des 16S rRNA-Gens in den Genomen die Anzahl der vorkommenden Bakterien nicht unbedingt proportional zu der Anzahl der gezählten Klone.

In Anreicherung BK wurde ein hoher Anteil an *Bacillus*-Spezies (63 %) gefunden. Dies kann evtl. darauf zurückzuführen sein, dass es auch viele fakultativ-anaerobe *Bacillus*-Arten gibt, darunter auch cellulolytische. Rastogi *et al.* (2009) fanden in mesophilen anaeroben Anreicherungen neben 62,3 % *Clostridiales* ebenfalls 37,7 % *Bacillales*.

Weitere OTUs in den Anreicherungen gehören vermutlich zu den saccharolytischen, proteolytischen und acidogenen Bakterien. Diese waren *C. caenicola*, *C. termopalmarium*, *Thermobrachium celere*, *Thermoanaerobacter* sp. oder *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* in den Anreicherungen bei 60 °C und pH 7,4, *C. proteolyticus*, *C. thermosuccinogenes*, *Caloramator* sp. in den Anreicherungen bei 60 °C und pH 5,6 sowie *Streptococcus* sp., *Acholeplasma equifetale*, *C. cochlearium*, *Peptostreptococcaceae* und OTUs mit weniger als 5 % wie z.B. *Sporanaerobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Tissierella* sp., *Lutispora thermophila*, *C. sporogenes*, *C. cochlearium*, oder *C. sporoshaeroides* in den Anreicherungen bei 42 °C und pH 7,4.

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, war der Einfluss des Substrats auf die Bakterienzusammensetzung. In dieser Arbeit wurde die Bakterienzusammensetzung von Anreicherung #10 auf Substrat 1 (Silagemischung) und Cellulose untersucht, um Hinweise auf wichtige cellulolytische Vertreter zu bekommen. Dabei zeigte sich mit der Silagemischung durch die Vielfalt an unterschiedlichen organischen Polymeren ein erhöhter Anteil des Hemicellulose-abbauenden Bakteriums *C. stercorarium* im Vergleich zum Cellulose-Substrat. Das pentoseverwertende Bakterium *C. stercorarium* hatte einen Anteil von 28 %, mit Cellulose als Substrat war der Anteil unter 3 %. Auch *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 (Beppu *et al.* 2004, Ohno *et al.* 2000) kam auf Silage mit 4 % vor. Dagegen war der Anteil von *Thermoanaerobacter* sp. auf Cellulose mit 17 % höher als auf Silage (4 %). *Thermoanaerobacter* sp. verwerten Zucker, wie D-Xylose und Arabinose

(Larsen *et al.* 1997); diese Bakterien haben mit Cellulose evtl. durch die große Menge an von *C. thermocellum* gebildeten Zuckern einen Wachstumsvorteil. Bakterien mit Sequenzähnlichkeit zu *Costridiaceae* Bakterium Aso3 kommen in beiden Substraten vor (17 und 22 %). Dies ist ein aus Kompost isoliertes, bisher nicht in Reinkultur kultivierbares, anaerobes, thermophiles Bakterium mit unklarer physiologischer Rolle (Kim *et al.* 2008). Das cellulolytische Bakterium *C. thermocellum* hat in der Cellulose-gewachsenen Kultur einen Anteil von 50 %, in der auf Substrat 1 gewachsenen Kultur nur 35 %. Ein Zusammenhang zwischen Substrat und Bakterienzusammensetzung wurde schon von Cirne *et al.* (2007) gezeigt. Cirne *et al.* konnten zeigen, dass beim anaeroben Abbau von Gras und Klee der Anteil an cellulolytischen Bakterien größer war als beim Abbau von Roter Beete; es wurden nur wenige gemeinsame Bakteriengruppen nachgewiesen, obwohl die Hydrolyserate ähnlich war. Dehority und Tirabasso (1998) konnten zeigen, dass die Anzahl cellulolytischer Bakterien in Rumen von Rindern durch Nahrung mit hohem Celluloseanteil um das 10-fache erhöht werden konnte; jedoch kam es dadurch nicht zu einem signifikanten Anstieg des Substratabbaus. Das Ergebnis zeigt, dass die Bakterienzusammensetzung vom Substrat beeinflusst wird und der Anteil cellulolytischer Spezies vom Cellulosegehalt des Substrats abhängt. Für Biogasanlagen bedeutet das, dass allein durch die Fütterung eines Substrats mit hohem Lignocelluloseanteil der Anteil an cellulolytischen Mikroorganismen im Vergleich zu anderen Substraten zunehmen könnte.

Um cellulolytische Bakterien für den Abbau von Lignocellulose in Biogasanlagen genauer charakterisieren zu können, ist es wichtig, neue Spezies in Reinkultur zu kultivieren. Hierfür wurden celluloseabbauende Bakterien über Einzelkolonieausstrich auf GR-Medium bei 60 °C und pH 7,4 isoliert. Durch den Zusatz von Gärrest sollte das Wachstum bisher auf gängigen Labormedien nicht-kultivierbarer Bakterienspezies gefördert werden. Je dreimalige Einzelkolonieausstriche lieferten aus fünf unterschiedlichen cellulolytischen Anreicherungen (Biogasanlagen, Kompost, Mist) zehn Neuisolate mit mindestens 99 % 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* ATCC 27405 (Sequenzlänge mindestens 1375 bp). Dies zeigt, dass *C. thermocellum* ubiquitär vorkommt, mit dieser Methode leicht zu isolieren und ein wichtiger (häufiger) Celluloseabbauer ist. Jedoch spiegelt das Ergebnis vermutlich nicht die Gesamtheit der in den Proben vorhandenen cellulolytischen Bakterien wider, da z.B. Anreicherung #10, aus der Stamm 5g isoliert wurde, auch *C. stercorarium* enthielt, welcher nicht isoliert werden konnte. Die gewählten Bedingungen begünstigen anscheinend das Wachstum von *C. thermocellum*, obwohl durch den GR ein den Biogasanlagen ähnliches Milieu geschaffen wurde. Die Isolierungsbedingungen müssten also stärker variiert werden, was pH und Medienzusätze betrifft, um andere, evtl. bisher nicht-kultivierte cellulolytische Spezies in Reinkultur isolieren zu können. Die Isolate lieferten allerdings die Gelegenheit, verschiedene und insbesondere neu isolierte *C. thermocellum*-Stämme miteinander zu vergleichen.

In der Vergangenheit durchgeführte Untersuchungen von cellulolytischen Bakteriengemeinschaften in Biogasanlagen bestätigten die in dieser Arbeit festgestellte wichtige Rolle von Bakterien des Phylum *Firmicutes* für den anaeroben Celluloseabbau. So konnten von Burrell *et al.* (2004) 100 % der Bakterien an Cellulosefasern in Biogasanlagen dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet werden, darunter *C. stercorarium*, *C. thermocellum* und *Bacteroides cellulosovens*, welche alle zur Ordnung *Clostridiales* gehören. Klocke *et al.* 2007,

Schlüter *et al.* 2008, Krause *et al.* 2008, Kröber *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009 zeigten ebenfalls, dass *Clostridia*, und darunter *Clostridiales* häufig in Biogasanlagen vorkommen.

Die Anwesenheit der cellulolytischen Spezies *C. thermocellum* und *C. stercorarium* aus den thermophilen pH 7,4-Anreicherungen in Biogasanlagen wurde mit der entwickelten RT-qPCR überprüft. Außerdem wurde analysiert, welche cellulolytischen Spezies aus Clostridien-Cluster III (CIII) im Celluloseabbau bei Biogasanlagen involviert sind. Dazu wurden Proben aus drei unterschiedlichen Biogasanlagen mit Sequenzierung von CIII-*rrs*-cDNA-Bibliotheken analysiert. CIII wurde ausgewählt, da die meisten cellulolytischen Clostridien dem Cluster III zuzuordnen sind (Collins *et al.* 1994, Freier 1988).

Es zeigte sich, dass *C. thermocellum* in den untersuchten landwirtschaftlichen Biogasanlagen zahlenmäßig nicht im erwarteten Maße vertreten ist. Mit RT-qPCR konnte die Spezies in nur einer (Anlage 4) von 13 landwirtschaftlichen Biogasanlagen und zwei Technikumsfermentern nachgewiesen werden. Die in den thermophilen Anreicherungen festgestellte Abundanz von *C. thermocellum* trifft für Biogasanlagen nicht zu. Nach Anreicherung bei 60 °C war *C. thermocellum* mit qPCR in Fermenterproben nachweisbar, was zeigt, dass das Bakterium in den Biogasanlagen in geringem Anteil vorhanden war, aber unterhalb der Nachweisgrenze der RT-qPCR. Auch in anderen Arbeiten wurde *C. thermocellum* in Biogasanlagen nachgewiesen (Schlüter *et al.* 2008, Burell *et al.* 2004, Krause *et al.* 2008, Jaenicke *et al.* 2011).

Dagegen konnte *C. stercorarium* in allen Proben aus 13 landwirtschaftlichen Biogasanlagen und zwei Technikumsfermentern mit RT-qPCR direkt nachgewiesen werden. Jedoch war der Anteil des Bakteriums bezogen auf Clostridien des Cluster III mit Werten zwischen 1 und 32 % z.T. gering, in zwei Anlagen war der Anteil 0 %. O'Sullivan (2007) konnten mit FISH ebenfalls zeigen, dass *C. stercorarium* in thermophilen Biogasanlagen weiter verbreitet ist als *C. thermocellum*. Aufgrund der Bedeutung von *C. stercorarium* in Biogasanlagen wurde das Genom des Typstamms sequenziert und annotiert (Poehlein *et al.* 2013). Die größeren (nachweisbaren) Anteile von *C. stercorarium* in Biogasanlagen könnten darauf zurückzuführen sein, dass dieses Bakterium durch eine größere Zahl an Hemicellulasen besser an die Substrate im Fermenter angepasst ist oder darauf, dass der *C. stercorarium*-Nachweis sensitiver ist. In Publikationen von Klocke *et al.* 2007, Schlüter *et al.* 2008, Krause *et al.* 2008, Kröber *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009 über die Bakterienzusammensetzung in Biogasanlagen wurde *C. stercorarium* nicht nachgewiesen.

Die RT-qPCR mit für CIII-Clostridien spezifischen Primern lieferte für alle der 13 untersuchten Biogasanlagen und zwei Technikumsfermentern ein Produkt; dC_T zwischen Proben und Negativkontrollen war bei allen Proben signifikant und betrug mindestens 8,1 Zyklen. Das ist ein Hinweis darauf, dass dem Clostridien-Cluster III eine große Bedeutung für den Abbau von Cellulose in Biogasanlagen zukommt. Der Anteil der CIII-Clostridien an der Gesamtbakterienzahl war unterschiedlich; er lag in zwölf Anlagen unter 10 %, in drei Anlagen zwischen 16-38 % (Anlage 4, 3F-2, 55- 1ph; alle thermophil). Auffällig ist, dass v.a. in den thermophilen Anlagen CIII-Clostridien einen großen Anteil ausmachen. In den mesophilen Anlagen kommen evtl. eher cellulolytische Bakterien vor, die nicht dem Cluster III zuzuordnen sind oder cellulolytische Bakterien machen in mesophilen Biogasanlagen einen geringeren Anteil aus – auch in den mesophilen Anreicherungen war der Anteil der bekannten cellulolytischen Bakterien mit 7 % sehr niedrig.

Das Clostridien Cluster III wurde genauer untersucht, da diese Clostridien eine herausragende Rolle beim Celluloseabbau spielen (Ji *et al.* 2012, Tabelle 4, S. 8) und die Abundanz dieser Clostridien in Biogasanlagen bereits mit RT-qPCR gezeigt werden konnte. Nach bisherigen Erkenntnissen kommen in der Domäne Archaea keine cellulolytischen Mikroorganismen vor, 80% der isolierten cellulolytischen Bakterien gehören zu den Phyla *Actinobacteria* und *Firmicutes*. Dabei sind alle Gram-positiven anaeroben cellulolytischen Bakterien im Phylum *Firmicutes* überwiegend in der Klasse *Clostridia*. Ein Großteil gehört zur Familie *Clostridiaceae*, Gattung *Clostridium*. Die meisten cellulolytischen Clostridien gehören zu Cluster III (Desvaux 2005).

Bei der Analyse des CIII-RT-qPCR-Produkts von Proben aus den drei Biogasfermentern HuF2, 3F-2 und 55-1ph (45, 52 und 55 °C) stellte sich heraus, dass die sequenzierten *rrs*-cDNA-Abschnitte die größten Ähnlichkeiten zu Sequenzen von bisher nicht in Reinkultur kultivierten Bakterien in der NCBI- und Silva-Datenbank hatten. Eine thermophile cellulolytische Anreicherung aus marinem Küstengebiet von Ji *et al.* (2012) enthielt 60 % Sequenzen mit *C. thermocellum* als nächste verwandte und kultivierte Spezies, die Sequenzähnlichkeit zu *C. thermocellum* betrug aber nur 87-89 %. Das zeigt das große Potential der Isolierung neuer cellulolytischer Bakterien, ein Großteil der cellulolytischen Clostridien aus Cluster III scheint bisher nicht in Reinkultur vorzuliegen. Die identifizierten CIII-Subcluster wurden aufgrund der kurzen Sequenz von 328 bp jeweils einer Gruppe von Clostridien zugeordnet: Subcluster CIII-1, CIII-2 und CIII-3 machen in den drei Biogasanlagen den größten Anteil aus. In Anlage HuF2 haben sie zusammen einen Anteil von 81 %, in Anlage 3F von 85 % und in Anlage 55-1ph von 92 %, wobei der Anteil der einzelnen Subcluster zwischen 8 und 44 % liegt. Die nächsten verwandten und kultivierten Bakterien der drei wichtigsten CIII-Subcluster in den drei untersuchten Biogasanlagen *C. clariflavum*, *C. straminisolvens*, *C. alkalicellulosi* (CIII-1), *C. termitidis*, *C. cellobioparum*, *C. josui*, *C. papyrosolvens*, *C. cellulolyticum* (CIII-2), *C. stercorarium* und *C. caenicola* (CIII-3) sind mit Ausnahme von *C. caenicola* als cellulolytisch beschrieben (thermophile Clostridien unterstrichen). Subcluster CIII-2 beinhaltet ausschließlich mesophile Clostridien Spezies und kommt mit 31 % in der bei 45 °C betriebenen Anlage HuF2 vor. In den beiden anderen Anlagen ist der Anteil dieses Subclusters geringer, was evtl. an der höheren Betriebstemperatur dieser Anlagen liegen könnte. Das dem Subcluster CIII-5 zugeordnete Bakterium *Acetivibrio cellulolyticus* ist ein mesophiles cellulolytisches Bakterium aus der Familie der *Ruminococcaceae*. Die nächsten verwandten und bereits kultivierten Bakterien der anderen Subcluster sind *C. thermocellum*, *C. thermosuccinogenes*, *Gracilibacter thermotolerans* und *Acidaminococcus intestinii*. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass ein 328 bp großer Bereich oftmals nicht für exakte phylogenetische Einordnung ausreicht – hierzu wäre eine Sequenzähnlichkeit von über 97,5 % über die komplette 16S DNA (1,5 kb) notwendig.

4.3 Optimale Bedingungen für Hydrolyse und hydrolytisches Potential verschiedener Bakterienkulturen

Da in Biogasanlagen andere (bisher nicht kultivierte) CIII-Clostridien vorkommen als in den cellulolytischen Anreicherungen und sich die Bakterienzusammensetzung der selektierten Anreicherungen unterschied, wurde untersucht, ob sich die gezielt angereicherten und

selektierten Bakterienkulturen in ihrem hydrolytischen Potential gegenüber „Fermenterkulturen“ ohne Selektion besonders effektiver Celluloseabbauer unterscheiden. Dazu wurde der durch die Kulturen hervorgerufene Substratabbau (TS-Abnahme) als Größe herangezogen. Ziel der Versuche sollte eine Einschätzung des Potentials einer Inokulation mit effektiven cellulolytischen Kulturen sein. Außerdem wurden mit einer Anreicherung die für den Abbau optimalen Bedingungen bestimmt, um die Betriebsparameter für das cellulolytische Inokulum optimieren zu können.

Die optimale Temperatur für den Substratabbau mit Kultur #10 (welche die cellulolytische Spezies *C. thermocellum* und *C. stercorarium* enthielt) war 60 °C. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle weiteren Abbauprobungen bei 60 °C durchgeführt. Auch andere charakterisierte cellulolytische Clostridien, die in Biogasanlagen vorkommen könnten, wie *C. cellulosi*, *C. clariflavum* oder *C. phytofermentans* haben das Temperaturoptimum bei 60 °C. Da thermophile Biogasanlagen überwiegend bei 50-55 °C betrieben werden, könnte die Erhöhung der Prozesstemperatur auf 60 °C evtl. eine Steigerung zumindest der Hydrolyserate bewirken. Auch z.T. deutlich höhere Temperaturen werden von diesen Bakterien toleriert, so dass die Temperaturunterschiede in einem Fermenter (z.B. auf der Oberfläche von Heizelementen) sich nicht schädlich auswirken.

In den vorgenommenen Versuchen wurde die Bedeutung des pH-Werts für cellulolytische Bakterien festgestellt; so konnte bei pH-Werten unter 5,6 keine cellulolytische Kultur angereichert werden. Aus diesem Grund wurde der optimale pH mit #10 und LfL (enthalten *C. thermocellum* und *C. stercorarium* als cellulolytische Spezies) durch Inkubation bei 60 °C und pH-Werten zwischen 4,8 und 7,9 über den Substratabbau nach 7 Tagen bestimmt. Das pH-Optimum lag bei 7,5-7,9. Bei pH-Werten unter 6,2 bzw. 5,7 fand kein Abbau statt. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den in der Literatur beschriebenen pH-Werten für optimales Wachstum von *C. thermocellum* JW 20 und *C. stercorarium* überein, die bei pH 6,7-7,0 bzw. 7,3 liegen (Freier *et al.* 1988, Madden 1983). Der Unterschied könnte aber durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen begründet sein. Da in dieser Arbeit ein den Biogasanlagen ähnliches Medium (GR-Medium) verwendet wurde, ist anzunehmen, dass die pH-Empfehlungen für hydrolytische Kulturen auch für Biogasanlagen zutreffen.

Der für die Hydrolyse optimale pH-Bereich wurde auch in einem weiteren Versuch bestätigt, in dem nur 21 Stunden inkubiert wurde, um die Einflüsse des in einer Hydrolysestufe (im Batch) stetig sinkenden pH-Werts zu minimieren. Auch in diesem Versuch war der Biomasse-Abbau in einem pH-Bereich von 7,4 bis 7,9 optimal; bei sinkenden pH-Werten bis 7,0 wurde der Abbau zunehmend schlechter.

Ein Vergleich des Abbaus bei pH 6,4 der Kulturen A, B und C (Anreicherungs-pH 5,6) mit den Kulturen #10 und LfL (Anreicherungs-pH 7,4) zeigte einen verbesserten Abbau der in saurem Milieu angereicherten Kulturen gegenüber den bei pH 7,4 angereicherten Kulturen; jedoch erreichten diese Kulturen nicht den maximalen Substratabbau der bei pH 7,4 angereicherten Kulturen in deren optimalen pH-Bereich. Die in Kulturen A und B enthaltenen und vermutlich cellulolytischen Bakterien sind verwandt mit *C. cellulosi*, in Kultur C zu *C. thermocellum* und *C. cellulosi*, was vermuten lässt, dass *C. cellulosi* bei niedrigeren pH-Werten effizienter hydrolysiert als die in Anreicherungen #10 und LfL enthaltenen hydrolytischen Bakterien. Dieses Ergebnis widerspricht Empfehlungen von Kaltschmitt und Hartmann (2001) oder dem Biogasforum Bayern (Prozessmodell Biogas III, 2010), die leicht

saure pH-Werte als optimal für hydrolytische Bakterien angeben. Die Aktivität von rekombinantem *C. thermocellum*-celS mit amorpher Cellulose dagegen ist bei pH 5-6 am größten, wie Guimaraes *et al.* (2002) zeigten. Auch Hon-nami *et al.* (1986) zeigten, dass extrazelluläre Cellulasen von *C. thermocellum* bei pH-Werten zwischen pH 4,5-7,5 aktiv sind. Das bedeutet, dass für eine optimale Hydrolyse die Wachstumsbedingungen der hydrolytischen Bakterien optimiert werden müssen, und nicht die Bedingungen für die Cellulasen.

Die mit Substrat bestimmten pH-Optima und -Untergrenzen konnten mit Filterpapier für ein breiteres Spektrum an Mikroorganismen bestätigt werden. Dazu wurde der Filterpapierabbau aller in dieser Arbeit verwendeten Mischkulturen (BK, #10, LfL, F14, F102, A, B, C) und der Reinstämme *C. thermocellum* NB2, *C. thermocellum* BC1 und *C. thermocellum* ATCC 27405 bei pH-Werten zwischen 5,72 und 8,50 visuell bestimmt. Der Abbau bei den pH-Werten 7,25 und 8,13 nach 4 Tagen bei allen Kulturen vollständig, d.h., dass der mit #10 und LfL bestimmte optimale pH-Bereich auch für die anderen Kulturen und für die Reinstämme zutrifft. Bei pH 6,79 und 8,5 dauerte es bei allen Kulturen bis zum vollständigen Abbau länger, bei pH 6,18 und 5,72 war kein oder ein nur unvollständiger Abbau festzustellen. Die thermophilen Mischkulturen LfL und BK sowie die bei pH 5,6 angereicherten Mischkulturen A, B und C zeigten bei pH 5,72 noch einen teilweisen Abbau des Filterpapiers nach 10 Tagen. Die lange Inkubationszeit von 10 Tagen zeigt, dass mit Anfangs-pH um 5,72 das Limit erreicht ist. Ein interessantes Ergebnis dabei ist, dass die beiden Kulturen A und B, die bei pH 5,72 etwas mehr Filterpapierabbau zeigten, *C. cellulosi* mit einem Anteil von 81 und 68 % als cellulolytische Spezies enthielten, in Kultur C dagegen lag der Anteil von *C. cellulosi* nur bei 10 %, in dieser Anreicherung war v.a. *C. thermocellum* als cellulolytische Spezies enthalten. Der Versuch untermauert die Erkenntnis, dass pH-Werte unter 7,0 für ein breites Spektrum an cellulolytischen Bakterienspezies eher ungeeignet für die Cellulose-Hydrolyse sind. Dies trifft auch für Kulturen zu, die bei niedrigen pH-Werten von 5,6 angereichert wurden, aber ebenfalls pH-Werte zwischen 7 und 8 bevorzugen. Das bedeutet, dass eine Trennung von Hydrolyse und Methanogenese aus diesem Aspekt nicht sinnvoll ist. Eine reine Hydrolysestufe kann durch pH-Senkung nicht erreicht werden, ohne auch die Hydrolyse negativ zu beeinflussen.

Da die Hydrolyse der geschwindigkeitslimitierende Schritt beim anaeroben Abbau von Cellulose ist, war es wichtig zu wissen, in welchem Zeitraum der Abbau stattfindet. Daher wurde der Abbau von Substrat 1 durch Kultur #10 bei 60 °C über 96 Stunden gemessen. Dabei zeigte sich, dass der Substratabbau v.a. in der Zeit zwischen 18 und 66 Stunden der Inkubation stattfindet. Es gibt also eine lag-Phase von 18 Stunden, in der die hydrolytischen Enzyme gebildet werden. Im Zeitraum zwischen 18 und 66 Stunden der Inkubation kommt es zur Hydrolyse des Substrats, die entstandenen Zucker werden von fermentativen Bakterien in Alkohole und Säuren metabolisiert (Acidogenese). Das cellulolytische Bakterium aus Clostridien Cluster III *C. papyrosolvans* zeigte den höchsten Ertrag von CMCase und Filterpaperase nach 48 Stunden (Rani *et al.* 2004). Die TS-Abnahme geht einher mit einer Ansäuerung des Mediums. Der pH-Wert sinkt von 7,15 nach 18 Stunden auf 5,81 nach 66 Stunden. Es fällt auf, dass der End-pH auch nach längerer Inkubation nicht unter 5,6 fällt. Dagegen zeigen Daten von Freier *et al.* (1988), dass der End-pH von *C. thermocellum* JW20 in Co-Kultur mit einem Glucose-verwertenden Bakterium unter 5,5 liegen kann. Im Zeitraum

von 66-96 Stunden kommt es weder zu einer wesentlichen pH-Absenkung, noch zu einer weiteren TS-Abnahme; es findet keine Hydrolyse und Acidogenese mehr statt, was an einer Endprodukthemmung der cellulolytischen Bakterien liegen könnte. Deshalb ist dieses Ergebnis nicht auf Biogasanlagen übertragbar, da hier die entstandenen Stoffwechselprodukte durch methanogene Archaea verbraucht werden. Eine Gasanalyse zeigte, dass dies hier nicht der Fall war; es wurde kein Methan gebildet.

Beim Vergleich des Abbaus von Substrat 1 durch die 3 thermophilen Anreicherungen BK, #10 und LfL bei pH 7,4 und 60 °C zeigten sich nur geringe Unterschiede im Abbau. Die Anreicherungen unterschieden sich jedoch im Abbaugrad und in der Abbaugeschwindigkeit von *C. thermocellum* ATCC 27405. Im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC 27405 bauten die Mischkulturen schon nach einem Tag Substrat 1 ab (12-14 %), was auf synergistische Effekte der in der Mischkultur enthaltenen Bakterien zurückzuführen ist. So wird das lignocellulosehaltige Substrat durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Enzyme der verschiedenen Bakterien (Cellulasen, β -Glucanasen, Xylanase, Lichenasen etc.) schneller aufgeschlossen als von *C. thermocellum* in Monokultur, der viele monomere Bestandteile von Hemicellulose nicht verwerten kann (Madden 1983). Nach 7 Tagen waren die Abbauraten 28-32 %, wobei *C. thermocellum* ATCC 27405 mit 28 % die geringste Abbaurate hatte. Über den Substratabbau von Bakterien im Batch gibt es kaum Daten. Ren *et al.* (2007) bestimmten den Abbau von MN301 und Avicel nach 10 Tagen durch *C. cellulolyticum* und *Clostridium populeti*, dieser lag für *C. cellulolyticum* bei 56 % bzw. 46 %, für *C. populeti* lag er bei 62 bzw. 52 %. Da es sich in dieser Arbeit aber um lignocellulosereiche Stroh-Heu-Mischung als Substrat handelte, war ein geringerer Abbau zu erwarten.

Eine Gasanalyse zeigte, dass die Kulturen BK, #10 und LfL kein oder wenig Methan bilden, also keine Methanogenese stattfindet. Obwohl BK und LfL nicht pasteurisiert wurden, wurde nach 7 Tagen kein nennenswerter CH₄-Anteil festgestellt (0,2 %), was vermutlich daran lag, dass Methanogene zu langsam wachsen (> 7 d) und die schnellen Überimpfungszyklen bei der Anreicherung nicht überstanden haben. Ein weiterer Grund für die geringe Methanbildung könnte auch eine eingeschränkte Aktivität dieser Archaea aufgrund der mit 60 °C im Vergleich zu Methanreaktoren, welche üblicherweise bei ca. 38-42 °C betrieben werden, höheren Temperatur sein. Kultur #10 wurde im Gegensatz zu Kulturen BK und LfL pasteurisiert, was den Unterschied von 0,2 % CH₄ erklären könnte. Da methanogene Archaea keine Sporenbildner sind, werden sie durch den Pasteurisierungsschritt abgetötet. Da bei keiner Mischkultur Methan in größeren Mengen nachweisbar war, ist der bessere Abbau der Mischkulturen im Vergleich zur *C. thermocellum*-Reinkultur nicht in einer pH-stabilisierenden Wirkung durch Umsetzung des gebildeten Acetats von methanogenen Archaea begründet. Insgesamt war der Abbau in den Batch-Kulturflaschen mit maximal 39 % relativ gering, was vermutlich auf die pH-Wert-Absenkung und die Anhäufung von Stoffwechselendprodukten im Batch zurückzuführen ist. Ein weitaus besserer Abbau sollte also erreicht werden, wenn parallel zur Hydrolyse auch die Methanogenese stattfinden kann.

Aufgrund der Komplexität der Bakteriengemeinschaften in Biogasanlagen sind Untersuchungen mit Reinstämmen wichtig, um die Zusammenhänge besser zu verstehen. In dieser Arbeit konnten verschiedene *C. thermocellum*-Stämme mit unterschiedlichem Abbaupotential isoliert werden. Die neu isolierten *C. thermocellum*-Reinkulturen bauten das Substrat 2 bei 60 °C und pH 7,4 unterschiedlich gut ab, der Abbaugrad war zwischen 23-39 %

nach 5 Tagen. Dies bedeutet, dass manche *C. thermocellum*-Stämme das Substrat nach 5 Tagen sogar besser abgebaut haben als Mischkulturen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Publikationen von Kato *et al.* (2004), Ng *et al.* (1981) und Weimer und Zeikus (1977), in denen gezeigt wurde, dass die dort verwendeten Co-Kulturen Cellulose vollständiger abbauen und mehr EtOH produzieren als cellulolytische Reinkulturen wie *C. thermocellum* oder *C. straminisolvens*. Es widerspricht auch der Annahme, dass Mischkulturen durch Synergismus effizienter im Abbau sind. Dagegen gibt es aber auch Untersuchungen von Dehority und Scott (1967) und Dehority (1973), die zeigen, dass cellulolytische Bakterien in Co-Kultur Cellulose weniger gut abbauen als in Reinkultur. Gründe hierfür sind vermutlich kompetitive und nicht-kompetitive Interaktionen zwischen cellulolytischen Bakterien (Krause *et al.* 2003). Der größte Abbau nach 2 Tagen wurde mit BC1 und *C. stercorarium* als Co-Kultur erzielt. Vermutlich geht also der initiale Angriff auf die Lignocellulose-Fasern aufgrund synergistischer Effekte mit diesen beiden Stämmen effizienter, was auch schon von Zverlov *et al.* (2010) für *C. thermocellum* DSM 1237 und *C. stercorarium* gezeigt wurde. Dagegen war der Abbau durch Kultur #10 nach 2 Tagen weniger effizient, obwohl in dieser Anreicherung ebenfalls *C. thermocellum* und *C. stercorarium* enthalten waren. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass die in dieser Kultur enthaltenen cellulolytischen Spezies weniger effizient sind, wie auch der aus dieser Kultur isolierte Reinstamm *C. thermocellum* 5g (30 % Abbau nach 5 d). Mischkulturen konnten also den initialen Angriff auf Lignocellulosefasern teilweise schneller bewerkstelligen als Reinstämme, aber besonders effiziente Stämme waren nach 5-tägiger Inkubation effizienter im Substratabbau als Mischkulturen.

Die Bestimmung des hydrolytischen Potentials der Anreicherungen und Isolate im Vergleich zu Anreicherungen aus Biogasanlagen ohne Selektion sollte das Potential einer Inokulation zeigen. Der Abbau von cellulolytischen Anreicherungen aus Biogasanlagen ohne Selektion besonder effizienter Kulturen zeigte, dass diese Kulturen bei 60 °C und pH 7,4 nach 5 Tagen nur 12-22 % des Substrats abgebaut haben, der End-pH war mit 5,4-5,8 etwas niedriger als bei den selektierten Anreicherungen. Damit liegen die Abbauleistungen der Fermenter-Anreicherungen unter denen der ausgewählten Anreicherungen. Das bedeutet, dass in den ausgewählten Anreicherungen Bakterien enthalten sind, die die Hydrolyse in Biogasanlagen evtl. verbessern könnten, eine Inokulation also grundsätzlich sinnvoll erscheint. Wie mit qPCR gezeigt wurde, ist *C. thermocellum* zumindest in drei der 13 60 °C-Fermenter-Anreicherungen nachweisbar, es handelt sich vermutlich um weniger effiziente *C. thermocellum*-Stämme.

4.4 Charakterisierung verschiedener *C. thermocellum*-Stämme

Neue cellulolytische Isolate aus Mischkulturen zu gewinnen und diese zu charakterisieren ist ein wichtiger Schritt, um die Vorgänge und Synergismen der beteiligten Mikroorganismen bei der anaeroben Methanisierung von Biomasse in Biogasanlagen besser zu verstehen. In dieser Arbeit stellte sich *C. thermocellum* als weit verbreiteter und effizienter Celluloseabbauer heraus, der in Biogasanlagen evtl. aufgrund von für ihn oft suboptimalen Prozessparameter scheinbar nicht in hohen Konzentrationen vorkommt.

Es konnten zehn verschiedene *C. thermocellum*-Stämme isoliert werden, die sich deutlich im Abbaupotential unterschieden. Für die Charakterisierung wurden die Stämme NB2, 5g, T2 und BC1 ausgewählt und mit dem russischen Isolat F7 (bei den Sequenzvergleichen JW20)

und dem Typstamm *C. thermocellum* ATCC 27405 verglichen, da sie verschiedene Varianten von Eigenschaften repräsentieren: unterschiedliche CipA-Länge (NB2, 5g kurz bzw. T2, BC1 lang, wie ATCC 27405), und unterschiedliche Abbauleistungen (NB2, BC1 gut/5g, T2 weniger). Es wurden neben der 16S rDNA zwei Cellulosomenkomponenten, *cipA* und *celR*, sequenziert und physiologische Eigenschaften wie Substratabbau, Temperaturlimit, pH-Limit, Substratspektrum und Produktspektrum analysiert.

Die in dieser Arbeit isolierten *C. thermocellum*-Stämme haben mindestens 99 % 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zu den bereits beschriebenen *C. thermocellum*-Stämmen ATCC 27405 und JW20, wie auch zu dem Isolat von Tachaapaikoon *et al.* (2012). Dennoch unterscheiden sich die *C. thermocellum*-Stämme im Abbau von Substrat 2 bei 60 °C und pH 7,4. Stamm T2 war am wenigsten effizient im Substratabbau, Stämme NB2 und BC1 am effizientesten. Auch der von Tachaapaikoon *et al.* beschriebene *C. thermocellum*-Stamm S14 baut kristalline Cellulose schneller ab als 27405 und JW20, zudem wird das Cellulosom dieses Stamms nicht von Cellobiose inhibiert, wie es bei *C. thermocellum* ATCC 27405 der Fall ist.

Der Filterpapierabbau der Stämme ATCC, NB2 und BC1 war pH-abhängig; die größten Unterschiede zeigten sich im pH-Bereich zwischen 6,23 und 6,44. Stamm NB2 tolerierte den niedrigsten pH (6,23), die Untergrenze für Cellulose-Hydrolyse von Stamm BC1 lag bei pH 6,36, die von Stamm ATCC 27405 bei pH 6,44, der bei diesem pH deutlich langsamer im Abbau war als die beiden neu isolierten Stämme. Bei den pH-Werten zwischen 6,63 und 8,40 waren die Unterschiede zwischen den Stämmen gering, die Zeit bis zum vollständigen Filterpapierabbau betrug maximal 4 Tage. Da sich verschiedene Stämme der Spezies *C. thermocellum* also in ihrem cellulolytischen Potential bei pH-Werten zwischen 6,23 bis 6,44 unterscheiden, ist für Biogasfermenter, die in diesem pH-Bereich betrieben werden, das Vorkommen säretoleranter Stämme entscheidend für eine effiziente Hydrolyse. Auch der Abbau von Substrat 2 war bei pH 6,8 mit den Stämmen BC1 und NB2 deutlich besser als mit dem Typstamm, was darauf hindeutet, dass das bessere Abbaupotential dieser Stämme bei niedrigen pH-Werten nicht vom Substrat abhängig ist.

Die Stämme zeigten auch bei der optimalen Temperatur Unterschiede. Die Stämme NB2 und BC1 bauten bei einer Temperatur von 65 °C Filterpapier deutlich schneller ab als die anderen *C. thermocellum*-Stämme und auch bei 67 °C waren diese beiden Stämme im Gegensatz zu den anderen Stämmen noch hydrolytisch aktiv. Bei 69 °C war keiner der untersuchten Stämme mehr in der Lage, Filterpapier abzubauen. Das Temperaturmaximum von *C. thermocellum* JW20 wird sogar mit 69 °C beschrieben (Freier *et al.* 1988); jedoch stimmt das Temperaturmaximum für Wachstum nicht zwangsläufig mit der Fähigkeit zum Celluloseabbau überein.

Alle Stämme konnten Cellulose (Filterpapier) und Cellobiose verwerten, die Stämme NB2, BC1 und F7 noch zusätzlich Glucose. Der von Freier *et al.* (1988) untersuchte *C. thermocellum*-Stamm JW20 wächst nach Adaption ebenfalls auf Glucose. BC1 konnte auch mit Sorbitol wachsen, allerdings erst nach vier Tagen. Auch der von Tachaapaikoon *et al.* (2012) isolierte Stamm (S14) konnte nach mehreren Tagen Glucose und Sorbitol verwerten. Drei von den 13 von Ozkan *et al.* (2001) isolierten *C. thermocellum*-Stämmen konnten Glucose verwerten. Von keinem Stamm wurde Fructose, Arabinose, Xylose, Xylan und Stärke verwertet. Die in dieser Arbeit isolierten Stämme konnten Arabinose, Xylose, Xylan und Stärke ebenfalls nicht verwerten. Dies stimmt weitgehend mit Literaturdaten überein

(Demain *et al.* 2005, McBee 1954, Johnson *et al.* 1982, Patni und Alexander 1971). Die von *C. thermocellum* nicht verwertbaren Zucker stehen damit anderen Bakterien im Biogasfermenter als leicht verwertbare Substrate zur Verfügung.

Die Stämme BC1, NB2, T2, ATCC 27405 und F7 produzierten gemäß GC-Analyse überwiegend Ethanol (0,05-0,1 %), außerdem Acetat (0,01-0,03 %) und Isopropanol (0,003-0,006 %). Zwei von Lv und Yu (2012) isolierte *C. thermocellum*-Stämme bilden 0,08 % Ethanol und 0,03-0,04 % Acetat aus 0,3 % Filterpapier; auch 13 von Ozkan *et al.* (2001) isolierte *C. thermocellum*-Stämme bilden v.a. EtOH und Acetat. Der von Tachaapaikoon *et al.* (2012) isolierte *C. thermocellum*-Stamm S14 bildet größere Mengen an Acetat und EtOH, und außerdem Propionat, das bei den in dieser Arbeit isolierten Stämmen nicht nachgewiesen wurde. Die Bildung des für manche *C. thermocellum*-Stämme charakteristischen gelben Farbstoffs ist unterschiedlich, wie es auch von Ozkan *et al.* beschrieben wurde. Die Stämme BC1 und 5g bilden ein gelbes Pigment, die anderen Stämme dagegen nicht. Die Funktion dieses Farbstoffs ist unklar. Eine Rolle beim Celluloseabbau wurde diskutiert (Ljungdahl *et al.* 1983).

C. thermocellum besitzt Cellulosome zum effizienten Abbau von Cellulose. Cellulosome können durch die Bindung verschiedener katalytischer Einheiten an das Gerüstprotein CipA in verschiedenen Varianten vorliegen (Demain *et al.* 2005). Die Größe des Cellulosoms von *C. thermocellum* variiert zwischen 2 bis 6,5 MDa und ist stammabhängig (Béguin und Lemaire 1996). Die Sequenzierung war hier hilfreich, um die festgestellten Größenunterschiede des *cipA*-Gens sowie Sequenzunterschiede zu identifizieren. Tachaapaikoon *et al.* (2012) stellten ebenfalls Größenunterschiede des CipA fest, führten diese aber auf Unterschiede in der Glykosylierung zurück, da 6-13% des *C. thermocellum*-Cellulosoms Kohlenhydrate sind (Gerwig *et al.* 1993).

Der auffälligste Unterschied zwischen den Sequenzen ist, dass die Stämme NB2, 5g und F7 im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC 27405, T2 und BC1 nur 8 statt 9 Cohesine besitzen. Die Scaffoldine (CipA) von *C. thermocellum* JW20 und des nah verwandten Cluster III-Clostridium *C. cellulolyticum* haben ebenfalls nur 8 Cohesine (Desvaux 2005). Dieser Unterschied wirkt sich aber nicht auf die Effizienz des Cellulosoms aus: der effizienteste Substratabbauer NB2 hat 8 Cohesine, zwei schlechte Abbauer, 5g und T2, haben 8 bzw. 9 Cohesine. Auf Proteinebene sind die Unterschiede der Stämme NB2, 5g, BC1 und JW20 im Vergleich zum Typstamm v.a. in den Regionen zwischen den Cohesin-Domänen des Cellulosoms zu beobachten. Diese Mutationen haben vermutlich keinen Einfluss auf die Cohesin-Dockerin-Interaktion. Dagegen haben die Stämme T2 und F7 keine Mutationen in den Regionen zwischen den Cohesin-Domänen. Die Stämme NB2, 5g haben die größten Unterschiede zu *C. thermocellum* ATCC 27405. Insgesamt gibt es bei diesen Stämmen neben dem fehlenden Cohesin 11 Deletionen und 26 bzw. 27 Aminosäureaustausche im Vergleich zum Typstamm. Beim Vergleich der Cohesine zeigte sich, dass Cohesin 7 vermutlich bei den Stämmen NB2, 5g, F7 und JW20 fehlt und bei Stamm BC1 7 Unterschiede im Vergleich zum Typstamm aufweist. Cohesin 4 der neu isolierten *C. thermocellum*-Stämme wies am meisten Aminosäureaustausche bzw. Deletionen im Vergleich zum Typstamm auf. Die Auswertung der Sequenzähnlichkeit der einzelnen Cohesine zeigte, dass die Cohesine 4, 5, 6 und 8 bei allen Stämmen keine eindeutigen Gruppen bilden. Carvalho *et al.* (2003) untersuchten den Cohesin-Dockerin-Komplex anhand des Cohesin 2 von *C. thermocellum* ATCC 27405. Deren

Ergebnissen zufolge haben die bei Stamm F7 festgestellten Mutationen von zwei Aminosäuren bei Cohesin 2 keinen Einfluss auf die Cohesin-Dockerin-Interaktion, die betreffenden Aminosäuren sind nicht in direktem Kontakt mit dem Dockerin.

Ein weiteres sequenziertes Gen der ausgewählten Stämme war das der im Cellulosom wichtigen Endoglucanase CelR. Das Gen der Endoglucanase CelR ist sehr stark konserviert. Im Vergleich zum Typstamm ATCC 27405 gibt es insgesamt drei Unterschiede in der Nukleotidsequenz (SNP), davon haben Stämme NB2, 5g und BC1 je 2 Mutationen, Stämme T2, F7 und JW20 jeweils eine. Nur einer der SNP führt bei Stämmen NB2, 5g, BC1, F7 und JW20 zu einem Aminosäureaustausch (Ile592Val). Da es sich bei *celR* um eine codierende Sequenz für ein enzymatisch aktives Protein handelt, ist eine starke Konservierung zu erwarten, da Aminosäureaustausche besonders im aktiven Zentrum zur Veränderung der Aktivität des Enzyms führen können.

4.5 Potential einer Inokulation

Üblicherweise dienen in der Praxis Bakterien aus gut laufenden Biogasanlagen als Animpfmaterial für Biogasanlagen. Die Inokulation von Biogasfermentern mit gezielt entwickelten Mikroorganismen ist eine Möglichkeit, die Bakterienpopulation zu beeinflussen und damit auf den Biogasprozess Einfluss zu nehmen. Inokula zur Steigerung des Methanertrags in Biogasanlagen gibt es bisher in Form von methanogenen Archaea. Da die Cellulosehydrolyse wegen des schwierigen und oft ineffizienten Aufschlusses, zu dem nur wenige Mikroorganismen befähigt sind, der „Flaschenhals“ im Biogasprozess ist, gibt es hier ebenfalls ein Potential, den Gesamtprozess zu optimieren.

Die vorangegangenen Versuche dieser Arbeit zeigten bereits, dass selektierte Anreicherungen und Isolate effizienter im Abbau der Modellsubstrate sein können. Daher wurde das Potential einer Inokulation mit der Kultur #10 im Batch und in einem Technikumsfermenter sowie mit *C. thermocellum*-Stamm NB2 in einem Technikumsfermenter getestet. Effekte auf Gasproduktion und Abbau wurden bewertet sowie der Verbleib des Inokulums beobachtet. Die Technikumsfermenter, die zum Test der Inokula verwendet wurden, wurden von der Universität Hohenheim bzw. der LfL zweiphasig betrieben, da so die Fermenter entsprechend den Anforderungen der vorherrschenden Bakterien optimiert werden können. Auch Cysneiros et al. (2012) setzte einen 2-Phasen-leach-bed-Reaktor erfolgreich zur Verbesserung des Methanertrags ein.

Der Substratabbau in unsterilen Batch-Ansätzen konnte durch Inokulum #10 nicht verbessert werden, was daran liegen könnte, dass bei den gewählten Bedingungen (60 °C, pH 7,4, 43 % Celluloseanteil im Substrat) hydrolytische Bakterien gut wachsen können und im GR für die Hydrolyse geeignete Mikroorganismen enthalten waren. Evtl. aufgrund einer anderen GR-Charge war der Abbau auch mit Kultur #10 niedriger als in vorangegangenen Versuchen. Mit Inokulum #10 wurde 13-16 % Abbau in unsterilen Ansätzen erzielt, ohne Inokulum #10 war der Abbau bei 15 %. Dagegen wurde nur 1 % abgebaut, wenn der GR autoklaviert war. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die für den ebenfalls guten Abbau verantwortlichen Kulturen aus dem GR stammen. Mit RT-qPCR konnte ein *C. thermocellum*-Anteil von 7 % in diesem GR nachgewiesen werden. Da die Bedingungen für thermophile cellulolytische Clostridien wie *C. thermocellum* optimal waren, haben sich die im GR enthaltenen cellulolytischen Clostridien stark vermehrt, wodurch die Inokulation mit 2 % (v/v) keinen

Vorteil brachte. Der gute Substratabbau dürfte durch die große GR-Menge (25 %) verursacht worden sein.

Ein ähnlicher Versuch wurde von der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) ebenfalls mit Kultur #10 als Inokulum durchgeführt. Die Betriebsbedingungen im Fermenter waren 60 °C und pH 6,6-7,3. Inokuliert wurde über den gesamten Versuchszeitraum (41 Tage) alle 3-4 Tage. Der GR wurde nicht autoklaviert. *C. thermocellum* hatte in den Messungen direkt vor und nach der ersten Inokulation einen Anteil von 23 bzw. 20 %. Der hohe *C. thermocellum*-Anteil vor der ersten Inokulation könnte dadurch begründet sein, dass der Fermenter zu diesem Zeitpunkt schon einen Tag bei 60 °C mit GR betrieben wurde. Durch den hohen *C. thermocellum*-Anteil scheint die Zugabe des Inokulums keinen zusätzlichen Effekt gehabt zu haben. *C. stercorarium*, das 28 % der Bakterien im Inokulum (#10) ausmacht, war in der direkt nach der Inokulation genommenen Probe zu 1 % vertreten, vor der Inokulation allerdings zu 5 %. Dies ist auf die Ungenauigkeit der Quantifizierungsmethode zurückzuführen. Im weiteren Versuchsverlauf konnte *C. thermocellum* trotz mehrmaliger Inokulationen nicht im Fermenter etabliert werden. Auch im Kontrollfermenter ohne Inokulum war *C. thermocellum* zu Beginn mit 3 % der Bakterien vorhanden, dann aber über einen Zeitraum von 38 Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Inokulationen im Technikumsfermenter der LfL über einen Zeitraum von 41 Tagen hatte auch keinen Effekt auf die Gasproduktion (mündl. Mitteilung Fr. Marin-Perez). Ein Grund dafür, dass *C. thermocellum* und *C. stercorarium* auch durch mehrmalige Inokulation nicht im Fermenter etabliert werden konnten, könnte der mit 6,6-7,3 relativ niedrige pH-Wert sein, was für *C. thermocellum* nicht optimal ist, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde – es wurde von anderen Bakterien verdrängt. Die Einhaltung enger äußerer Parameter für die Etablierung von *C. thermocellum* wurde von Narisawa *et al.* (2007) gezeigt. Hier konnte sich *C. thermocellum* neben *C. straminisolvans* erst nach einer Temperaturerhöhung von 50 auf 60 °C etablieren.

Ein weiterer Versuch zur Inokulation eines Biogasfermenters wurde von der Universität Hohenheim durchgeführt. Stamm NB2, der im Batch Filterpapier bis pH 6,44 vollständig abgebaut hatte, wurde erfolgreich zum Anfahren des Modellfermenters Hoh eingesetzt, der bei 60 °C und pH 6,5 betrieben wurde. Nach der Inokulation wurde ein *C. thermocellum*-Anteil von 131 % (=100 %) bezogen auf die Gesamtbakterienzahl gemessen. Die Abweichung kann durch unterschiedliche Effizienzen der Primer (Cth, Eub) verursacht worden sein. Es konnte auch *C. stercorarium* nachgewiesen werden (1 %), der vermutlich mit dem Substrat in den Fermenter eingetragen wurde, da erst nach 3 Tagen unsteriler GR in den Fermenter kam. Der *C. stercorarium*-Anteil lag im weiteren Versuchszeitraum von 9 Wochen bei 4-6 %, der *C. thermocellum*-Anteil war zwischen 19 und 46 %. Im Kontrollfermenter ohne Inokulum war der *C. thermocellum*-Anteil über den gesamten Versuchszeitraum mit maximal 2 % sehr gering, was den positiven Effekt der Inokulation bezüglich der Bakterienzusammensetzung im Fermenter und die Etablierung des Inokulums bestätigt. Evtl. hat dabei eine Rolle gespielt, dass der GR zu Beginn des Versuchs autoklaviert wurde. Außerdem scheint die Säuretoleranz des eingesetzten Stamms NB2 den entscheidenden Vorteil gegenüber dem anderen getesteten Inokulum #10 zu bringen. Analysen der Universität Hohenheim zeigten im Versuch mit Inokulum einen höheren Methanertrag im Vergleich zur Kontrolle ohne Inokulum (159,1 l/kg oTS bzw. 116,9 l/kg oTS). Die Zusammensetzung der Bakterien im Modellfermenter Hohenheim konnte durch Inokulation und die Wahl von für

das Inokulum geeigneten Bedingungen verändert werden. Abbaurate und Biogasertrag verbesserte sich. Ähnliche Ergebnisse wurden von Bagi *et al.* (2007) publiziert, so konnte durch einmalige Inokulation mit dem wasserstoffproduzierenden cellulolytischen Bakterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticum* ebenfalls eine Steigerung des Biogasertrags erreicht werden. Das Bakterium wurde über mehrere Monate im Fermenter nachgewiesen. Dagegen konnten Krause *et al.* (2001) durch Erhöhung des *Ruminococcus*-Anteils mit kontinuierlicher Inokulation den Abbau nicht verbessern. Da das Anfahren in Hohenheim mit sterilem GR durchgeführt wurde, also neben dem Inokulum höchstens wenige andere hydrolytische Bakterien in den Fermenter eingetragen wurden und in der Kontrolle ohne Inokulum *C. thermocellum* einen Anteil unter 3 % ausmachte, können die festgestellten positiven Effekte bei Gasmenge und -qualität dem Inokulum zugeschrieben werden.

Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass sich *C. thermocellum*-Stämme z.T. stark in ihren hydrolytischen Eigenschaften unterscheiden, spricht für den Nutzen einer Inokulation mit einem besonders effizient hydrolysierenden Bakterienstamm und belegt die Möglichkeit des Einsatzes von *C. thermocellum* zum Anfahren einer Biogasanlage. Die Inokulation mit einem ausgewählten *C. thermocellum*-Stamm kann also auch bei Anwesenheit und hohem Anteil von *C. thermocellum* im Fermenter Vorteile bringen. Voraussetzung ist aber die penible Abstimmung der für die jeweiligen Bakterien günstigsten Bedingungen. Mit geeigneten Prozessparametern und einem robusten und säuretoleranten Inokulum reicht eine einmalige Inokulation aus, um das Inokulum in einem 2-phasigen Fermenter zu etablieren. Im Gegensatz dazu steht eine Publikation von Schmack und Reuter (2010), die eine Steigerung der Biogausausbeute durch kontinuierliche Bakterienzugabe erreichen konnten, nicht aber bei einmaliger Zugabe.

4.6 Schlussfolgerungen (Verfahrenstechnische Einordnung)

Die Ergebnisse zeigen, dass bei genauer Kenntnis der für die „richtigen“ Bakterien notwendigen Bedingungen und der Möglichkeit, diese auch im Biogasfermenter einstellen und innerhalb relativ enger Grenzen aufrecht erhalten zu können, die optimale Bakterienzusammensetzung erreicht werden kann. Dies setzt die Kenntnis der beteiligten Schlüsselorganismen, der von ihnen durchgeführten Prozesse und die Charakterisierung der optimalen Bedingungen hierfür voraus. Die Bedingungen für eine optimale Hydrolyse wurden überraschenderweise auf 60 °C bei pH 7,4-8,0 gefunden, was Auswirkungen auf die zu wählenden Prozessparameter bei cellulosereichem Substrat haben könnte. Die optimale Bakterienzusammensetzung im Fermenter allein durch Temperatur und Substratzusammensetzung zu erreichen, sollte im Endeffekt möglich sein; dies ist jedoch sicher ein schwieriges Unterfangen und muss in weiteren umfangreichen Forschungsprojekten erarbeitet werden.

Eine Möglichkeit zur schnellen Einstellung der „richtigen“ Bakterienzusammensetzung bietet die Inokulation mit geeigneten Inokulaten, was aber ebenfalls ein Zusammenspiel mit der Einstellung der Fermenterbedingungen (Prozessparameter) voraussetzt, um einen nachhaltigen Effekt zu erreichen. *C. thermocellum* stellte sich in Anreicherungen und cellulolytischen Isolaten als effizienter Cellulose-Abbauer heraus, der in Biogasanlagen evtl. aufgrund für ihn nicht optimaler Betriebsbedingungen in sehr geringer Zahl vorhanden ist. Aufgrund der guten Toleranz niedriger pH-Werte um 6,5 und insgesamt sehr guter Abbaueffizienz wurde Stamm NB2 als Inokulum für den Modellfermenter Hohenheim ausgewählt. Der erzielte Gasertrag war höher als bei der nicht-inokulierten Kontrolle. Die Einstellung der für Stamm NB2 geeigneten Parameter (60 °C, pH 6,5) war für die Etablierung des Inokulums ebenfalls wichtig. Vermutlich aufgrund der Toleranz von pH-Werten bis 6,5, bei denen viele hydrolytische Bakterien nicht mehr cellulolytisch aktiv waren, konnte sich *C. thermocellum* NB2 im Fermenter etablieren. Für eine Hydrolysestufe in Biogasanlagen könnten somit Kulturen mit einer erhöhten Säuretoleranz ein geeignetes Inokulum darstellen.

5 Zusammenfassung

Der möglichst vollständige Aufschluss von Lignocellulose ist ein wichtiges Ziel, um cellulosehaltige Reststoffe besser nutzen zu können und Biogasanlagen wirtschaftlicher zu betreiben. Über diesen Teilprozess in der Biogasanlage ist noch relativ wenig bekannt; deshalb wurden die bei der Cellulose-Hydrolyse beteiligten Bakterien in diesem Projekt eingehend untersucht. Hierbei wurden sowohl neue und teilweise überraschende Ergebnisse gefunden als auch weiterer Forschungsbedarf definiert.

Verschiedene Quantifizierungsmethoden für cellulolytische Bakterien wurden ausgearbeitet und getestet. Methoden, die auf qPCR und Reverse Transkriptase (RT)-qPCR beruhen (16S rDNA und Strukturgen *celS*), wurden bei Fermenterproben erfolgreich eingesetzt. Mit RT-qPCR konnten die cellulolytischen Spezies *C. thermocellum* und *C. stercorarium* in Biogasanlagen quantifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Clostridien des überwiegend cellulolytischen Cluster III häufig in Biogasanlagen vorkommen und einen Anteil von bis zu 38 % der bakteriellen 16S rRNA ausmachten. Der Nachweis der *C. thermocellum*-Cellulase CelS mit Western Blot und ELISA wurde ausgearbeitet. Diese Nachweismethoden waren aber nicht sensitiv genug für, um *C. thermocellum* nach der Inokulation in den Fermenterproben quantitativ verfolgen zu können. Bei der Anwendung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) war die Hintergrundfluoreszenz der Fermenterproben nur durch Vorbehandlung zu reduzieren, welche probenspezifisch variiert werden musste, so dass diese Methode ebenfalls nicht zum Monitoring von Fermenterproben eingesetzt wurde.

Um Hinweise auf effiziente cellulolytische Bakterien zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die Zusammensetzung von auf Cellulose angereicherter Bakterienkulturen sowie Cluster III - Clostridien (CIII) in Biogasanlagen untersucht. Die Bakterienzusammensetzung war in bei gleichen Bedingungen aus unterschiedlichen Quellen angereicherten Kulturen unterschiedlich, die Anreicherungen zeigten aber einen ähnlichen Substratabbau. Ein Großteil der Bakterien in den Anreicherungen gehörte zur Klasse *Clostridia*. Die als cellulolytisch bekannten darunter waren je nach Anreicherungs-Temperatur und -pH unterschiedlich – im thermophilen Bereich (60-65 °C) lieferte ein pH von 5,6 v.a. *C. cellulosi* gegenüber *C. thermocellum* und *C. stercorarium* bei pH 7,4. Bei 42 °C (pH 7,4) war *C. straminisolvens* in den Anreicherungen vertreten. In diesen Anreicherungen waren aber auch viele Spezies mit Sequenzähnlichkeit zu bisher nicht-kultivierten Bakterien, unter denen sich evtl. auch cellulolytische Bakterien befinden können. Die Diversität war in den mesophilen Anreicherungen bei pH 7,4 am größten und in den thermophilen Anreicherungen bei pH 5,6 am geringsten.

Die wichtige Rolle der CIII-Clostridien wurde v.a. für die thermophilen Biogasanlagen bestätigt. Die genauere Analyse der CIII-Clostridien in drei Biogasanlagen durch Klonierung und Sequenzierung des RT-qPCR-Produkts (16S rRNA) deutet auf ein breites Spektrum bisher nicht-kultivierter cellulolytischer CIII-Clostridien hin, da alle Sequenzen die größte Ähnlichkeit zu bisher nicht-kultivierten Bakterien der NCBI- und SILVA-Datenbank hatten. In den drei Biogasanlagen kamen zehn verschiedene Subcluster von CIII vor, davon machten die drei Subcluster, denen die meisten Sequenzen zugeordnet werden konnten, zusammen einen Anteil von 81, 85 und 92 % der Sequenzen aus. Die Vertreter dieser Subcluster sind nah

Zusammenfassung

verwandt zu den cellulolytischen Clostridien *C. clariflavum*/*C. straminisolvens*/*C. alkallicellulosi* (CIII-1), *C. termitidis*/*C. cellobioparum*/*C. josui*/*C. papyrosolvens*/*C. cellulolyticum* (CIII-2) und *C. caenicola*/*C. stercorarium* (CIII-3). *C. thermocellum* scheint in Biogasanlagen eine untergeordnete Rolle zu spielen, das Bakterium konnte im Gegensatz zu *C. stercorarium* mit RT-qPCR in 15 untersuchten Anlagen nicht nachgewiesen werden, *C. stercorarium* war in allen 15 Anlagen nachweisbar.

Der pH spielt bei der Hydrolyse eine andere Rolle als bisher angenommen wurde. Der für die Hydrolyse optimale pH lag etwa zwischen 7,4 und 8,0 (mit Mischkulturen ermittelt). Dieser pH bestätigte sich beim visuellen Test mit Filterpapier mit allen in dieser Arbeit verwendeten Kulturen und *C. thermocellum*-Neuisolaten. Es zeigte sich eine pH-Untergrenze bei pH 5,72; bei diesem pH fand kein vollständiger Filterpapierabbau mehr statt. Die schlechte Verträglichkeit cellulolytischer Bakterien gegenüber sauren pH-Werten spiegelt sich auch in der pH-Untergrenze für cellulolytische Anreicherungen von pH 5,6 wider; unterhalb von pH 5,6 konnte keine cellulolytische Kultur angereichert werden.

Flüssiger Gärrest (GR) aus einphasigen Biogasanlagen wurde als wichtiger Medienbestandteil identifiziert. Dabei ist die Pufferwirkung des GR wichtig, um den pH im neutralen Bereich zu stabilisieren. GR-Bestandteile reichten für die hydrolytischen Kulturen als Medienzusatz zu Leitungswasser aus; durch Erhöhung des GR-Anteils von 0 auf 40 % konnte der Substratabbau verbessert werden.

Die für die Hydrolyse geeignetste Temperatur (thermophiler Bereich) wurde mit Anreicherungen #10, welche *C. thermocellum* und *C. stercorarium* als cellulolytische Spezies enthielt, ermittelt. Es zeigte sich, dass die Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose bei 60 °C im Vergleich zu 55 und 65 °C besser abläuft. Thermophile Biogasanlagen werden überwiegend bei 50-55 °C betrieben, somit könnte die Erhöhung der Prozesstemperatur evtl. eine Steigerung der Hydrolyserate bewirken.

Einige der zehn in dieser Arbeit isolierten *Clostridium thermocellum*-Stämme hatten hervorragende hydrolytische Eigenschaften. Physiologische Eigenschaften und der molekulare Aufbau zweier Leitgene ihrer Cellulase-Systeme (*cipA* und *celR*) wurden bei vier Stämmen charakterisiert. Das Temperaturmaximum für Filterpapierabbau variierte bei den isolierten *C. thermocellum*-Stämmen zwischen 65 und 67 °C, Stamm NB2 hat als einziger bis pH 6,23 40-60 % Filterpapier abgebaut und eine sichtbare Hydrolyse trat bei diesem Stamm bei pH-Werten von 6,35 und 6,44 am schnellsten ein. Zwei der Neu-Isolate waren in der Lage, Glucose zu verwerten, einer davon (BC1) wuchs auch mit Sorbitol. Die gebildeten Produkte mit 1 % Filterpapier waren bei allen Stämmen v.a. Ethanol, Acetat und 2-Propanol; die absoluten Mengen unterschieden sich geringfügig. Die Cellulase CelR zeigte auf DNA-Ebene bis zu drei Unterschiede in der Nukleotidsequenz (SNP), einer davon prägt sich bei den Sämmen BC1, NB2 und 5g wie auch bei den Stämmen F7, DSM1313 und JW20 auf Protein-Ebene aus. Bei Stamm NB2 und 5g fehlte ebenso wie bei F7 und JW20 das Cohesin 7 (im Vergleich zum Typstamm ATCC 27405). Weitere nicht-konservative Mutationen tauchten bei diesen Stämmen v.a. im Bereich der PT-reichen Regionen zwischen den Cohesinen des CipA auf. Aus den unterschiedlichen Variationen von CipA bei den verschiedenen *C. thermocellum*-Stämmen ergaben sich aber keine Hinweise auf die Effektivität des Cellulosoms.

Zusammenfassung

Der neue isolierte *C. thermocellum* NB2 und eine der Anreicherungen (#10) wurden zur Inokulation von Modellfermentern eingesetzt, ihr Verbleib im Fermenter verfolgt und der Fermentationserfolg gemessen. Bei Einhaltung der für das Inokulum geeigneten Bedingungen (60 °C, pH 6,5) konnte mit *C. thermocellum* NB2 ein positiver Effekt auf den Methanertrag erzielt werden. Die Inokulation in Technikumsfermentern konnte mit RT-qPCR verifiziert und die Etablierung des Inokulums bestätigt werden. Inokulum #10 konnte dagegen trotz mehrmaliger Inokulation nicht im Fermenter etabliert werden, was evtl. am für diese Kultur eher niedrigen pH im Fermenter lag (pH 6,7-7,3), so dass sich hier andere hydrolytische Bakterien durchgesetzt haben.

6 Literatur

- Almeida, C., N.F. Azevedo, R.M. Fernandes, C.W. Keevil, M.J. Vieira (2010)** Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(13):4476-85
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olsen, S. W. Chrisholm, R. Devereuxand, D. A. Stahl (1990)** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925
- Amann, R., J.Snaidr, M. Wagner, W. Ledwig, KH. Schleifer (1996)** In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* 178:3496–3500
- Amann, R., W. Ludwig, K. H. Schleifer (1995)** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169
- Andersson, J., L. Björnsson (2002)** Evaluation of straw as a biofilm carrier in the methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion of crop residues. *Bioresource Technology* 85(1):51-56
- Angelidis, A.S., I. Tirodimos, M. Bobos, M.S. Kalamaki, D.K. Papageorgiou, M. Arvanitidou (2011)** Detection of *Helicobacter pylori* in raw bovine milk by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int. J. Food. Microbiol.* 151(2):252-6
- Baelum, J., M. H. Nicolaisen, W. E. Holben, B.W. Strobel, J. Sørensen, C. S Jacobsen (2008)** Direct analysis of *tfdA* gene expression by indigenous *bacteria* in phenoxy acid amended agricultural soil. *The ISME* 2:677–687
- Bagi, Z., N. Ács , B. Bálint, L. Horváth, K. Dobó, K. R. Perei, G. Rákhely, K. L. Kovács (2007)** Biotechnological intensification of biogas production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:473–482
- Batstone, D.J., J. Keller, L.L. Blackall (2004)** The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water. Res.* 38:1390–1404.
- Bayer, E. A., E. Morag, R. Lamed (1994)** The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12:379–386
- Bayer, E. A., E. Morag, R. Lamed, S. Yaron, Y. Shoham (1998)** Cellulosome structure: four-pronged attack using biochemistry, molecular biology, crystallography and bioinformatics, p. 39–65. *In* M. Claeysens, W. Nerinckx, and K. Piens (ed.), *Carbohydrases from Trichoderma reesei and other microorganisms*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom
- Bayer, E.A., E. Setter, R. Lamed (1985)** Organisation and distribution of the Cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 163(2):552-559
- Beguin, P., M. Lemaire (1996)** The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 31:201–236
- Benndorf, D., G. U Balcke, H. Harm, M. von Bergen (2007)** Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *The ISME Journal* 1:224–234
- Beppu, T., M. Hattori, H. Ikeda, J. Ishikawa, K. Morimura, M. Shimada, K. Ueda, T. Watsuji, A. Yamashita (2004)** Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. *Oxford Journals* 32(16):4397-4944
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**, herausgegeben von David R. Boone, George M. Garrity, Richard W. Castenholz, Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley
- Biogashandbuch Bayern – Materialienband, Kapitel 1, Stand Juli 2007**, Bayer. Landesamt für Umwelt: Augsburg (zur Einsicht online unter www.lfu.bayern.de)
- Bisha, B., B.F. Brehm-Stecher (2010)** Combination of adhesive-tape-based sampling and fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Salmonella* on fresh produce. *J Vis Exp.* 18(44)

- Boon, N., J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete and, E.M. Top (2000)** Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3- chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. Appl. Environ. Microbiol. 66:2906–2913
- Boone, D.R., D.P. Chynoweth, R.A. Mah, P.H. Smith, A.C. Wilkie (1993)** Ecology and microbiology of biogasification. Biomass Bioenerg. 5:191–202
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254
- Bürgmann, H., F. Widmer, W. V. Sigler, J. Zeyer (2003)** mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of *nifH* Gene Expression by *Azotobacter vinelandii* in Soil. Appl. Environ. Microbiol. 69(4):1928–1935
- Burrell, P. C., C. O’Sullivan, H. Song, W. P. Clarke, L. L. Blackall (2004)** Identification, Detection, and Spatial Resolution of *Clostridium* Populations Responsible for Cellulose Degradation in a Methanogenic Landfill Leachate Bioreactor. Appl. Environ. Microbiol. 70(4):2414–2419
- Cammarano, P., A. Teichner, P. Londei (1986)** Intralinear Heterogeneity of Archaeobacterial Ribosomes, Evidence for 2 Physicochemically Distinct Ribosome Classes within the 3Rd Urkingdom. Sys. Appl. Microbiol. 7:137–146
- Caracciolo, A. B., P. Grenni, C. Cupo, S. Rossetti (2005)** In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. FEMS Microbiology Letters 253:55–58
- Cardenas, E., J.M. Tiedje (2008)** New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology 19:544–549
- Carvalho, A. L., F. M. V. Dias, J. A. M. Prates, T. Nagy, H. J. Gilbert, G. J. Davies, L. M. A. Ferreira, M. J. Romao, C. M. G. A. Fontes (2003)** Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin–dockerin complex. PNAS 100(24):13809-13814
- Cheun, H.I., S.-I. Makino, M. Watarai, J. Erdenebaatar, K. Kawamoto, I. Uchida (2003)** J.Appl. Microbiol. Vol 95(4): 728-733
- Chung, K. T. (1976)** Inhibitory Effects of H₂ on Growth of *Clostridium cellobioparum*. Appl. Environ. Microbiol. 31(3):342-348
- Cirne, D.G., A. Lehtomäki, L. Björnsson, L.L. Blackall (2007)** Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. J. of Appl. Microbiol. 103:516–527
- Cohen, A., A.M. Breure, J.G van Andel, A. van Deursen (1980)** Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose, 1. Maximum COD turnover rate during continuous operation. Wat. Res. 14:1439–1448
- Cole, J.R., B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, A.S. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, A.M. Bandela, E. Cardenas, G.M. Garrity, J.M. Tiedje (2007)** The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. Nucleic. Acids Res. 35:D169–D172
- Collins, M.D., P.A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, J.A. Farrow (1994)** The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:812–26
- Cysneiros, D., C. J. Banks, S. Heaven, K.-A. G. Karatzas (2012)** The role of phase separation and feed cycle length in leach beds coupled to methanogenic reactors for digestion of a solid substrate (Part 1): Optimisation of reactors’ performance. Bioresource Technology 103:56–63
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.H. Schleifer, M. Wagner (1999)** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst. Appl. Microbiol. 22(3):434-44
- Daims, H., M. Wagner (2007)** Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75:237–248
- Dehority, B.A. (1973)** Hemicellulose degradation by rumen bacteria. Fed. Proc. 32:1819-1824

- Dehority, B.A., H.W. Scott (1967)** Extent of cellulose and hemicelluloses digestion in various forages by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 50:1136-1141
- Dehority, B.A., P.A. Tirabasso (1998)** Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose. *J. Anim. Sci.* 76:2905-2911
- Demain, A. L., M. Newcomb, J. H. David Wu (2005)** Cellulase, Clostridia, and Ethanol. *Microbiology and molecular biology reviews* 69(1):124–154
- Desvaux, M. (2005)** The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology* 37:373–385
- Deublein, D., A. Steinhauser (2011)** Biogas from waste and renewable resources: An Introduction. Weinheim, Wiley-VCH
- Deutscher M.P. (2006)** Degradation of RNA in *bacteria*: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucl. Acids Res.* 34: 659–666
- Devillard, E., D. B. Goodheart, S. K. Karnati, E. A. Bayer, R. Lamed, J. Miron, K. E. Nelson, M. Morrison (2004)** *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *J. Bacteriol.* 186:136–145
- Ding, S. Y., W. S. Adney, T. B. Vinzant, S. R. Decker, J. O. Baker, S. R. Thomas, M. E. Himmel (2003)** Glycoside hydrolase gene cluster of *Acidothermus cellulolyticus*. In S. D. Mansfield and J. N. Saddler (ed.), p. 332–360. Applications of enzymes to lignocellulosics. ACS symposium series, vol. 855. American Chemical Society, Washington, DC
- Dohrmann, A. B., S. Baumert, L. Klingebiel, P. Weiland, C. C. Tebbe (2010)** Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 89(6):1991-2004
- Doi, R. H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru, S. O. Han (2003)** Cellulosomes from mesophilic *Bacteria*. *J. Bacteriol.* 185(20):5907
- Doi, R.H. (2008)** Cellulases of Mesophilic Microorganisms, Cellulosome and Noncellulosome Producers. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1125:267–279
- Drake H.L., K. Küsel, C. Matthies (2004)** Acetogenic prokaryotes, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York
- Drent, W. J., G. A. Lahpor, W. M. Wiegant, J. C. Gottschal (1991)** Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:455-462
- Dror, T. W., E. Morag, A. Rolider, E. A. Bayer, R. Lamed, Y. Shoham (2003)** Regulation of the cellulosomal *celS* (*cel48A*) gene of *Clostridium thermocellum* is growth rate dependent. *J. Bacteriol.* 185:3042–3048.
- Dürre, P. (2005)** Handbook on Clostridia. CRC Press Taylor and Francis group
- Engel, M., X. Dong, J.C. Munch, M. Schloter (2009)** Erfassung funktioneller hydrolytischer Netzwerke in Biogasanlagen mittels Mikroarraytechnologie, Abschlussbericht, Technische Universität München, Lehrstuhl für Bodenökologie
- Fierer, N., J. A. Jackson, R. Vilgalys, R. B. Jackson (2005)** Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(7):4117–4120
- FNR 2011** Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.; <http://www.nachwachsenderohstoffe.de/>
- Fontes, C M.G.A., H. J Gilbert (2010)** Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant CellWall Complex Carbohydrates. *Annu. Rev. Biochem.* 79:23.1–23.27
- Forney, L.J., W.T. Liu, J.B. Guckert, Y. Kumagai, E. Namkung, T. Nishihara, R.J. Larson (2001)** Structure of microbial communities in activated sludge: potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49:40–53

- Freier, D., C. P. Mothershed, J. Wiegel (1988)** Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20 Appl Microbiol Biotechnol 54(1):204-211
- Fujimori, M., K. Hisata, S. Nagata, N. Matsunaga, M. Komatsu, H. Shoji, H. Sato, Y. Yamashiro, T. Asahara, K. Nomoto, T. Shimizu (2010)** Efficacy of bacterial ribosomal RNA-targeted reverse transcription-quantitative PCR for detecting neonatal sepsis: a case control study. *BMC Pediatrics* 10:53
- Gans, J., M. Wolinsky, J. Dunbar (2005)** Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309:1387–1390
- Gerngross, U. T., M. P. M. Romainiec, N. S. Huskisson, A. L. Demain (1993)** Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal SL-protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol. Microbiol.* 8:325–334
- Gerwig, G. J., J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, E. Morag, R. Lamed, E. A. Bayer (1991)** Primary structure of O-linked carbohydrate chains in the cellulosome of different *Clostridium thermocellum* strains. *Eur. J. Biochem.* 196:115–122
- Gerwig, G. J., J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, E. Morag, R. Lamed, E. A. Bayer (1993)** The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. *J. Biol. Chem.* 268:26956–26960
- Gerwig, G. J., P. de Waard, J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, E. Morgenstern, R. Lamed, and E. A. Bayer (1989)** Novel O-linked carbohydrate chains in the cellulase complex (cellulosome) of *Clostridium thermocellum*. 3-O-Methyl-N-acetylglucosamine as a constituent of a glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 264:1027–1035
- Ghosh, S., J.R. Conrad, D.L. Klass (1975)** Anaerobic acidogenesis of sewage sludge. *J.WPCF.* 47:30–45
- Gold, N.D., V. J. Martin (2007)** Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J. Bacteriol.* 189:6787–95
- Gonzalez-Gil, G., P.N.L. Lens, A. Van Aelst, H. Van As, A.I. Versprille, G. Lettinga (2001)** Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3683–3692
- Gubry-Rangin, C., Graeme W. Nicol, I. James (2010)** Prosser archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74:566–574
- Guimaraes, B., H. Souchon, B. Lytle, J. David Wu, P. Alzari (2002)** The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase CelS, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J. Mol. Biol.* 320:587–596
- He, Y. L., Y. F. Ding, Y. G. Long (1991)** Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:306-309
- Hethener, P., A. Brauman, J. L. Garcia (1992)** *Clostridium termitidis* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes lujae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:52-58
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm, J. M. Tiedje (1988)** DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:703-711
- Hon-nami, K., M. P. Coughlan, H. Hon-nami, L. G. Ljungdahl (1986)** Separation and characterization of the complexes constituting the cellulolytic enzyme system of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 145:13-19
- <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/entwicklung-biogasanlagen.html>
- <http://srs.ebi.ac.uk>

- <http://www.microbial-ecology.net/probebase>
<http://www.alimetrics.com/en/index.php/dna-sequence-analysis>
<http://www.arb-silva.de>
<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>
<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
<http://www.scied.com>
<http://www.severnsaleslabequip.com>
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q06851>
<http://www.wzw.tum.de/mbiotec/cellmo.htm> Stand 30.12.12
- Hungate, R. E. (1944)** Studies on cellulose fermentation. I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. *J. Bacteriol.* 48:499-513
- Irwin, D. C., S. Zhang, D. B. Wilson (2000)** Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* 267:4988–4997
- Izquierdo, J. A., M. V. Sizova, L. R. Lynd (2010)** Diversity of Bacteria and Glycosyl Hydrolase Family 48 Genes in Cellulolytic Consortia Enriched from Thermophilic Biocompost. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(1):13545–3553
- Jaenicke, S., C. Ander, T. Bekel, R. Bisdorf, M. Dröge, K.-H. Gartemann, S. Jünemann, O. Kaiser, L. Krause, F. Tille, M. Zakrzewski (2011)** Comparative and Joint Analysis of Two Metagenomic Datasets from a Biogas Fermenter Obtained by 454-Pyrosequencing. *PLoS ONE* 6(1)
- Jarvis, A., A. Nordberg, B. Mathisen, B. H. Svensson (1995)** Stimulation of conversion rates and bacterial activity in a silage-fed two-phase biogas process by initiating liquid recirculation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68:317-327
- Ji, S., S. Wang, Y. Tan, X. Chen, W. H. Schwarz, F. Li (2012)** An untapped bacterial cellulolytic community enriched from coastal marine sediment under anaerobic and thermophilic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 335:39–46
- Johnson, E. A., A. Madia, A. L. Demain (1981)** Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 4 :1060-1062
- Johnson, E.A., M. Sakajoh, G. Halliwell (1982)** Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(5):1125-1132
- Jumas-Bilak, E., J. P. Carlier, H. Jean-Pierre, F. Mory, C. Teyssier, B. Gay, J. Campos, H. Marchandin (2007)** *Acidaminococcus intestini* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2314-2319
- Kakiuchi, M., A. Isui, K. Suzuki, T. Fujino, E. Fujino, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka, K. Ohmiya (1998)** Cloning and DNA sequencing of the genes encoding *Clostridium josui* scaffolding protein CipA and cellulase CelD and identification of their gene products as major components of the cellulosome. *J. Bacteriol.* 180:4303–4308
- Kalia, V.C., A. Kumar, S.R. Jain, A.P. Joshi (1992)** Biomethanation of plant materials. *Bioresour. Technol.* 41,209–212
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H. (2001)** Energie aus Biomasse; Grundlagen, Techniken und Verfahren. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Kato, S., S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii, A. Yokota, Y. Igarashi (2004a)** *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2043-2047
- Kato, S., S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii, Y. Igarashi (2004)** Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:133–142

- Kim, J.-J., H.N. Kim, R. Masui, S. Kuramitsu, J.-H. Seo, K. Kim, M.-H. Sung (2008)** Isolation of uncultivable anaerobic thermophiles of the family *Clostridiaceae* requiring growth -supporting factors. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:611-615
- Klocke, M., P. Mahnert, K. Mundt, K. Souidi, B. Linke (2007)** Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as monosubstrate. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:139–151
Kohji Morimura, Haruo Ikeda¹, Masahira Hattori^{1,3} and Teruhiko Beppu
- Kohring, S., J. Wiegel, F. Mayer (1990)** Subunit composition and glycosidic activities of the cellulase complex from *Clostridium thermocellum* JW 20. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3798–3804
- Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood, C. S. McSweeney (2003)** Opportunities to improve ber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 27:663-693
- Krause, D.O., R.J. Bunch, L.L. Conlan, P.M. Kennedy, W.J. Smith, R.I. Mackie, C.S. McSweeney (2001)** Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. *Microbiology* 147:1719-1729
- Krause, L., N.N. Diaz R.A. Edwards, K.H. Gartemann, H. Kromeke, H. Neuweger, A. Pühler, K.J. Runte, A. Schlüter, J. Stoye, R. Szczepanowski, A. Tauch, A. Goesmann (2008)** Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136:91–101
- Kröber, M., T. Bekel, N. N. Diaz, A. Goesmann, S. Jaenicke, L. Krause, D. Miller, K. J. Runte, P. Viehöver, A. Pühler, A. Schlüter (2009)** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology* 142:38–49
- Lamed, R., E. A. Bayer (1988)** The cellulosome concept: exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. p. 101–116. *In* J.-P. Aubert, P. Beguin, and J. Millet (ed.), *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. Academic Press, London, United Kingdom
- Lamed, R., E. Setter, E.A. Bayer (1983)** Characterization of a Cellulose-Binding Cellulase containing Complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 159(2):828-836
- Larsen, L., P. Nielsen, B. K. Ahring (1997)** *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch. Microbiol.* 168: 14-119
- Lee, Y. J., C. S. Romanek, G. L. Mills, R. C. Davis, W. B. Whitman, J. Wiegel, (2006)** *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2089-2093
- Lee, Z. M.-P., C. Bussema, T. M. Schmidt (2008)** rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nuc. Acids Res.* 37:D489–D493
- Leibovitz, E., P. Béguin (1996)** A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. *J. Bacteriol.* 178:3077–3084
- Levén, L., A. R. B. Eriksson, A. Schnürer (2007)** Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59(3):683–693
- Lim, J., S. Lee, S. Hwang (2008)** Use of quantitative real-time PCR to monitor population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in batch process. *J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol.* 35(11):1339-1344

- Liu, F., S. Wang, J. Zhang, J. Zhang, X. Yan, H. Zhou, G. Zhao, Z. Zhou (2009)** The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *J. Appl. Microbiol.* 106:952–966
- Liu, W.-T., O.-C. Chan, H.H.P. Fang (2002)** Characterisation of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Res.* 36:1767–1775
- Ljungdahl, L.G., B. Pettersson, K.-E. Eriksson, J. Wiegel (1983)** A yellow substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. *Current Microbiology*):195-200
- Ludwig, W., K.H. Schleifer (2000)** How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Syst. Appl. Microbiol.* 23:556–562
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, B.A. Yadhukumar, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.H. Schleifer (2004)** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363–1371
- Lv, W., Z. Yu (2012)** Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum* from a compost sample. *J. of Appl. Microbiol.* 114:1001-1007
- Lynd, L. R. (1989)** Production of ethanol from lignocellulosic material using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 38:1–52
- Lynd, L. R. (1990)** Large-scale fuel ethanol from lignocellulose. Potential, economics, and research priorities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25:695–719
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius (2002)** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506–577
- Machado, J.M., A. Araújo, J.R. Pinto, F.M. Gama (2009)** Studies on the interaction of the carbohydrate binding module 3 from the *Clostridium thermocellum* CipA scaffolding protein with cellulose and paper fibres. *Cellulose* 16(5):817-824
- Madden, R. H., M. J. Bryder, N. J. Poole (1982)** Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium papyrosolvans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:87-91
- Madden, R.H. (1983)** Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp., cellulolytic thermophile. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 33(4):837-840
- Madigan, M.T, J.M. Martinko (2008)** Brock Mikrobiologie. 11. Auflage, Pearson Studium
- Mata-Alvarez, J., S. Mace, P. Llabres (2000)** Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 74:3–16
- Matsuda, K., H. Tsuji, T. Asahara, Y. Kado, K. Nomoto (2007)** Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1):32-39
- Mc Bee, R.H. (1954)** The characteristics of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 67(4):505–506
- McClung, L. S. (1935)** Studies on anaerobic bacteria. IV. Taxonomy of cultures of a thermophilic species causing "swells" of canned food. *J. Bacteriol.* 29:189-203
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, M. Morrison (2001)** Invited review adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 84:1294-1309
- Mori, Y. (1990)** Isolation of mutants of *Clostridium thermocellum* with enhanced cellulase production. *Agric. Biol. Chem.* 54:825–826
- Mulè, G., A. Susca, A. Logrieco, G. Stea, A. Visconti (2006)** Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *Int J Food Microbiol.* 111 Suppl 1:28-34
- Ng, T. K., A. Ben-Bassat, J. G. Zeikus (1981)** Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1337–1343.

- Ng, T. K., J. G. Zeikus (1981)** Purification and characterization of an endoglucanase (1,4-beta-D-glucan glucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* 199:341–350.
- Noike, T., G. Endo, J.E. Chang, J.I. Yaguchi, J.I. Matsumoto (1985)** Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic-digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 27:1482–1489
- Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 16 Genome sequence of *Symbiobacterium*
- O’Sullivan, C., P.C. Burrell, W.P. Clarke, L.L. Blackall (2007)** A survey of the relative abundance of specific groups of cellulose degrading bacteria in anaerobic environments using fluorescence in situ hybridization. *J. of Appl. Microbiol.* 103:1332–1343
- Ohno, M., H. Shiratori, M. J. Park, Y. Saitoh, Y. Kumon, N. Yamashita, A. Hirata, H. Nishida, K. Ueda, T. Beppu (2000)** *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 50:1829-1832
- Ollivier, B. M., R. A. Mah, T. J. Ferguson, D. R. Boone, J. L. Garcia, R. Robinson (1985)** Emendation of the genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a proteolytic acetogen from a methanogenic enrichment. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 35:425-428
- Ozkan, M., S.G. Desai, Y. Zhang, D.M. Stevenson, J. Beane, E.A. White, M.L. Guerinot, L.R. Lynd (2001)** Characterization of 13 newly isolated strains of anaerobic, cellulolytic, thermophilic bacteria. *J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol.* 27:275–280
- Patel, G. B., A. W. Khan, B. J. Agnew, J. R. Colvin (1980)** Isolation and characterization of an anaerobic cellulolytic microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:179-185
- Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, C. Gaudin (1984)** *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 55-159
- Prozessmodell Biogas. Nr. III (2010)** Biogasforum Bayern; http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf
- Prozessmodell Biogas. Nr. IV (2010)** Biogasforum Bayern
- Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B.M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, F.O. Glockner (2007)** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35:7188–7196
- Rainey, F. A., N. L. Ward, H. W. Morgan, R. Toalster, E. Stackebrandt (1993)** Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* 175:4772-4779
- Rainey, F. A., and E. Stackebrandt (1993)** 16S rRNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:125-128
- Raman, B., C. Pan, G. B. Hurst, M. Jr. Rodriguez, C. K. McKeown (2009)** Impact of pretreated switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis. *PLoS ONE* 4(4): e5271
- Rani, S. D., S. Thirumale, K. Nand (2004)** Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 20:629–632
- Rastogi, G., G. L. Muppidi, R.N. Gurram, A. Adhikari, K. M. Bischoff, S. R. Hughes, W. A. Apel, S. S. Bang, D. J. Dixon, R. K. Sani (2009)** Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:585–598
- Reineke, W., M. Schlömann (2007)** *Umweltmikrobiologie*. Elsevier, München
- Ren, Z., T.E. Ward, B.E. Logan, J.M. Regan (2007)** Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *J. of Appl. Microbiol.* 103:2258–2266
- Saha, B.C. (2003)** Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:279–291

- Sánchez, E. R. Borja, P. Weiland, L. Travieso A. E. Martín (2000)** Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioproc. Engin.* 22(3):247-252
- Schiraldi, C., M. De Rosa (2002)** The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* 20:515–521
- Schlüter, A., T. Bekel, N. N. Diaz, M. Dondrup, R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann, I. Krahn, L. Krause, H. Krömeke, O. Kruse, J. H. Mussnug, H. Neuweiger, K. Niehaus, A. Pühler, K. J. Runte, R. Szczepanowski, A. Tauch, A. Tilker, P. Viehöver, A. Goesmann (2008)** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by them454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136:77–90
- Schmack, D., M. Reuter (2010).** Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität der Biogasprozesses. *Gülzower Fachgespräche Band 35*
- Sessitsch, A., S. Gyamfi, N. Stralis-Pavese, A. Weilharter, U. Pfeifer (2002)** RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *J. of Microbiol.Meth.* 51:171–179
- Shiratori, H., K. Sasaya, H. Ohiwa, H. Ikeno, S. Ayame, N. Kataoka, A. Miya, T. Beppu, K. Ueda (2009)** *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 59:1764–1770
- Shoseyov, O., R.A.J. Warren (1997)** Cellulose binding domains - a novel fusion technology for efficient, low cost purification and immobilization of recombinant proteins. *Innovations*, No. 7
- Shuman, S. (1994)** Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269:32678-32684
- Sizova, M. V., J.A. Izquierdo, N.S. Panikov, L. R. Lynd (2011)** Thermophilic anaerobic bacteria from biocompost able to degrade cellulose and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(7):2282-2291
- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca-Hagler, A. Wolters, J. D. van Elsas (1993)** Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74:78–85.
- Smith, C.J., A.M. Osborn (2009)** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 67:6-20
- Smith, M. M., M. E. McCully (1978)** Enhancing aniline blue fluorescent staining of cell wall structures. *Stain Technol.* 53:79-85
- Soh, A. L. A., H. Ralambotiana, B. Ollivier, G. Prensier, E. Tine, J. L. Garcia (1991)** *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal. *Syst. Appl. Microbiol.* 14:135-139
- Stams, A. J. M. 1994.** Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie von Leeuwenhoek* 66:271-294.
- Steenbakkers, P. J. M., A. Frelove, B. van Cranenbroek, B. M. C. Sweegers, H. R. Harhangi, G. D. Vogels, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert, H. J. M. Op den Camp (2002)** The major component of the cellulosomes of the anaerobic fungi from the genus *Piromyces* is a family 48 glycosyl hydrolase. *DNA Sequence* 13:313–320.
- Sukhumavasi, J. K. Ohmiya, S. Shimizu, K. Ueno (1988)** *Clostridium josui* sp. nov., a cellulolytic, moderate thermophilic species from Thai compost. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 38:179-182
- Tachaapaikoon, C., A. Kosugi, P. Pason, R. Waeonukul, K. Ratanakhanokchai, K.L. Kyu, T. Arai, Y. Murata, Y. Mori (2012)** Isolation and characterization of a new cellulosomeproducing *Clostridium thermocellum* strain. *Biodegradation* 23(1):57-68

- Tang, Y., T. Shigematsu, S. Ikbal Morimura, K.Kida (2004)** The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water. Res.* 38:2537–2550
- Tebbe, C.C., W. Vahjen (1993)** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8):2657-2665
- Tomme, P., R. A. Warren, N. R. Gilkes (1995)** Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37:1–81
- Torsvik, V., J. Goksoyr, F.L. Daae (1990)** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782–787
- Tsai, Y.-L., B. H. Olson (1992)** Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2292–2295
- Tsavkelova, E. A., A. I. Netrusov (2012)** Biogas production from cellulose-containing substrates: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48(5):421-433
- Turner, P., G. Mamo, E.N. Karlsson (2007)** Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6:9
- Verrier, D., F. Roy, G. Albagnac (1987)** Two-phase methanization of solid vegetable wastes. *Biol. Wastes* 22:163–177
- Viljoen, J.A., E.B. Fred, W.H. Peterson (1926)** The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *J. of Agric. Science Cambridge* 16:1-17
- Wawer, C., M. S. M. Jetten, G. Muyzer (1997)** Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples. *Appl. and Environ. Microbiol.* 63(11):4360–4369
- Weiland, P. (1993)** One- and two-step anaerobic digestion of solid agroindustrial residues. *Water Sci. Technol.* 27:145–151
- Weimer, P. J., J. G. Zeikus (1977)** Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:289–297
- Weiss, A., V. Jérôme, R. Freitag, H. K. Mayer (2008)** Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:163–173
- Wiegel, J., R. Tanner, F.A. Rainey (2005)** An introduction to the family Clostridiaceae. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd ed. Springer, New York
- Winter, J.U., R.S. Wolfe (1980)** Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Arch. Microbiol.* 124:73–39
- Woese, C. R., L. J. Magrum, R. Gupta, R. B. Siegel, D. A. Stahl, J. Kop; N. Crawford, J. Brosius, R. Gutell, J. J. Hogan, H. F. Noller (1980)** Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucl. Acid. Res.* 8:2275–2293
- Xu, Q., W. Gao, S.-Y. Ding, R. Kenig, Y. Shoham, E.A. Bayer, R. Lamed (2003)** The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J. Bacteriol.* 185:4548–4557
- Zábranská, J., J. Stepova, R. Wachtl, P. Jenicek, M. Dohanyos (2000)** The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters at different loading rates. *Water Sci. Technol.* 42(9):49–56
- Zhang, X., S. Wu, K. Li, J. Shuai, Q. Dong, W. Fang (2012)** Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for identification of *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Int. J. Food Microbiol.* 157(2):309-13

Literatur

- Zhilina, T. N., V. V. Kevbrin, T. P. Tourova, A. M. Lysenko, N. A. Kostrikina, G. A. Zavarzin (2005)** *Clostridium alkalicellum* sp. nov., an obligately alkaliphilic cellulolytic bacterium from a soda lake in the Baikal Region. *Microbiology (Mikrobiologiya)* 74:557-566
- Zverlov, V. V., J. Kellermann, W. H. Schwarz (2005a)** Functional subgenomes of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major components and detection of three new enzymes. *Proteomics* 05:3646-3653
- Zverlov, V. V., N. Schantz, W. H. Schwarz (2005)** A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiol. Lett.* 249:353-358
- Zverlov, V. V., W. H. Schwarz (2008)** Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental systems – *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *New York Academy of Sciences* 1125:298-307
- Zverlov, V. V., W. Hiegl, D. E. Köck, J. Kellermann, T. Köllmeier, W.H. Schwarz (2010)** Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Eng. Life Sci.* 10(6):528–536

7 Anhang

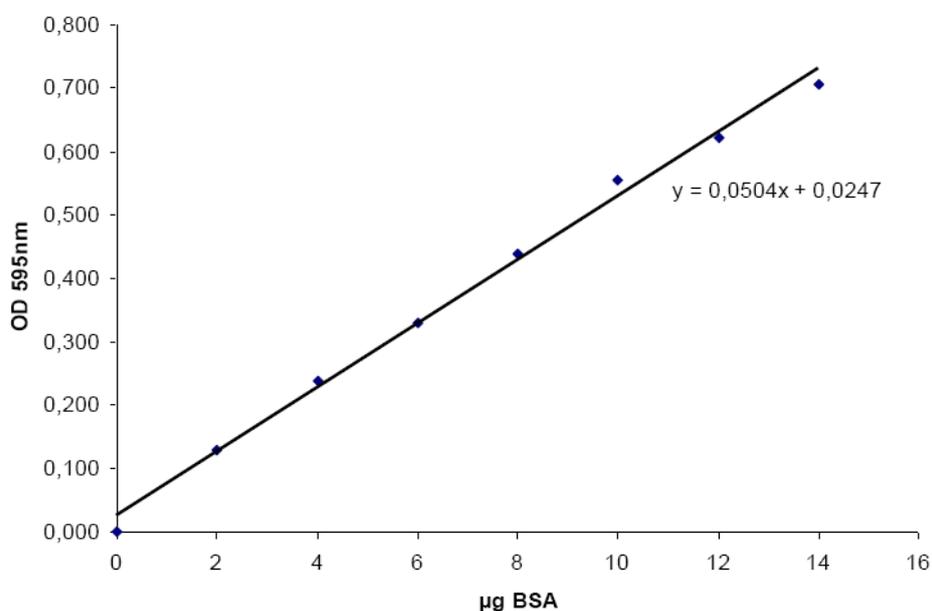


Abbildung 59: BSA-Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration

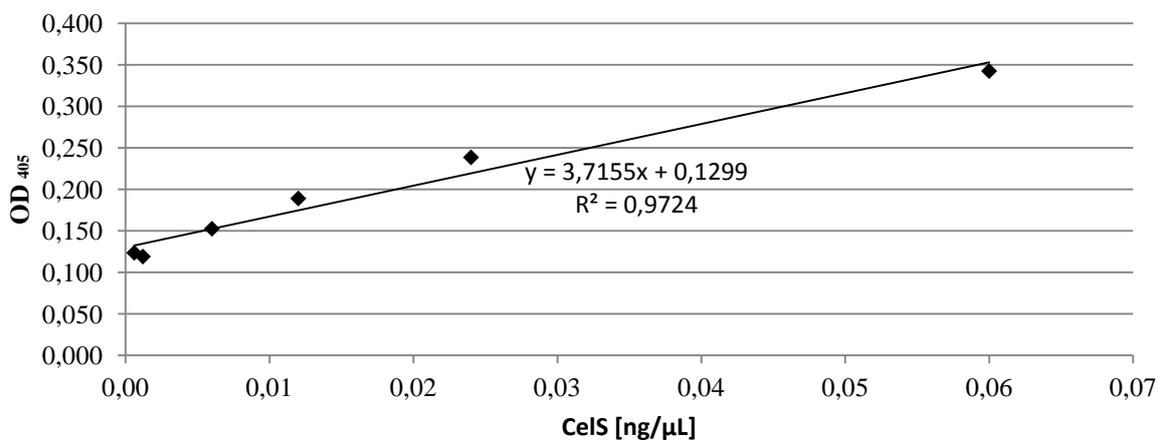


Abbildung 60: CelS-Eichgerade zur Bestimmung der CelS-Konzentration; als Standard diente *C. thermocellum*-Kulturüberstand; die CelS-Konzentration wurde unter der Annahme, dass CelS 1,2 % des Gesamtproteins ist (Gold und Martin 2007), berechnet

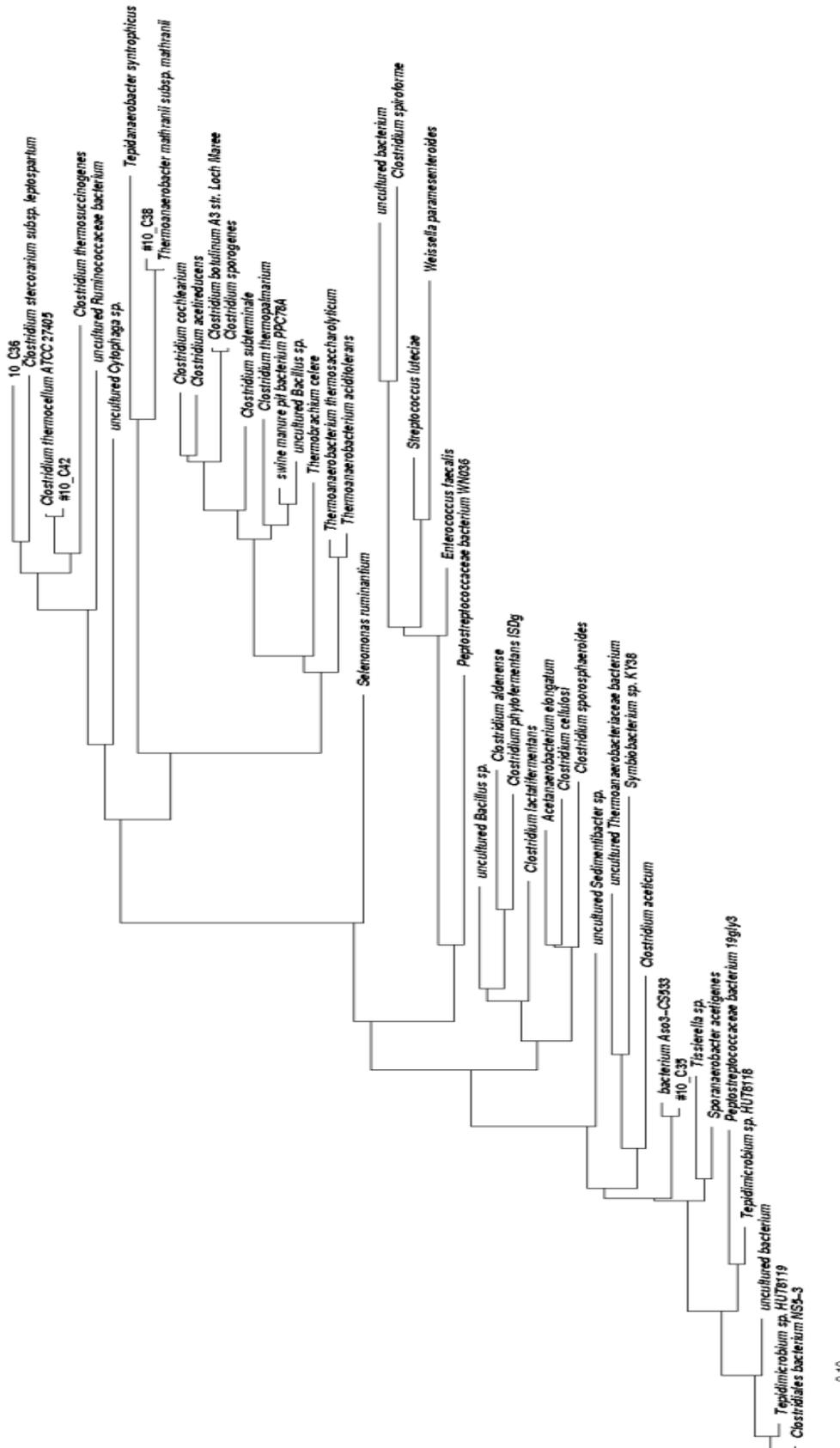


Abbildung 61: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen aus Anreicherung #10, erstellt mit der Software ARB unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode; Dendrogramm enthält jeweils eine repräsentative Sequenz der OTUs

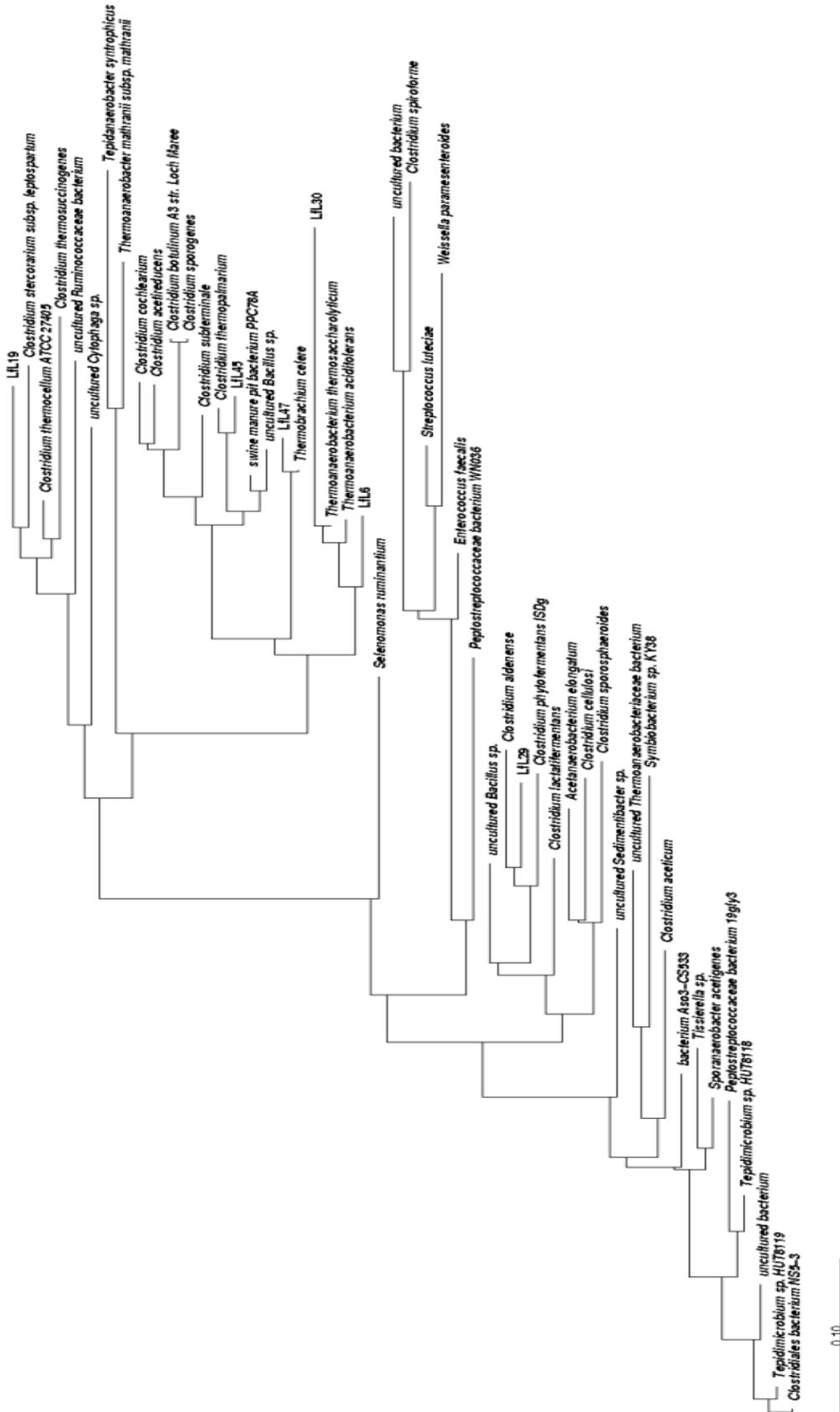


Abbildung 62: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen (ca. 900 bp) aus Anreicherung LfL; erstellt mit der Software ARB unter Verwendung Maximum-Likelihood-Methode; Dendrogramm enthält jeweils eine repräsentative Sequenz der OTUs

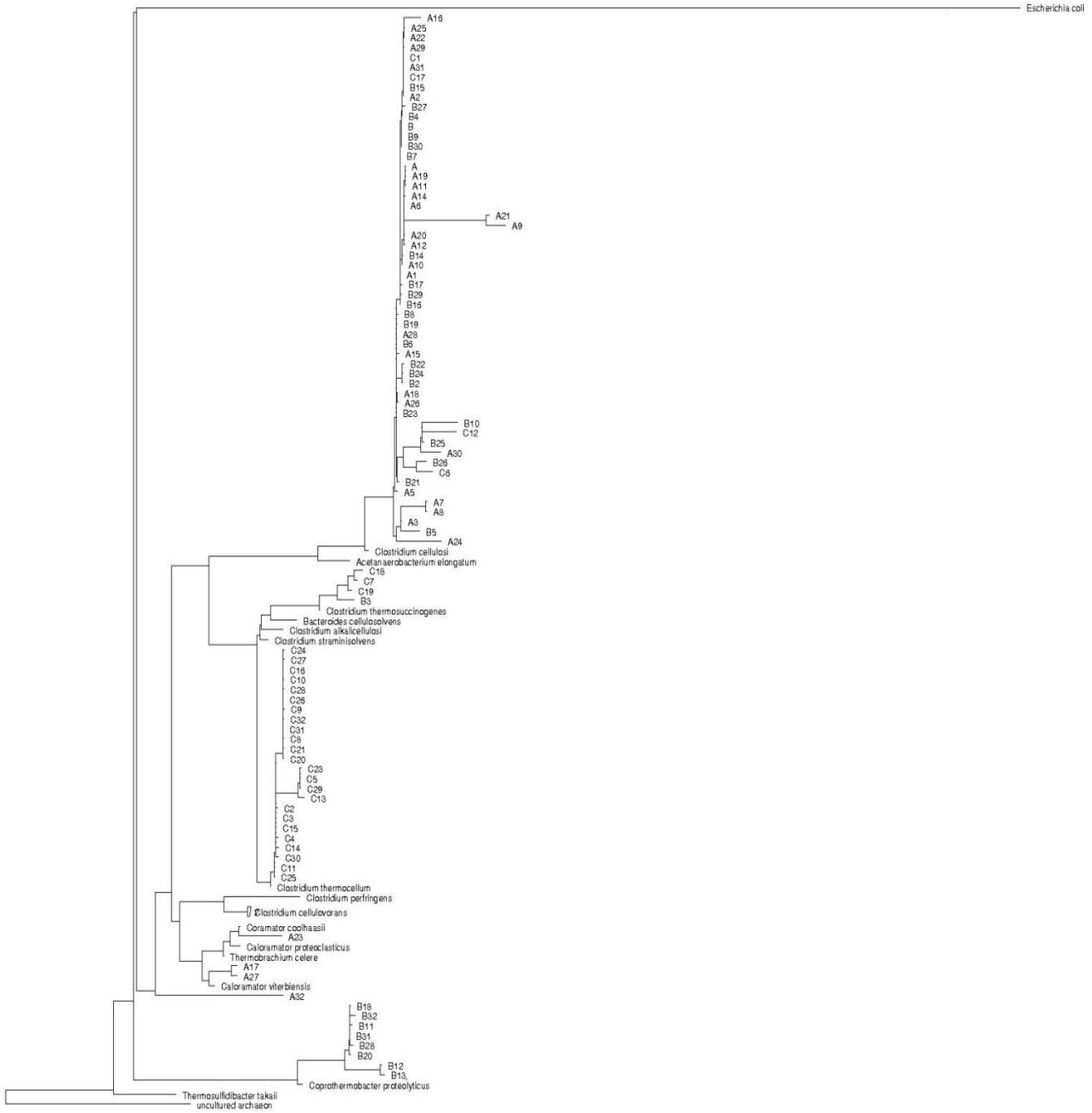


Abbildung 63: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Sequenzen der pH 5,6-Anreicherungen A, B und C; erstellt mit der Software ARB unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode

Anhang

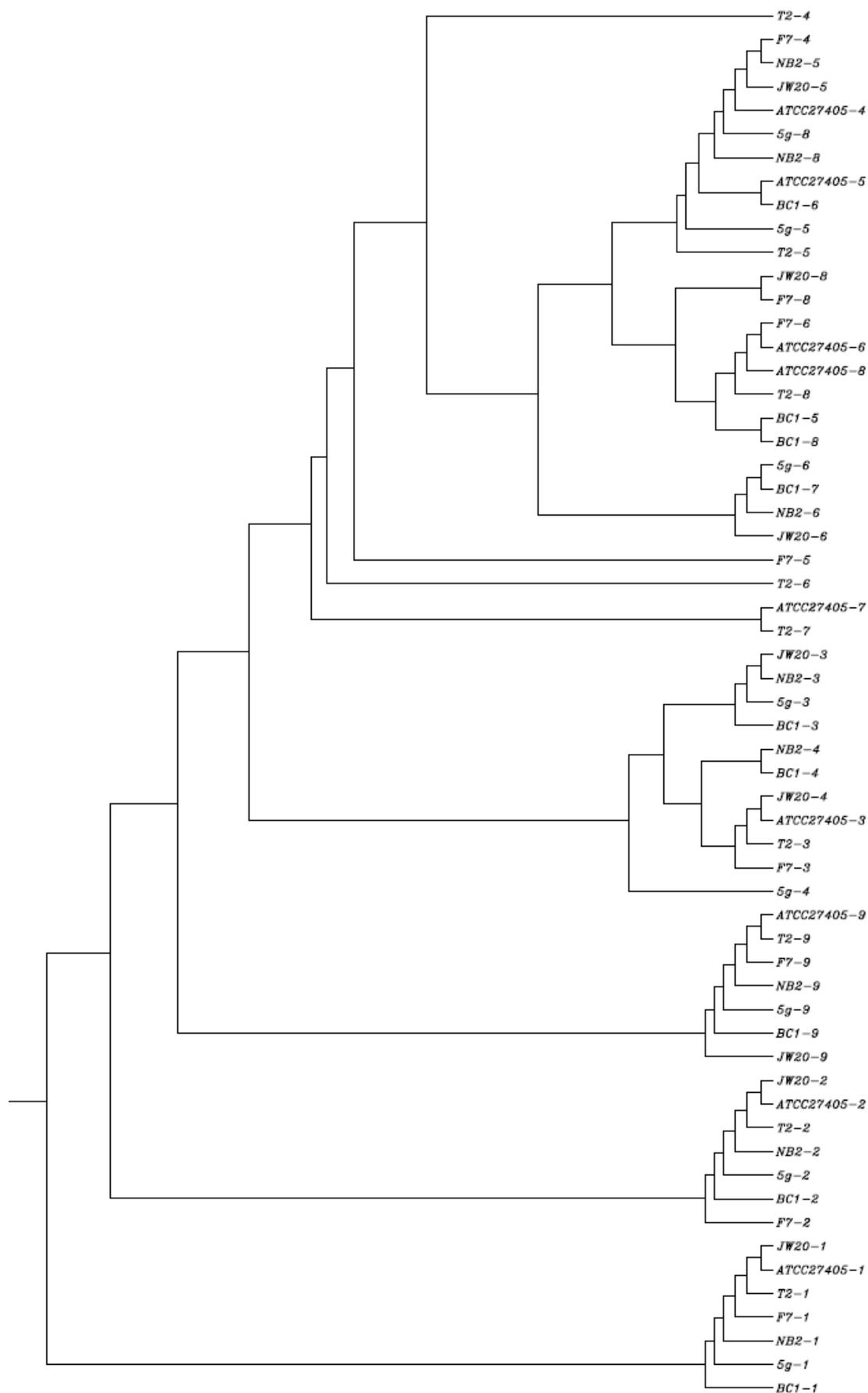


Abbildung 64: Dendrogramm der Aminosäuresequenzen der Cohesine von sieben *C. thermocellum*-Stämmen; ClustalW-Alignment, Dendrogramm erstellt mit der UPGMA-Methode

16S rDNA Sequenzen

>5g

TTACCCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTACCTCATAACGGGGGATAACA
 CAGGGAACCTGTGCTAATACCGCATAACATAACGGGGCGGCATCGTCCTGTTATCAAAGGAGAAAATCCGGTA
 TGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAAC
 GAGAGGTTGGTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCTGAAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGA
 TTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAGGGCGCGTAGGGCGGGATGCAAGTCAGATGTGA
 AATTCGGGGCTTAACCCCGGCGTGCATCTGAAACTGTATCTTGTAGTGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCC
 TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTCTGGACAGTAAGTGA
 CGCTGAGGCGGAAAGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATA
 CTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACAATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTGCAAGCAA
 CGGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGA
 GACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
 GTCGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTTAGCGAGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGG
 ACGAGCTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACAGTACTACAATGGTGTCTACAAAGGGAAGCG
 ATACCGCAGGTGAAAGCTGAAATCCCAAAAAGCAGTCCCAAGTTCGGATTGCAAGGTCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAG
 TCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA
 CACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCGCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGA
 TGATTGGGG

>NB2

TGCAGTCGAGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTACCTCATAACGGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAACATAACGGGGCGGCAT
 CGTCCTGTTATCAAAGGAGAAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGAGGTTGGTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGAA
 GAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAGGGCGC
 GTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAACCCCGGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTCTT
 GAGTGTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAAGTGG
 CGAAGGCGGCTTCTGGACAGTAACTGACGTACGCTGAGGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCCACGCTGAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACA
 ATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCA
 GTGGAGTATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAG
 AGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTTAGCGAGACT
 GCCCGGCAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGCT
 ACTACAATGGTGTCTACAAAGGGAAGCGATACCGCGAGGTGGAGCAAATCCCAAAAAGCAGTCCCGCTGG
 ATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCTGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATAC
 GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCGC
 AAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCG

>T2

AGTCGAGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGT
 AACCTACCTCATAACGGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGCATCGT
 CCTGTTATCAAAGGAGAAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGAGGTTGGTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGAAGAA
 GGCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAGGGCGCGTA
 GGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAACCCCGGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTTGTAG
 TGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAAGTGGCGA
 AGGCGGCTTCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGG
 TAGTCCACCGCTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACAATA
 AGTATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGTG
 GAGTATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAGAGA
 TAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTTAGCGAGACTGCCG
 GCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTA
 CAATGGTGTCTACAAAGGGAAGCGATACCGCGAGGTGGAGCAAATCCCAAAAAGCAGTCCCGATTGCGATTG
 CAGGCTGAAACTCGCCTGCTGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTT
 CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCGCAAGG
 AAGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCG

>BC1

Anhang

TGCAGTCGAGCGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGTAACCTACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGCAT
CGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCAACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAAGTGTGAGGTTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACAGCGCCAGACT
CCTACGGGAGCGACGAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCTGACGCAGCAACGCCCGTGAAGGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGC
GTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATCCGGGGCTTAACCCCGGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTCTT
GAGTGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGGCTTTCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGAAGTCCACCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACA
ATAAGTATCCCACTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCA
GTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTTAG
AGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGACT
GCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGT
ACTACAATGGCTGCTACAAAGGGAAGCGATACCGCGAGGTGGAGCAAAATCCCAAAAGCAGTCCCAGTTCGG
ATTGACGGTGAACCTCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGTCAACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCGT
AAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGA

>2g

TTACCGGAAGTATATCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTACCTCATAACAGGGGGATAACA
CAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGCATCGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTA
TGAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAAGT
GAGAGGTTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCGCAATGGGGGAAACCCCTGACGCAGCAACGCCCGTGAAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGA
TTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATA
CGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGCGTAGGGCGGGATGCAAGTCAGATGTGA
AATTCGGGGCTTAAACCCCGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTCTTGTAGTGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACAGTAACTGA
CGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATA
CTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACAATAAGTATCCCACTGGGAGTACGGCC
GCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCAAGCAA
CGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGA
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GTCGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGG
ACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGCTACAAAGGGAAGCG
ATACCGCGAGGTGGAGCAAATCCCAAAAGCAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGAAACTCGCTGCATGAAG
TCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACCCACCGCCGTC
CACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCCCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTG

>#12

TGCAAGTCGAGCGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGC
ATCGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAAGTGTGAGGTTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCCTGACGCAGCAACGCCCGGTGAAG
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCAC
GGTAACCTAGTGCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGG
CGCGTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAAACCCCGGCGCTGCATCTGAAACTGTATCT
CTTGAGTGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACA
CAATAAGTATCCCACTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAG
CAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCT
AGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGA
CTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACAC
GTACTACAATGGCTGCTACAAAGGGAAGCGATACCGCGAGGTGGAGCAAATCCCAAAAGCAGTCCCAGTTC
GGATTGCAGGCTGAAACTCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGTCAACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCC
GCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGA

>#17

AGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCT
ACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGCATCGTCTGT
TATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATCGGTAGCCGAAGTGTGAGGTTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCCTGACGCAGCAACGCCCGGTGAAGGAAGAAGGCCT

Anhang

TCGGGTTGTAAACTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGCGTAGGCGG
GGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGGCTTAAACCCCGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTCTTGAGTGCTGG
AGAGGAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGGAGCCGG
CTTTCTGGACAGTAACCTGACGCTGAGGCGCAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCA
CGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACAATAAGTATCC
CACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGTATG
TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAGAGATAGGGCT
TCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGCGACAA
GTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGTCTGGGCTACACAGTACTACAATGGC
TGCTACAAAGGGAAGCGATACCAGGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAGCAGTCCAGTTCCGATTCCGAGGTG
AAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCCGCGTCACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCGCAAGGAGGGCGC
TGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGG

>#18

CATGCAGTCGAGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGTAACCTACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGC
ATCGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGAGGTTGGTCCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAG
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGG
CGCGTAGGGCGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAAACCCGCGCTGCATCTGAAACTGTATCT
CTTGAGTGTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTCTGGACAGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACAA
CAATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCT
AGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGA
CTGCCGGCGCAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGTCTGGGCTACACAC
GTACTCAATGGCTGTACAAAGGGAAGCGATACCAGGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAGCAGTCCAGTTCC
GGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTCACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCC
GCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGG

>Lfl1

TGCAGTCGAGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGTAACCTACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGCAT
CGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACCGC
TCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGAGGTTGGTCCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGC
GTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAAACCCGCGCTGCATCTGAAACTGTATCTCTT
GAGTGTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGCCGCTTCTTGACAGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGGATACTAGGTGAGGAAATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACA
ATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCA
GTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACAGCTCTAG
AGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGACT
GCCGGCGCAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTATGTCTGGGCTACACACGT
ACTACAATGGCTGTACAAAGGGAAGCGATACCAGGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAGCAGTCCAGTTCCG
ATTGACGGCTGAAACTCGCCTGCTGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTCACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCCG
AAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGG

>Lfl2

TGCAAGTCGAGCGGGGATATACGGAAGGTTTACCGGAAGTATATCCTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTACCTCATAACAGGGGGATAACACAGGGAACCTGTGCTAATACCGCATAATATAACGGGGCGGC
ATCGTCTGTTATCAAAGGAGAAATCCGGTATGAGATGGGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACCG
GCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGAGGTTGGTCCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAG
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTGATTGGGGACGAAGGAAGTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGG
CGCGTAGGGCGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAAACCCGCGCTGCATCTGAAACTGTATCT
CTTGAGTGTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT

Anhang

GGCGAAGCGGGCTTCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACA
CAATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAG
CAGTGGAGTATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTTGACAGCTCT
AGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTTAGTTGCCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAGCGAGA
CTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACAC
GTACTACAATGGCTGCTACAAAGGAAGCGATACCGCGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAGCAGTCCCAGTTC
GGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTGACGATACTGCCGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACC
GCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGG

celR-Sequenzen

>5g

CCCGACAACATCCGTAACAACCTGGCGCGGTGATTCATGTCTCGGAGACGGAAGCGATGTAGGTCTTGACCTCA
CAGGAGGTTGGTTTGACGCCGGTGACCATGTAAAATTCAATCTGCCTATGGCTTACACAGCCACTATGCTTGCA
TGGGCTGTGTATGAGTACAAGGACGCGTTACAAAAAGCGGTCAATTGGGCTATTTAATGGATCAGATTAAT
GGGCATCGGACTACTTCATAAGATGCCATCCCGAAAAATATGTATATTATCAAGTGGGTAACCGTGACAT
GGACACAGATAGTGGGTGCCGGCAGAATGTATAGATGTTCAAGCACCAAGACCGTCTTACAAAGTAGACTCG
TCAAATCCCGGTTCCACAGTTACTGCGGTACAGCTGCCGCACTTGTGCAACTGCCCTGGTATTCAAAGACAC
TGATCCGGCATATGCCGCTCTGTGCATACGTCATGCAAAAAGAACTCTTTGATTTTGTGAAACCACTATGAGTG
ATAAAGGATATACCGCAGCATTGAATTTCTACACATCTCACAGTGGATGGTATGACGAGCTTTCCTGGGCAGGT
GCATGGATTTATCTTGACAGCGGTGACGAAACTTATCTTGAAAAAGCTGAAAAGTATGTGGATAAATGGCCAA
TCGAAAGCCAGACAACCTTACATTGCTTATTCATGGGGTCACTGCTGGGACGACGTTCACTACGGAGCAGCACTT
CTTTTGGCAAAGATTACAAAATAAATCCTTATACAAAAGGAGCGATAGAAAAGACACCTGGACTATTGGACAGTTG
GATTTAATGGTCAGAGAGTCAGATATACACCAAAGGTTCTTGCTCACCTCACTGACTGGGGTGTATTAAGACA
TGCCACTACTACTGCATTCTTGCATGTGTTTATTCCGACTGGTTCAGAATGTCCAAGGGAAAAAGCCAATATTT
ACATAGATTTTGCCAAGAAACAGGCTGACTATGCCTTAGGCAGCAGCGGCAGAAGTTATGTAGTCGGATTTGG
TGTAATCCTCCGCAGCATCCGCACCACAGAACTGCCACAGCTCATGGTGTGACAGTCAAAAAGTTCTCTGAA
TACCACAGACAGTTCCTTACGGAGCACTCGTAGGCGGACCTGATGCCAGCGATGCTTATGTTGATGATATAGG
AAACTATGTAACAAATGAGGTTGCCTGCGACTACAATGCCGGTTTTGTAGGATTGCTCGCCAAGATGTATGAA
AAATATGGCGGAAACCCCATACCAAACCTTCATGGCTATAGAAGAAAAAACAATGAAGAAATTTATGTTGAA
GCTACCGCAATTCAAAATACCGGTGTCGAATTTGAAAACATACCTTTACAATAAATCCGGATGGCCGGCAAGAG
TTTGGCACAAGCTTCTTCCAGATTTTACAGTGCAGCACCAACTGCAAAAATTTCAAACCAATACTTTATGACGCATCCAA
AAACATATATTATTGCGAAAATCGATCTCTCCGGTACCAAGATATTCCCGGAAGCAACTCAGACCACAGAAA
GAAACCCAATTTAGAATACAGCCTCCTGCAGGCGCACCTTGGGACAACACCAACGACTTCTCCTATCAGGGAA
TCAAGAAAAACGGTGAAGTTGTAAGAAATGCCTGTTTATGAAGACGGAGTTTTCATATTCCGGTGTAGAACC
CAATGGTACCGGTCTGCAACACCAACGCCGAAACCGTCCGTAATCCTTCACCTTCACCTACGCCAACATCGG
ATATTTTACGGTGACATCAATCTGGACGGAAAAATTAACCTTTCAGATGTTACTGTTAAAAAGATATATT
GTGAAGTCCATAGTGTTCCTTCCAAACCGCTGATCCGGAACGGAGCTTAATAGCATCAGATGTAAACGGAGACG
GAAGGGTAAACTCTACAGACTATTCATACCTTAAACGTTATGTCTTGAAAAATCATACCAACCATACCCGGAAT
TCA

>NB2

ATGTCCGGAAAGCTTCCCGACAACATCCGTAACAACCTGGCGCGGTGATTCATGTCTCGGAGACGGAAGCGATG
TAGGTCTTGACCTCACAGGAGGTTGGTTGACGCCGGTGACCATGTAAAATTCAATCTGCCTATGGCTTACACA
GCCACTATGCTTGCATGGGCTGTGTATGAGTACAAGGACGCGTTACAAAAAGCGGTCAATTGGGCTATTTAA
TGGATCAGATTAATGGGCATCGGACTACTTCATAAGATGATACATCCCGAAAAATATGTATATTATCAAGTG
GGTAACGGTGACATGGACCACAGATGGTGGGTGCCGGCAGAATGTATAGATGTTCAAGCACCAAGACCGTCTT
ACAAAGTAGATCTGTCAAATCCCGGTTCCACAGTTACTGCGGGTACAGCTGCCGCACTTGTGCAACTGCCTTG
GTATTCAAAGACACTGATCCGGCATATGCCGCTCTGTGCATACGTCATGCAAAAAGAACTCTTTGATTTTGTGTA
AACCCTATGAGTGATAAAGGATATACCGCAGCATTGAATTTCTACACATCTCACAGTGGATGGTATGACGAG
CTTTCCTGGGCAGGTGCATGGATTTATCTTGACAGCGGTGACGAACTTATCTTGAAAAAGCTGAAAAGTATGT
GGATAAATGGCCAATCGAAAGCCAGACAACCTTACATTTGCTTATTCATGGGGTCACTGCTGGGACGACGTTTAC
TACGGAGCAGCACTTCTTTTGGCAAAGATTACAATAAATCCTTATACAAAAGAGCGATAGAAAAGACACCTGG
ACTATTGGACAGTTGGATTTAATGGTTCAGAGAGTCAGATATACACCAAAGGGTCTTGTACCTCACTGACTGG
GGTGTATTAAGACATGCCACTACTACTGCATTTCTTGCATGTGTTTATTCCGACTGGTTCAGAATGTCCAAGGGA
AAAAGCCAATATTTACATAGATTTTGCCAAGAAACAGGCTGACTATGCCTTAGGCAGCAGCGGCAGAAGTTAT
GTAGTCGGATTTGGTGTAAATCCTCCGCAGCATCCGCACCACAGAACTGCCACAGCTCATGGTGTGACAGTC
AAAAAGTTCTGAATACCACAGACACGTTCTTTACGGAGCACTCGTAGGCGGACCTGATGCCAGCGATGCTTA
TGTGATGATATAGAAAATATGTAACAAATGAGGTTGCCTGCGACTACAATGCCGGTTTTGTAGGATTTGCTCG
CCAAGATGTATGAAAATATGGCGGAAACCCCATACCAAACCTTACATGGCTATAGAAGAAAAAACAATGAAG
AAATTTATGTTGAAGTACCGCCAATTCAAAATAACGGTGTGCAATTTGAAAACATACCTTTACAATAAATCCGG
ATGGCCGGCAAGAGTTTGGCACAAGCTTCTTCCAGATATTTTACAGTGCAGCACCAACTGCAAAAATTTCAAACCAATACTT
ACAATCCTAATGATATAACTGTTTCTATAATTTACAGTGCAGCACCAACTGCAAAAATTTCAAACCAATACTT
TATGACGCATCCAAAACATATATTATTGCGAAATCGATCTCTCCGGTACCAAGATATTCCCGGAAGCAACTC

Anhang

AGACCACCAGAAAGAAACCCAATTTAGAATACAGCCTCCTGCAGGCGCACCTTGGGACAACACCAACGACTTC
TCCTATCAGGGAATCAAGAAAAACGGTGAAGTTGTAAAAGAAATGCCTGTTTATGAAGACGGAGTTCTCATAT
TCGGTGTAGAACCAATGGTACCGGTCCTGCAACACCAACGCCGAAACCGTCCGTAAATCCTTCACCTTCACCT
ACGGCAACATCGGATATCTTTACGGTGACATCAATCTGGACGGAAAAATTAACCTTTCAGATGTTACACTGTT
AAAAAGATATATTGTGAAGTCCATAGATGTTTTCCCAACCGCTGATCCGGAACGGAGCTTAATAGCATCAGAT
GTAAACGGAGACGGAAGGGTAAACTCTACAGACTATTCATACCTTAAACGTTATGTCTTGAAAATCATAACAA
CCATACCCGAA

>T2

ATGTCCGGAAAGCTTCCCAGACAACATCCGTAACAACCTGGCGCGGTGATTTCATGTCTCGGAGACGGAAGCGATG
TAGGCTTTGACCTCACAGGAGGTTGGTTTGACGCCGGTGACCATGTAAAATTCATCTGCCTATGGCTTACACA
GCCACTATGCTTGCATGGGCTGTGTATGAGTACAAGGACGCGTTACAAAAAAGCGGTCAATTGGGCTATTTAA
TGGATCAGATTAATGGGCATCGGACTACTTCATAAGATGCCATCCCGAAAAATATGTATATTATTATCAAGTG
GGTAACGGTGACATGGACCACAGATGGTGGGTGCCGGCAGAATGTATAGATGTTACAGCACCAAGACCGTCTT
ACAAAGTAGATCTGTCAAATCCCGGTTCCACAGTTACTGCGGGTACAGCTGCCGCACCTTGCTGCAACTGCCTTG
GTATTCAAAGACACTGATCCGGCATATGCCGCTCTGTGCATACGTCATGCAAAAGAACTCTTTGATTTTGTCTGA
AACCCTATGAGTGATAAAGGATATACCGCAGCATTGAATTTCTACACATCTCACAGTGGATGGTATGACGAG
CTTTCCTGGGCAGGTGCATGGATTTATCTTGCAGACGGTGACGAACTTATCTTGAAAAAGCTGAAAAGTATGT
GGATAAATGGCCAATCGAAAGCCAGACAACCTTACATTGCTTATTCATGGGGTCACTGCTGGGACGACGTTTAC
TACGGAGCAGCACTTCTTTGGCAAAGATTACAAACAAATCCTTATACAAAAGAAGCGATAGAAAAGACACCTGG
ACTATTGGACAGTTGGATTTAATGGTCAGAGAGTCAGATATACACCAAAGGGTCTTGCTCACCTCACTGACTGG
GGTGTATTAAGACATGCCACTACTACTGCATTCTTGCATGTGTTTATCCGACTGGTTCAGAATGTCCAAGGGA
AAAAGCCAATATTTACATAGATTTTGCCAAGAAACAGGCTGACTATGCCTTAGGCAGCAGCGGCAGAAAGTTAT
GTAGTCGGATTTGGTGTAAAATCCTCCGCAGCATCCGCACCACAGAACTGCCACAGCTCATGGTGTGACAGTC
AAAAAGTTCTGAATACCACAGACACGTTCTTTACGGAGCACTCGTAGGCGGACCTGATGCCAGCGATGCTTA
TGTTGATGATATAGGAACTATGTAACAAATGAGGTTGCCTGCGACTACAATGCCGGTTTTGTAGGATTGCTCG
CCAAGATGTATGAAAAATATGGCGGAAACCCCATACCAAACCTTCATGGCTATAGAAGAAAAAACAAATGAAG
AAATTTATGTTGAAGCTACCGCCAATTCAAATAACGGTGTGCAATTGAAAAACATACCTTTACAATAAATCCGG
ATGGCCGGCAAGAGTTTGCAGCAAGCTTTCCTTCAGATATTTTCATGGACCTTACGGAATATGTATCCGCCGGAT
ACAATCCTAATGATATAACTGTTTCTATAATTTACAGTGCAGCACCAACTGCAAAAAATTTCAAACCAATACTT
TATGACGCATCCAAAAACATATATTATTGCGAAATCGATCTCTCCGGTACCAAGATATTTCCCGGAAGCAACTC
AGACCACCAGAAAGAAACCCAATTTAGAATACAGCCTCCTGCAGGCGCACCTTGGGACAACACCAACGACTTC
TCCTATCAGGGAATCAAGAAAAACGGTGAAGTTGTAAAAGAAATGCCTGTTTATGAAGACGGAAATTCATAT
TCGGTGTAGAACCAATGGTACCGGTCCTGCAACACCAACCGCGAAACCGTCCGTAAATCCTTCACCTCACCT
ACGCCAACATCGGATATTCTTTACGGTGACATCAATCTGGACGGAAAAATTAACCTTTCAGATGTTACACTGTT
AAAAAGATATATTGTGAAGTCCATAGATGTTTTCCCAACCGCTGATCCGGAACGGAGCTTAATAGCATCAGAT
GTAAACGGAGACGGAAGGGTAAACTCTACAGACTATTCATACCTTAAACGTTATGTCTTGAAAATCATAACAA
CCATACC

>BC1

ATGTCCGGAAAGCTTCCCAGACAACATCCGTAACAACCTGGCGCGGTGATTTCATGTCTCGGAGACGGAAGCGATG
TAGGCTTTGACCTCACAGGAGGTTGGTTTGACGCCGGTGACCATGTAAAATTCATCTGCCTATGGCTTACACA
GCCACTATGCTTGCATGGGCTGTGTATGAGTACAAGGACGCGTTACAAAAAAGCGGTCAATTGGGCTATTTAA
TGGATCAGATTAATGGGCATCGGACTACTTCATAAGATGCCATCCCGAAAAATATGTATATTATTATCAAGTG
GGTAACGGTGACATGGACCACAGATGGTGGGTGCCGGCAGAATGTATAGATGTTACAGCACCAAGACCGTCTT
ACAAAGTAGATCTGTCAAATCCCGGTTCCACAGTTACTGCGGGTACAGCTGCCGCACCTTGCTGCAACTGCCTTG
GTATTCAAAGACACTGATCCGGCATATGCCGCTCTGTGCATACGTCATGCAAAAGAACTCTTTGATTTTGTCTGA
AACCCTATGAGTGATAAAGGATATACCGCAGCATTGAATTTCTACACATCTCACAGTGGATGGTATGACGAG
CTTTCCTGGGCAGGTGCATGGATTTATCTTGCAGACGGTGACGAACTTATCTTGAAAAAGCTGAAAAGTATGT
GGATAAATGGCCAATCGAAAGCCAGACAACCTTACATTGCTTATTCATGGGGTCACTGCTGGGACGATTTTAC
TACGGAGCAGCACTTCTTTGGCAAAGATTACAAACAAATCCTTATACAAAAGAAGCGATAGAAAAGACACCTGG
ACTATTGGACAGTTGGATTTAATGGTCAGAGAGTCAGATATACACCAAAGGGTCTTGCTCACCTCACTGACTGG
GGTGTATTAAGACATGCCACTACTACTGCATTCTTGCATGTGTTTATCCGACTGGTTCAGAATGTCCAAGGGA
AAAAGCCAATATTTACATAGATTTTGCCAAGAAACAGGCTGACTATGCCTTAGGCAGCAGCGGCAGAAAGTTAT
GTAGTCGGATTTGGTGTAAAATCCTCCGCAGCATCCGCACCACAGAACTGCCACAGCTCATGGTGTGACAGTC
AAAAAGTTCTGAATACCACAGACACGTTCTTTACGGAGCACTCGTAGGCGGACCTGATGCCAGCGATGCTTA
TGTTGATGATATAGGAACTATGTAACAAATGAGGTTGCCTGCGACTACAATGCCGGTTTTGTAGGATTGCTCG
CCAAGATGTATGAAAAATATGGCGGAAACCCCATACCAAACCTTCATGGCTATAGAAGAAAAAACAAATGAAG
AAATTTATGTTGAAGCTACCGCCAATTCAAATAACGGTGTGCAATTGAAAAACATACCTTTACAATAAATCCGG
ATGGCCGGCAAGAGTTTGCAGCAAGCTTTCCTTCAGATATTTTCATGGACCTTACGGAATATGTATCCGCCGGAT
ACAATCCTAATGATATAACTGTTTCTATAATTTACAGTGCAGCACCAACTGCAAAAAATTTCAAACCAATACTT
TATGACGCATCCAAAAACATATATTATTGCGAAATCGATCTCTCCGGTACCAAGATATTTCCCGGAAGCAACTC
AGACCACCAGAAAGAAACCCAATTTAGAATACAGCCTCCTGCTCAGGCGCACCTTGGGACAACACCAACGACTTC
TCCTATCAGGGAATCAAGAAAAACGGTGAAGTTGTAAAAGAAATGCCTGTTTATGAAGACGGAGTTTCTCATAT
TCGGTGTAGAACCAATGGTACCGGTCCTGCAACACCAACCGCGAAACCGTCCGTAAATCCTTCACCTCACCT
ACGCCAACATCGGATATTCTTTACGGTGACATCAATCTGGACGGAAAAATTAACCTTTCAGATGTTACACTGTT
AAAAAGATATATTGTGAAGTCCATAGATGTTTTCCCAACCGCTGATCCGGAACGGAGCTTAATAGCATCAGAT
GTAAACGGAGACGGAAGGGTAAACTCTACAGACTATTCATACCTTAAACGTTATGTCTTGAAAATCATAACAA
CCATACCGAA

Anhang

>F7

ATGTCCGGAAAAGCTTCCCGACAACATCCGTAACAACCTGGCGCGGTGATTCATGTCTCGGAGACGGAAAGCGATG
TAGGTCTTGACCTCACAGGAGGTTGGTTTGACGCCGGTGACCATGTAAAAATCAATCTGCCTATGGCTTACACA
GCCACTATGCTTGCATGGGCTGTGTATGAGTACAAGGACGCCGTACAAAAAAGCGGTCAATGGGCTATTTAA
TGGATCAGATTAATGGGCATCGGACTACTTCATAAGATGCCATCCCGAAAAATATGTATATTATTATCAAGTG
GGTAACGGTGACATGGACCACAGATGGTGGGTGCCGGCAGAATGTATAGATGTTACAGGCACCAAGACCGTCTT
ACAAAGTAGATCTGTCAAATCCCGGTTCCACAGTTACTGCGGGTACAGCTGCCGCACCTGCTGCAACTGCCTTG
GTATTCAAAGACACTGATCCGGCATATGCCGCTCTGTGCATACGTCATGCAAAAGAACTCTTTGATTTGCTGA
AACCCTATGAGTGATAAAGGATATACCGCAGCATTGAATTTCTACACATCTCACAGTGGATGGTATGACGAG
CTTTCCTGGGCAGGTGCATGGATTTATCTTGCAGACGGTGACGAACTTATCTTGA AAAAAGCTGAAAAGTATGT
GGATAAATGGCCAATCGAAAAGCCAGACAACCTTACATTGCTTATTCATGGGGTCACTGCTGGGACGACGTTTAC
TACGGAGCAGCACTTCTTTGGCAAAGATTACAAAACAAATCCTTATACAAAAGAACGATAGAAAAGACACCTGG
ACTATTGGACAGTTGGATTTAATGGTCAGAGAGTCAGATATACACCAAAGGGTCTTGCTCACCTCACTGACTGG
GGTGTATTAAGACATGCCACTACTACTGCATTCTTGCATGTGTTTATCCGACTGGTCAGAATGTCCAAGGGA
AAAAGCCAATATTTACATAGATTTTGGCAAAGAAACAGGCTGACTATGCCCTAGGCAGCAGCGGCAGAAAGTTAT
GTAGTCGGATTTGGTGAAAATCCTCCGCAGCATCCGCACCACAGAACTGCCACAGCTCATGGTGTGACAGTC
AAAAAGTTCCTGAATACCACAGACACGTTCTTTACGGAGCACTCGTAGGGCGACCTGATGCCAGCGATGCTTA
TGTTGATGATATAGAAAATATGTAACAAATGAGGTTGCCTGCGACTACAATGCCGGTTTTGTAGGATTTGCTG
CCAAGATGTATGAAAAATATGGCGGAAACCCCATACCAAACCTTATAGGCTATAGAAGAAAAACAAATGAAG
AAATTTATGTTGAAGCTACCGCCAATTCAAATAACGGTGTGCAATTGAAAAACATACCTTTACAATAAATCCGG
ATGGCCGGCAAGAGTTTGGCACAAGCTTTCCTTCAGATATTTTCATGGACCTTACGGAATATGTATCCGCCGGAT
ACAATCCTAATGATATAACTGTTTCTATAATTTACAGTGCAGCACCACAACTGCAAAAAATTTCAAACCAATACTT
TATGACGCATCCAAAAACATATATTATTGCGAAATCGATCTCTCCGGTACCAAGATATTTCCCGGAAGCAACTC
AGACCACCAGAAAGAAACCAATTTAGAATACAGCCTCCTGCAGGCGCACCTTGGGACAACACCAACGACTTC
TCCTATCAGGGAATCAAGAAAAACGGTGAAGTTGTAAGAAGAAATGCCTGTTTATGAAGACGGAGTTCTCATAT
TCGGTGTAGAACCAATGGTACCGGTCCTGCAACACCAACGCCGAAACCGTCCGTAATCCTTCACCTCACCT
ACGCCAACATCGGATATTCTTTACGGTGACATCAATCTGGACGGAAAAATTAACCTTTCAGATGTTACACTGTT
AAAAAGATATATTGTGAAGTCCATAGATGTTTTCCCAACCGCTGATCCGGAACGGAGCTTAATAGCATCAGAT
GTAAACGGAGACGGAAGGGTAAACTCTACAGACTATTCATACCTTAAACGTTATGTCTTGA AAAATCATAACCA
CCATACC

cipA-Sequenzen

>5g

AAACTTTGCCGGAAAAGTTGCAAAACGTGCTGCGGGCAAGTCACACCGGGATTTTACAAAATACTTGGGGGAGA
AAAGTAATTTTGAATAATACTTTCAAATGAAAAAATATTATTTAAAAAATGCCCTCAAATCCGTTTATAT
ATCGAATATATATTACAAGAAAGAAGATGCCAGATAAAAAGAGTAATAATTTTCATTGCAAAATAGTAATTTG
TTAGTATGTTTGATTTAAGCTGTGCGGGGGATGGAGCTTGAGGTGCCGCAAAATATGTTGGCAGACGGTTTTTTA
TCAGAAGTACGGTTTTAGACTGTACATAGAGTTTGA AAACAGGTGGGCTTTATTTGAAAACCTTATTGAAAGTA
ATTTAATTTAATATATAATGAAATTA AAACACGGTTAATTTTATTACAGATTCATTGTTAGAGAGAGAATTG
TTAATAACTTATGTATTTGGGAGTTTGGAGGCAAATCTTCATTA AATTAAGCGCTTAATATCTCAGTATTCAGTT
CATGTAGCAGTAATTAATATTTTAAATCCTGTTTTAATTGCCTCTAACATATCCCAAGATAACAGAGTTTAT
ATAGATAAAAAGTTTTAGAGGGAGGAGTTTGTACAAGGGATGGTTCAGTCTGTTTATGTTTTGGTTCTTTGAG
CATAAGATAACCATACTGGAGAGCGTTTATTAATTCACAGCATTTC AATGAAATAGCGTATTCAATACTTTATA
TGTATTGATTGTGCAAAATATCAAAGCATATACATAGAATCGTATGTTCCATCGATTTATTA AAAACCACTCCCC
AATATTTATCGACAAATCTCTGGTATTTATTA AAAACTGAAAATCGGACAAGAAAATATTAATATTGTTTATTA
ATATTAACACTAATTTTTGTTATTGTCTTGCTTGGTTTGTATATAAGGTATTTGATTTCAAATGCCTTTAGAGAT
CTTTTTATAAGATCATATAAAAATATTAATTTTTGGGAGGAATGGTAAATGAGAAAAGTCATCAGTATGCTCTTA
GTTGTGGCTATGCTGACGACGATTTTTGCGGCGATGATACCGCAGACAGTATCGGCGGCCACAATGACAGTCG
AGATCGGCAAGTTACAGCAGCCGTTGGATCAAAGTGA AAATACCTATAACCCTGAAAGGAGTGCCATCCAA
AGGAATGGCCAAATTGCGACTTCGTATTGGGTTATGATCCAAATGTGCTGGAAGTAACAGAAAGTAAAACAGGA
AGCATAATAAAAAGATCCGGATCCTAGCAAGAGCTTTGATAGCGCAATATATCCGGATCGAAAAGATGATTGTAT
TTCTGTTTGCAGAAGACAGTGAAGAGGAACGTATGCAATAACTCAGGATGGAGTATTTGCAACAATTGTAGC
CACTGTCAAATCAGCTGCAGCGGCACCGATTACTTTGCTTGAAGTAGGTGCATTTGCGGACAACGATTTAGTAG
AAATAAGCACAACTTTTGTGCGGGCGGAGTAAATCTTGGTAGTTCGGTACCGACAACACAGCCAAATGTTCC
GTCAGACGGTGTGGTAGTAGAAATTGGCAAAGTTACGGGATCTGTTGGA ACTACAGTTGAAATACCTGTATAT
TTCAGAGGAGTTCATCCAAAGGAATAGCAAACCTGCGACTTTGTGTTTCAGATATGATCCGAATGTATTGGAAA
TTATAGGGATAGATCCCGAGACATAATAGTTGACAACTCCGAACTTACCAAGAGCTTTGATACTGCAATATATCCT
GACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGGCGGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGA
GTATTTGCAAAAATAAGAGCAACTGTAAAATCAAGTGCTCCGGGCTATATTACTTTTCGACGAAGTAGGTGGAT
TTGCAGATAATGACCTGGTAGAACAGAAGGTATCATTTATAGACGGTGGTGTAAACGTTGGCAATGCAACACC
GACCAAGGGAGCAACACCAACAAATACAGCTACGCCGACAAAATCAGCTACGGCTACGCCACCAGGCCATC
GGTACCGACAACACACCGACAACACACCGGCAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGAATTCTAC
AACAGCAATCCTTCAGATACTA ACTCAATCAATCCTCAGTTCAAGTTACTAATACCGGAAGCAGTGCAAT
TGATTTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATTATACAGTAGACGGACAGAAAAGATCAGACCTTCTGGTGTGACC
ATGCTGCAATAATCGGCAGTAACGGCAGCTACAACGGAGTTACTTCAAATGTA AAAAGGAACATTTGTA AAAAT
GAGTTCCTCAACAAATAACGCAGACACCTACCTTGA AATAAGCTTTACAGGCGGAACTCTTGAACCGGGTGA

Anhang

CATGTTTCAGATACAAGGTAGATTTGCAAAGAATGACTGGAGTAACTATACACAGTCAAATGACTACTCATTAA
AGTCTGCTTCACAGTTTGTGAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTGAACGGTGTCTTGTATGGGGTAAAGAA
CCCGTGGCAGTGTAGTACCATCAACACAGCCTGTAACAACACCACCTGCAACAACAAAACCCAGCTGCAACAA
CAATACCCGCTCAGTATGCCAATGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCCGGGAGACA
CAGTAAATATACCTGTAAAGGAAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTAAACCCGAATGTACTTTGTATACAGTAT
GACCCGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAAAAACCCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCT
TTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTA
TGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGT
GTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAACGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTCTGACG
GTGGAGTAAATGTTGGAGGCACAACAGTACCTACAACACCGCCGGCATCAACAACACCCGACAGATGATCCGA
ACGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCCGGGAGACACAGTAAATATACCTGTAAGATTCA
GTGGTATACCATCCAAGGAAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAGAACC
AGAGATAAAAACCCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGAC
AGAAAAGATAATAGTATTCCTGCTTACAGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTA
TTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATTTGTAGAAGTAG
GCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATAC
AACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACAACACCCGACAGATGATCCGAATGCAGTAAAGGATTAAGGTG
GACACAGTAAATGCAAAAACCCGGGAGACACAGTAAAGAAATCCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGG
ATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAGAACC
TAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTG
TTTGCAGAAGACAGCGGAACCCGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAA
GTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACC
TTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAACCCTGCAACACCTAC
AACACCTGTAACAACACCCGACAACAACAGATGGTCTGGATGCAGTAAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGC
AAAACCCGGGAGACACAGTAAAGAAATCCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGAAATAGCAAACCTGTG
CTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAGAACC
AATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGC
GCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAG
CACCTAACGGACTTAGTGTAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAG
GACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACA
ACACCGACAGATGATTCGAATGCAGTAAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCCGGGAGACACAGTA
AGAATCCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGAAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACC
CGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAGAACC
TACTGCAGTATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACCCGGGAGCGTATGCA
ATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTTAGTGTAA
TCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGG
AGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACATCGCCGACAACAACACCCGCCAGAGCCGACGATAGCTCCG
AACAAGTTGACACTTAAGATAGGCAGAGCAGAAGGAAGACCTGGAGACACGGTGGAAAATACCGGTTAACTTG
TAGGAGTACCTCAAAAAGGAATAGCAAGCGGTGACTTCGTAGTAAAGCTATGACCCGAATGTACTTTGAGATAA
TAGAGATAGAACC
CAGAAAAGATGATAGTATTCCTGTTTGC
ATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAGGAGCACCTGAAGGATTCAGTGTAAATAGAAAATTTCTGAGTTT
GGTGCATTTGCAGATAATGATCTGGTAGAAGTGGAAAACCTGACCTTATCAATGGTGGAGTACTTGTAACTAATA
AAACTGTAATAGAAGGATATAAAGTATCCGGATACATTTGCCAGACTTCTCCTTCGACGCTACTGTTGCACCA
CTTGTAAGGCCGGATTCAAAGTTGAAATAGTAGGAACAGAATTGTATGCAGTAAACAGATGCAAACGGTACT
TTGAAATAACCGGAGTACCTGCAAATGCAAGCGGATATACATTTGAAGATTTCAAGAGCAACTTACTTTGGACAG
AGTAATGCAAAATGTTGATGTAACCGGAGATCTTCACTTCACTTCAAGGCTCCAATATGATGTTGGGAGTAG
GAGACATAGTAAAGACAAATTCTATCAACCTGTTGGAGCTTGCAGAAAGTTATCCGTTGCTTCAACGCTACTAAA
GGAAGCGCAAACCTACGTAGAAGAACTTGACATTAATAGAAAACGGCGCAATTAACATGCAAGACATAATGATT
GTTCATAAGCACTTTGGAGCTACATCAAGTGATTAC

>NB2

AAACTTTGCCGAAAGTTGCAAAACGTGCTGCGGGCAAGTCACACCCGGGATTTTACAAAATACTTGGGGGAGA
AAAGTAATTTTGTAAATAACTTTCAAATGAAAAAATATTATTTAAAAAATGCCCTCAAATCCGTTTATAT
ATCGAATATATATTACAAGAAAGAAGATGCCAGATAAAAAGAGTAATAATTTCAATTGCAAAATAGTAATTTG
TTAGTATGTTTGAATTAAGCTGTCCGGGGATGGAGCTTGAGGTGCCGCAAAATATGTTGGCAGACGGTTTTTTA
TCAGAAGTACGGTTTTAGACTGTACATAGAGTTTGA AAAACAGGTGGGCTTTATTTTGA AAAACTTATTGAAAAGTA
ATTTAATTTTAATATATAATGAAATTA AAAACACGGTAAATTTTATTACAGATTCATTGTTAGAGAGAGAATTG
TTAATAACTTATGATTTGGGAGTTTGGAGCAAATCTTCATTA AATTAAGCGCTTAATATCTCAGTATTCAGTT
CATGTAGCAGTAATTAATATTTTATTTAAATCCTGTTTTAATTGCCTCTAACATATCCCAAGATACAGAGTTTAT
ATAGATAAAAAAGTTTTAGAGGGGAGGAGTTTGTACAAGGGATTGGTCACGTCTGTTTATGTTTTGGTTCTTTGAG
CATAAGATAACCATACTGGAGAGCGTTTATTAATTTCCAGCATTTCAATGAAATAGCGTATTCAACTACTTTATA
TGTATTGATTGTGCAAAATATCAAAGCATATACATAGAAATCGTATGTTCCATCGATTTATTA AAAACCACTCCC
AATATTTTATCGACAAAATCTCTGGTATTTATTA AAAACTGAAAATCGGACAAGAAAATATTAATATTGTTTATTA
ATATTAACACTAATTTTGTATTGTCTTGGTTTGTATATAAGGTATTTGATTTCAAATGCCTTTAGAGAT
CTTTTATAAGATCATATAAAAATATTAATTTTGGGAGGAATGGTAGATGAGAAAAGTCATCAGTATGCTCTTA
GTTGTGGCTATGCTGACGACGATTTTTCGGCGATGATACCGCAGACAGTATCGGCGGCCACAATGACAGTCCG
AGATCGGCAAAGTTACAGCAGCCGTTGGATCAAAAAGTAGAAATACCTATAACCTGAAAAGGAGTGCCATCCAA

Anhang

AGGAATGGCCAATTGCGACTTCGTATTGGGTTATGATCCAAATGTGCTGGAAGTAACAGAAGTAAAACCAGGA
AGCATAATAAAAAGATCCGGATCCTAGCAAGAGCTTTGATAGCGCAATATATCCGGATCGAAAAGATGATTGTAT
TTCTGTTTGCAGAAGACAGCTGGAAGAGGAACGTATGCAATAACTCAGGATGGAGTATTTGCAACAATTTAGTAC
CACTGTCAAATCAGTCTGAGCGGCCACCGATTCTTTGAACTGAGTGCATTTGCGGACAACGATTTAGTAG
AAATAAGCACAACTTTTGTTCGCGGGCGGAGTAAATCTTGGTAGTTCCGTACCGACAACACAGCCAAATGTTCC
GTCAGACGGTGTGGTAGTAGAAATTGGCAAAGTTACGGGATCTGTTGAACTACAGTTGAAATACCTGTATAT
TTCAGAGGAGTTCCATCCAAAGGAATAGCAAACCTGCGACTTTGTGTTCAAGATATGATCCGAATGTATTGGAAA
TTATAGGGATAGATCCCGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAATATATCCT
GACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGGA
GTATTTGCAAAAAAAGAGCAACTGTAAAATCAAGTGCTCCGGGCTATATTACTTTTCGACGAAGTAGGTGGAT
TTGCAGATAATGACCTGGTAGAACAGAAGGTATCATTATAGACGGTGGTGTAAACGTTGGCAATGCAACACC
GACCAAGGGAGCAACACCAACAAATACAGCTACGCCGACAAAATCAGCTACGGCTACGCCACAGGCCATC
GGTACCGACAAAACACCCGACAAAACACCCGGCAAATACACCCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGAATTCTAC
AACAGCAATCCTTCAGATACTACTAACTCAATCAATCCTCAGTTCAAGGTTACTAATACCGGAAGCAGTGCAAT
TGATTTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATTATACAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACCTTCTGGTGTGACC
ATGCTGCAATAATCGGCAGTAACGGCAGCTACAACGGAGTTACTTCAAATGTAAAAGGAACATTTGTA AAAAAT
GAGTTCCTCAACAAATAACGCAGACACCTACCTTGAATAAAGCTTTACAGGCGGAACCTTGAACCGGGTGCA
CATTTCCAGTACAAGGTAGATTTGCAAAAGAATGACTGGAGTAACTATACACAGTCAAATGACTACTCATTTA
AGTCTGTTACAGTTTGTGAATGGATCAGGTAACGATACTTTGAACGGTGTCTGTATGGGTTAAAGAA
CCCGGTGGCAGTGTAGTACCATCAACACAGCCTGTAACAACACCACCTGCAACAACAAAACCACCTGCAACAA
CAATACCGCCGACAGATGATCCGAATGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACA
CAGTAAATATACCTGTAAGATTAGTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTAT
GACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATAAAAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCT
TTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTA
TGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTACGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGT
GTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAACAGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTCTGACG
GTGGAGTAAATGTTGGAGGCACAACAGTACCTACAACACCGCCGGCATCAACAACACCGACAGATGATCCGA
ACGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAATATACCTGTAAGATTCA
GTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAAT
AGAGATAAAAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGAC
AGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTA
TTTGTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAG
GCGGATTTGCGAACAACACCGGACAAACAACAGATGGTCTGGATGCAGTAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATG
AACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAGATGATCCGAATGCAGTAAGGATTAAGGTG
GACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGA
ATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACA
TAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTG
TTTGCAGAAGACAGCGGAACCGGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAA
GTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCT
TTGTAGAACAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTAC
AACACCTGTAACAACACCGGACAAACAACAGATGGTCTGGATGCAGTAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATG
AAAACCGGGAGACACAGTAAAGAAATACCTGTAAGATTCAGCAGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTG
CTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACATAATAGTTGACCCG
AATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGGAAGACA
GCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAG
CACCTAACGGACTTAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTTGTAGAACAGAG
GACACAGTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACACCTACAACAGCTGTAACA
ACACCGACAGATGTTGCAATGCAGTAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACAGTA
AGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACC
CGAATGACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGA
TACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACCGGGAGCGTATGCA
ATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTTAGTGTAA
TCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGG
AGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACATCGCCGACAACAACACCGCCAGAGCCGACGATAGCTCCG
AACAAGTTGACACTTAAGATAGGCAGAGCAGAAGGAAGACCTGGAGACACGGTGGAAATACCGGTTAACTTG
TATGGAGTACCTCAAAAAGGAATAGCAAGCGGTGACTTCGTAGTAAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAA
TAGAGATAGAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGA
CAGAAAGATGATAGTATTCCTGTTTGCAGAAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTGAAGATGGAGT
ATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTGAAGGATTCAGTGCATAGAAAATTTCTGAGTTT
GGTGCATTTGCAGATAATGATCTGGTAGAAGTGGAAACTGACCTTATCAATGGTGGAGTACTTGTAACTAATA
AAACTGTAATAGAAGGATATAAAGTATCCGGATAGCAATTTTCCAGACTTCTCTTCGACGCTACTGTTGTACCA
CTTGTAAAGGGCGGATTCAAAAGTTGAAATAGTAGAACAACAGAATTGTATGCAGTAACAGATGCAAAACGGTACT
TTGAAATAACCGGAGTACCTGCAAAATGCAAGCGGATATACATTGAAGATTTCAAGAGCAACTTACTTGGACAG
AGTAATTGCAAAATGTTGTAGTAACGGGAGATACTTCAGTTTCAACTTCACAGGCTCCAATAATGATGTGGGTAG
GAGACATAGTAAAAGACAATTCTATCAACCTGTTGGACGTTGCAGAAGTTATCCGTTGCTTCAACGCTACTAAA
GGAAGCGCAAACCTACGTAGAAGAACTTGACATTAATAGAAACGGCGCAATTAACATGCAAGACATAATGATT
GTTCATAAGCACTTTGGAGCTACATCAAGTGATTA

Anhang

>T2

TAAACTTTGCCGAAAAGTTGCAAAACGTGCTGCGGGCAAGTCACACCGGGATTTTACAAAATACTTGGGGGAG
AAAAGTAATTTTGTAAATAACTTTCAAATGAAAAAATATTTAAAAAATGCCCTCAAATCCGTTTATA
TATCGAATATATATTACAAGAAGAAGATGCCAGATAAAAAGAGTAATAATTTTCATTGCAAATAGTAATTTT
GTTAGTATGTTTTGATTTAAGCTGTGCGGGGGATGGAGCTTGAGGTGCCGCAAATATGTTGGCAGACGGTTTTT
ATCAGAAGTACGGTTTTAGACTGTACATAGAGTTTGAAAAACAGGTGGGCTTTATTTTAAAACTTATTGAAAGT
AATTTAATTTTAAATATATAATGAAATTTAAACACGGTTAATTTTTATTACAGATTCATTGTTAGAGAGAGAATT
GTTAATAACTTATGTATTTGGGAGTTTGGAGGCAAATCTTCATTAATTAAGCGCTTAATATCTCAGTATTCAG
TTCATGTAGCAGTAATTAATTTTTATTTAAATCCTGTTTTAATGGCCTCTAACATATCCCAAGATACAGAGTTT
ATATAGATAAAAAAGTTTTAGAGGGAGGAGTTTGTACAAGGGATTGGTCACGTCTGTTTTATGTTTTGGTTCTTTG
AGCATAAGATAACCATACCTGGAGAGCGTTTATTAATTTCCAGCATTTCAATGAAATAGCGTATTCATCAACTTTA
TATGTATTGATTGTGCAAATATCAAAGCATATACATAGAATCGTATGTTCCATCGATTTATTAAAAAACCACTCC
CCAATATTTATCGACAAAATCTCTGGTATTTATTAAAAACTGAAAATCGGACAAGAAAAATATTAATATTGTTTAT
TAATATTAACACTAATTTTTGTTATTGCTTGTGCTTGGTTTTGTATATAAGGTATTTGATTTCAAATGCCTTTAGAG
ATCTTTTTATAAGATCATATAAAAATATTAATTTTTGGGAGGAATGGTAGATGAGAAAAGTCATCAGTATGCTCT
TAGTTGTGGCTATGCTGACGACGATTTTTGCGGCGATGATACCGCAGACAGTATCGGCGGCCACAATGACAGT
CGAGATCGGCAAAGTTACAGCAGCCGTTGGATCAAAAAGTAGAAAATACCTATAACCTGAAAGGAGTGCCATCC
AAAGGAATGGCAAATTGCGACTTCGTATTGGGTTATGTCCAATGTGCTGGAAGTAAACAGAAGTAAAACCCAG
GAAGCATAATAAAAAGATCCGGATCCCTAGCAAGAGCTTTGATAGCGCAATATATCCGGATGCAAAGATGATTGT
ATTTCTGTTTGCAGAAGACAGTGGAAAGAGGAACGTATGCAATAACTCAGGATGGAGTATTTGCAACAATTGTA
GCCACTGTCAAATCAGCTGCAGCGGCACCGATTACTTTGCTTGAAGTAGGTGCATTTGCGGACAACGATTTAGT
AGAAATAAGCACAACCTTTTGTGCGGGCGGAGTAAATCTTGGTAGTCCGTACCGACAACACAGCCAAATGTT
CCGTCAGACGGTGTGGTAGTAGAAATTGGCAAAGTTACGGGATCTGTTGGAACACTACAGTTGAAAATACCTGTAT
ATTTAGAGGAGTTCCATCCAAAGGAATAGCAAACTGCGACTTTGTGTTTCAGATATGATCCGAATGTATTGGA
AATTATAGGGATAGATCCCGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAATATAT
CCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAGGAAACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGAC
GGAGTATTTGCAAAAAATAAGAGCAACTGTAATAAAGTGTCTCCGGGCTATATTACTTTTCGACGAAGTAGGTG
GATTTGCAGATAATGACCTGGTAGAACAGAAGGTATCATTATAGACGGTGGTGTAAACGTTGGCAATGCAAC
ACCGACCAAGGGAGCAACACCAACAATACAGCTACGCCGACAAAATCAGCTACGGCTACGCCCACCAGGCC
ATCGGTACCGACAAACACCCGACAAACACCCGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGAATTC
TACAACAGCAATCCTTCAGATACTACTAATCAATCAATCCTCAGTTCAAGGTTACTAATACCGGAAGCAGTGC
AATTGATTTGTCAAACCTCACATTGAGATATTATACAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACCTTCTGGTGTG
CCATGTGCAATAATCGGCAGTAACCGCAGTACAACCGAATTAATTTCAATGTAAGGAAAGTAAATGTTGAAA
AATGAGTTCCTCAACAAAATAACGCAGACACCTACCTTGAATAAGCTTTACAGGCGGAACCTTTGAACCGGGT
GCACATGTTTCAGATAACAAGGTAGATTTGCAAGAATGACTGGAGTAACTATACACAGTCAAATGACTACTCAT
TCAAGTCTGCTTCACAGTTTGTGTAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTGAACGGTGTCTTTGTATGGGGTAAA
GAACCCGGTGGCAGTGTAGTACCATCAACACAGCCTGTAACAACACCACCTGCAACAACAAAACCACCTGCAA
CAACAAAACCACCTGCAACAACAATACCGCGTCAGATGATCCGAATGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAG
TAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAATATACCTGTAAGATTACAGTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAA
ACTGTGACTTTGTATACAGTATGACCCGAATGTACTTGTAGATAATAGAGATAAAAACCGGAGAAATGATGAT
TGACCCGAATCCTGACAAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAG
AAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAGTAAAAAT
CCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATTTGTAGAAGTAGGGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGA
ACAGAGGACACAGTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACACCTACAACACCT
GTAACAACACCGACAGATGATTCGAATGCAGTAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGAC
ACAGTAAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCT
ATGACCCGAATGTACTTGTAGATAATAGAGATAGAACCAGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGA
GCTTTGATACTGCAGTATACCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAGGAAAGACAGCGGAAACAGGAGC
GTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAGTAAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTC
AGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGGGATTTGAACAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTCTTTGACG
GTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACACAACAG
ATGATCTGGATGCAGTAAGGATTAAGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGTAGAatacCT
GTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTAC
TTGAGATAATAGAGATAGAACCAGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGT
ATATCCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAGGAAAGACAGCGGAACCGGAGCGTATGCAATAACTAAA
GACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAATCAGGAGCACCTAACGGACTTAGTGTAAATCAAATTTG
TAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTCTTTGACGGTGGAGTAAATGT
TGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTACGACACCTGTAACAACACCGACGACAACAGATGATCTGGATGC
GAAAGGGATTAAGGCGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGG
TATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGTAGATAATAGAG
ATAGAACCAGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCTGACAGAA
AGATAATAGTATTCTGTTTGCAGGAAAGACAGCGGAACAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGC
TACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATTTGTAGAAGTAGGGCGGA
TTTGCAGAACAAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAG
AACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACACAACAGATGATCTGGATGCAGTAAAGTAAAGT
GGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGG
AATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGTAGATAATAGAGATAGAACCAGGAGAA

Anhang

TTGATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATGATAGTATTCCCT
GTTTGC GGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTGAAGATGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAA
AGTAAAAACCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGGCGGATTTGCGAACAAATGAC
CTTG TAGAACAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTA
CAACAGCTGTAAACAACCGACAACAACAGATGTCTGGATGTCAGTAAGGATTAAGATGGACACAGTAAATG
CAAAACCGGGAGACACAGTAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTG
ACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACATAATAGTTGACCC
GAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCCTGTTTGCAGAAGAC
AGCGGAACGGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAGTAAAAGAAGGA
GCACCTAACGGACTCAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGGCGGATTTGCGAACAAATGACCTTGTAGAACAGA
AGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTGGAGATACAACAGTACCTACAACATCGCCGACAACAACACC
GCCAGAGCCGATAACTCCGAACAAGTTGACACTTAAGATAGGCAGAGCAGAAAGGAAGACCTGGAGACAC
GGTGGAAAATACCGTTAACTTGTATGGAGTACCTCAAAAAGGAATAGCAAGCGGTGACTTCGTAGTAAGCTAT
GACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCT
TTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATGATAGTATTCCCTGTTTGC GGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTA
TGCAATAACTGAAGATGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTGAAGGATTCAG
TGCAATAGAAAATTTCTGAGTTTGGTGCATTTGCAGATAATGATCTGGTAGAAGTGGAAAATGACCTTATCAATG
GTGACGACTTGTAACTAATAAACCTGTAATAGAAGGATAAAAGTATCCGGATACATTTTGCAGACTTCTCC
TTCGAGCTACTTTGACCACTTGTAAAGCCGGATTCAAAAGTGGAAATAGTAGGAACAGAAATTTGATCGA
TAACAGATGCAACCGGATACTTTGAAAATAACCGGAGTACCTGCAAAATGCAAGCGGATATACATTGAAGATTT
AAGAGCAACTTACTTGGACAGAGTAATTGCAAAATGTTGTAGTAACGGGAGATACTTCAGTTTCAACTTCACAG
GCTCCAATAATGATGTGGGTAGGAGACATAGTGAAAGACAATTCTATCAACCTGTTGGACGTTGCAGAAGTTA
TCCGTTGCTTCAACGCTACTAAAGGAAGCGCAAACCTACGTAGAAGAACTTGACATTAATAGAAAACGGCGCAAT
TAACATGCAAGACATAATGATTGTTTCATAAGCACTTTGGAGCTACATCAAGTGATTA

>BC1

TCAAACTTTATATGTATTGATTGTGCAAAATATCAAAGCATATACATAGAATCGTATGTTCCATCGATTATTAA
AAACCACTCCCAATATTTATCGACAAATTTCTCTGGTATTTATTA AAAACTGAAAATCGGACAAGAAAATATTAA
TATTGTTTATTAATATTAACACTAATTTTTGTTATTGCTTGTCTGGTTTGTATATAAGGTATTTGATTCAAATG
CCTTTAGAGATCTTTTTATAAGATCATATAAAAATATTAATTTTTGGGAGGAATGGTAGATGAGAAAAGTCATCA
GTATGCTCTTAGTTGTGGCTATGCTGACGACGATTTTTGCGGCGATGATACCGCAGACAGTATCGGCGGCCACA
ATGACAGTCGAGATCGGCAAAGTTACAGCAGCCGTTGGATCAAAGTAGAAAATACCTATAACCTGAAAGGA
GTGCCATCCAAAGGAATGGCAATTGCGACTTCGTATTGGGTTATGATCCAAATGTGCTGGAAGTAACAGAAG
TAAACACGAGCATATAAAAAGATCCGGATCTTAGCAAGAGCTTTGATAGCGCAATATATCCGGATCGAAA
GATGATTGTAATTTCTGTTTGCAGAAGACAGTGGAAGAGGAACGTATGCAATAACTCAGGATGGAGTATTTGCA
ACAATTGTAGCCACTGTCAAATCAGCTGCAGCGGCACCGATTACTTTGCTTGAAGTAGGTGCATTTGCGGACAA
CGATTTAGTAGAAAATAAGCACAACTTTTGTGCGGGCGGAGTAAATCTTGGTAGTTCCGTACCGACAACACAG
CCAAATGTTCCGTCAGACGGTGTGGTAGTAGAAATTGGCAAAGTTACGGGATCTGTTGGAACACAGTTGAAA
TACCTGTATATTTAGAGGAGTTCCATCCAAAGGAATAGCAAACCTGCGACTTTGTGTTTACAGATATGATCCGAAT
GTATTGGAAAATTATAGGGATAGATCCCGGAGACATAAATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATAC
CAATATCTGACAGAAAGATAATAGTATTCTGTTTGGCGAAGACAGCGGAACAGGACGATGCAATAAC
TAAAGACGGAGTATTTGCAAAAATAAGAGCAACTGTA AAAATCAAGTGCTCCGGGTATATTACTTTTCAGCGAA
GTAGGTGGATTTGCAGATAATGACCTGGTAGAACAGAAAGGTATCATTTATAGACGGTGGTGTAAACGTTGGCA
ATGCAACACCGACCAAGGGAGCAACACCAACAATAACAGCTACGCCGACAAAATCAGCTACGGCTACGCCCCA
CCAGGCCATCGGTACCGACAACACACCGACAACACACCGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGG
TTGAATTCTACAACAGCAATCCTTCAGATACTACTAATCAATCAATCCTCAGTTCAAGGTTACTAATACCGGA
AGCAGTGCATTTGATTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATATACAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACCT
TCTGGTGTGACCATGCTGCAATAATCGGCAGTAAACCGGACGTAACACGGAATTAATCAATGAAAAGAAC
ATTTGTA AAAATGAGTTCTCAACAAATAACCGACAGACCTACTTGAATAAAGCTTACAGGCGGAACCTTT
GAACCGGGTGCACATGTTTACAGATAACAAGGTAGATTTGCAAAAAGTACTGGAGTAACTATACACAGTCAAATG
ACTACTCATTTAAGTCTGCTTACAGTTTGTGAAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTGAACGGTGTCTTTGTA
TGGGGTAAAGAACCGGTGGCAGTGTAGTACCATCAACACAGCCTGTAACAACACCACCTGCAACAACAAAA
CCACCTGCAACAACAATACCGCCGACAGATGATCCGAATGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCA
AAACCGGGAGACACAGTAAATATACCTGTAAGATTCACTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACT
TTGTATACAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATAAAAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAA
TCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAGAAGACAGC
GGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCA
CCTAACGGACTCAGTGTAAATCAAATTTGTAGAAGTAGGGCGGATTTGCGAACAAACGACCTTGTAGAACAGAAGA
CACAGTTCTCTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGGCACAACAGTACCTACAACACCGCCGGCATCAACAACACC
GACAGATGATCCGAACGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAATAT
ACCTGTAAGATTCACTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAAT
GACTATGAGATAATAGAGATAAAAACCGGGAATGATAAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTG
CAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAAC
TAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAAATCAA
TTTGTAGAAGTAGGGCGGATTTGCGAACAAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAA
ATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAGATGATCCGAATGCAGT
AAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAACTGTAAGATTCAGCGGTAT
ACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGACTTGAGATAATAGAGATA

Anhang

GAACCGGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGA
TAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACGGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTAC
GATAGTAGCGAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTT
TGCGAACAAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAA
CCTGCAACACTCAACACCGCTGTAACAACACCGCAACAACAGATGGTCTGGATGCAGTAAGGATTAAGTGACACAGTAAATGCA
ACACAGTAAATGCAAAACCGGGAGACACAGTAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAA
TAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCAGGGAGACAT
AATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGT
TTGACAGAAGACAGCGGAACGGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAG
TAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAAATGACCT
TGTAGAACAGAAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATAACAACAGAACTGCAACACCTACA
ACACCTGTAACAACACCGCAACAACAGATGGTCTGGATGCAGTAAGGATTAAGTGACACAGTAAATGCAAAACCGGGAGACAGTAAATGCA
AAACCGGGAGACACAGTAAGAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAAATAGCAAACCTGTGAC
TTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCAGGGAGACATAATAGTTGACCCGA
ATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAAGACAG
CGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGC
ACCTAACGGACTTAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAAATGACCTTGTAGAACAGAGG
ACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATAACAACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACAA
CACCGCAGATGTTTTCGATAGGATGCAGTAAGGATGCAAGAGACAGTAAATGCAAAACCGGGAGACAGTAA
GAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCC
GAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCAGGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGAT
ACTGCAGTATATCCTGACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACGGGAGCGTATGCAA
TAACTAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTAACGGACTTAGTGTAAT
CAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGG
GTAATGTTGGAGATAACAACAGTACCTACAACATCGCCGACAACAACACCGCCAGAGCCGAGATAGCTCCGA
ACAAGTTGACACTTAAGATAGGCAGAGCAGAAGGAAGACCTGGAGACACGGTGGAAATACCGGTTAACTTGT
ATGGAGTACCTCAAAAAGGAATAGCAAGCGGTGACTTCGTAGTAAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAAT
AGAGATAGAACCAGGGAGAAATGATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCCTGAC
AGAAAGATGATAGTATTCCTGTTTGCAGAAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTGAAGATGGAGTA
TTTGTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTGAAGGATTCAGTGCAATAGAAATTTCTGAGTTT
GTGCATTTGCAGATAATGATCTGGTAGAAGTGGAAACTGACCTTATCAATGGTGGAGTACTTGTAACTAATAA
ACCTGTAATAGAAGGATATAAAGTATCCGGATACATTTTGCCAGACTTCTCCTTCGACGCTACTGTTGCACCAC
TTGTAAGGCGGATTCAAAAGTTGAAATAGTAGGAACAGAACTTGTATGCAGTAACAGATGCAAAACCGGACTT
TGAAATAACCGGAGTACCTGCAAATGCAAGCGGATATACATTGAAGATTTCAAGAGCAACTTACTTGGACAGA
GTAATTGCAAATGTTGTAGTAACGGGAGATACTTCAGTTTCAACTTCACAGGCTCCAATAATGATGTGGGTAGG
AGACATAGTAAAGACAATTCTATCAACCTGTTGGACGTTGCAGAAGTTATCCGTTGCTTCAACGCTACTAAAG
GAAGCGCAAACCTACGTAGAAGAAGTTGACATTAATAGAAACGGCGCAATTAACATGCAAGACATAATGATTGT
TCATAAGCACTTTGGAG

>F7

AAACTTTGCCGAAAGTTGCAAAACGTGCTGCGGGCAAGTCACACCGGGATTTTACAAAATACTTGGGGGAGA
AAAGTAATTTTGTAAATAACTTTTCAAATGAAAAAATATTATTTAAAAAAATGCCCTCAAATTCGGTTTATAT
ATCGAATATATATTACAAGAAAGAAGATGCCAGATAAAAAGAGTAATAATTTTCAATTGCAAAATAGTAATTTT
TTAGTATGTTTGAATTAAGCTGTCGGGGGATGGAGCTTGAGGTGCCGCAAATATGTTGGCAGACGGTTTTTTA
TCAGAAGTACGGTTTTAGACTGTACATAGAGTTGAAAACAGGTGGGCTTTATTTGAAAACCTATTGAAAGTA
ATTTAATTTAATATATAATGAAATTAAAAACCGGTTAATTTTATTACAGATTCATTGTTAGAGAGAGAATTG
TTAATAACTTATGTATTTGGGAGTTTGGAGGCAAACTTTCATTAATAAAGCGCTTAATATCTCAGTATTCAGTT
CATGTAGCAGTAATTAATTTTAAATCTGTTTAAATGGCCTTAACATATCCCAAGTATCCCAAGTATCCAGAGTTT
ATAGATAAAAAGTTTATAGAGGGAGGATTTGTACAAGGGATGGTCACGCTGTTTATGTTTGGTCTTTGAG
CATAAGATAACCATACTGGAGAGCGTTTATTAATCCAGCATTTCAATGAAATAGCGTATTCAATACTTTATA
TGTATTGATTGTGCAAAATATCAAAGCATATACATAGAATCGTATGTTCCATCGATTTATTAAAAACCACTCCC
AATATTTATCGACAAATCTCTGGTATTTATTAAAAACCTGAAAATCGGACAAGAAAATATTAATATTGTTATTA
ATATTAACACTAATTTTGTATTGCTTGTCTGGTTTGTATATAAGGTATTTGATTTCAAATGCCTTTAGAGAT
CTTTTATAAGATCATATAAAAATATTAATTTTGGGAGGAATGGTAGATGAGAAAAGTCATCAGTATGCTCTTA
GTTGTGGCTATGCTGACGACGATTTTGGCGCGATGATACCGCAGACAGTATCGGCGGCCACAATGACAGCTCG
AGATCGGCAAAGTTACAGCAGCCGTTGGATCAAAAAGTAGAAAATACCTATAACCCTGAAAAGGAGTGCCATCCAA
AGGAATGGCCAATTGCGACTTCGTATTGGGTTATGATCCAAATGTGCTGGAAGTAACAGAAGTAAAACAGGA
AGCATAATAAAAAGATCCGGATCCTAGCAAGAGCTTTGATAGCGCAATATATCCGGATCGAAAAGATGATTGTAT
TTCTGTTTGCAGAAGACAGTGGAAAGAGGAACGTATGCAATAACTCAGGATGGAGTATTTGCAACAATTGTAGC
CACTGTCAAATCAGCTGCAGCGGCACCGATTACTTTGCTTGAAGTAGGTGCATTTGCGGACAACGATTTAGTAG
AAATAAGCACAACTTTTGTGCGGGCGGAGTAAATCTTGGTAGTTCGGTACCGACAACACAGCCAAATGTTCC
GTCAGCGGTGTGGTAGTAGAAAATTGGCAAAGTACGGGATCTGTTGGAACACTACAGTTGAAATACCTGTATAT
TTCAGAGAGTTCCTCAAAAGGAATAGCAAACCTGCGACTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TTATAGGGATAGATCCCGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGAGCTTTGATACTGCAATATATCCT
GACAGAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAAGACAGCGGAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAGACGGA
GTATTTGCAAAAATAAGAGCAACTGTAATAATCAAGTGCTCCGGGCTATATTACTTTCGACGAAGTAGTATTTGC
AGATAATGACCTGGTAGAACAGAAGGTATCATTTATAGACGGTGGTGTAAACGTTGGCAATGCAACACCGACC
AAGGGAGCAACACCAACAATAACAGCTACGCCGACAAAATCAGCTACGGCTACGCCACCAGGCCATCGGTA

Anhang

CCGACAAACACACCGACAAACACACCGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGAATTCTACAACA
GCAATCCTTCAGATACTACTAACTCAATCAATCCTCAGTTC AAGGTTACTAATACCGGAAGCAGTGAATTGAT
TTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATTATACAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACCTTCTGGTGTGACCATGC
TGCAATAATCGGCAGTACGGCAGCTACAACCGGAATTACTTCAAATGTAAAAGGAACATTTGTA AAAAATGAGT
TCCTCAACAAATAACGCAGACACCTACCTTGAAATAAGCTTTACAGGCGGAACCTTTGAACCGGGTGCACATG
TTCAGATACAAGGTAGATTTGCAAAGAATGACTGGAGTAACTATACACAGTCAAATGACTACTCATTCAAGTC
TGCTTACAGTTTGTGAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTGAACGGTGTCTTGTATGGGGTAAAGAACCCG
GTGGCAGTGTAGTACCATCAACACAGCCTGTAACAACACCACCTGCAACAACAAAACCCACCTGCAACAACAAT
ACCGCCGTGAGATGCCAATGCAATAAAGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGT
AAATATACCTGTAAGATTCAGTGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGAC
CCGAATGTACTTTGAGATAATAGAGATAAAAACCGGGAGAATTGATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTG
ATACTGCAGTATATCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAACAGACGGATGC
AATAACTAAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTA
ATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAGGACACAGTTCTTTGACGGTG
GAGTAAATGTTGGAGATACAACAGTACCTACAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGGACAGATGATTCGAA
TGCAGTAAGGATTAAGGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAAATACCTGTAAGATTCAG
CGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATA
GAGATGAAACCGGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCTGACA
GAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGGAAAGACAGCGGAAACAGGAGCGTATGCAATAACTAAAAGACGGAGT
TGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAATCCGGAGCACCTAACGGACTCAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGC
GGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAA
CAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAACAACAGATGATCTGGATGCAGTAAGGATTA
AGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAA
GGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAAGTGGGA
GACATAATAGTTGACCCGAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCGGTATATCTGACAGAAAAGATAATAGTAT
TCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAAACGGGAGCGTATGCAATAACTAAAAGACGGAGTATTTGTGATAGTAGCGAA
AGTAAAAGAAGGAGCACCTAACGGACTTAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGAC
CTTGTAGAACAGAAGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTA
CAACACCTGTAACAACACCGACAACAACAGATGATCTGGATGCAGTAAAGGATTAAGTGGACACAGTAAATG
CAAAAACCGGGAGACACAGTAAAGAAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTG
ACTTTGTATACAGCTATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACATAATAGTTGACCC
GAATCCTGACAAGAGCTTTGATACTGCAGTATATCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGAC
AGCGGAACCGGAGCGTATGCAATAACTAAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAAGGAGC
GCACCTAACGGACTTAGTGTAATCAAATTTGTAGAAGTAGGCGGATTTGCGAACAATGACCTTGTAGAACAGA
AGACACAGTTCTTTGACGGTGGAGTAAATGTTGGAGATACAACAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAAC
AACACCGACAACAACAGATGATCTGGATGCAGTAAAGGATTAAGTGGACACAGTAAATGCAAAAACCGGGAGA
CACAGTAAAGAAATACCTGTAAGATTCAGCGGTATACCATCCAAGGGAATAGCAAACCTGTGACTTTGTATACAGC
TATGACCCGAATGTACTTGAGATAATAGAGATAGAACCGGGAGACATAATAGTTGACCCGAATCCTACCAAGA
GCTTTGATACTGCAGTATATCTGACAGAAAAGATAATAGTATTCCTGTTTGCAGAAGACAGCGGAAACGGGAGC
GTATGCAATAACTAAAAGACGGAGTATTTGCTACGATAGTAGCGAAAAGTAAAAGAAGGAGCACCTGAAGGATTCAGT
CTGAGTTTGGTGCATTTGCAGATAATGATCTGGTAGAAGTGGAACCTGACCTTATCAATGGTGGAGTACTTGTA
ACTAATAAACCTGTAATAGAAGGATATAAAGTATCCGGATACATTTTGCCAGACTTCTCTTCGACGCTACTGT
TGCACCACTTGTAAAGGCCGGATTCAAAGTTGAAATAGTAGGAACAGAATTGTATGCAGTAAACAGATGCAAAC
GGATACTTTGAAATAACCGGAGTACCTGCAAAATGCAAGCGGATATACATTGAAGATTTCAAGAGCAACTTACT
TGGACAGAGTAATTGCAAATGTTGTAGTAACGGGAGATACTTCACTTCAACTTACAGGCTCCAATAATGAT
GTGGGTAGGAGACATAGTGAAGACAATTCTATCAACCTGTTGGACGTTGCAGAAGTTATCCGTTGCTTCAAC
GCTACTAAAGGAAGCGCAAACCTACGTAGAAGAATTGACATTAATAGAAAACGGCGCAATTAACATGCAAGAC
ATAATGATTGTTCCATAAGCACTTTGGAGCTACATCAAGTGATTA

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt v.a. Herrn Prof. Dr. Liebl für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation an seinem Lehrstuhl.

Besonders danken möchte ich Dr. Wolfgang Schwarz für die Überlassung des interessanten Themas, sein fortwährendes Interesse sowie die hilfreichen Diskussionen und Anregungen während meiner Arbeit.

Dr. Vladimir V. Zverlov danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft und die zahllosen Tipps und Tricks im Laboralltag. Außerdem danke ich Dr. Vladimir V. Zverlov und Daniela Köck für die Sequenzierung des *cipA* von *C. thermocellum* BC1.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima danken, besonders den Arbeitsgruppenmitgliedern Jan Krauss, Daniela Köck und Johanna Panitz.

Den Studenten Sarah Schiffner, Melanie Semmler, Stefanie Redl, Lara Kuntz, Caroline Hauser, Florian Baumgärtner, Philip Hanuschick, Ilka Sührer und Felicitas Kirschner danke für ihre Beiträge zu den Ergebnissen im Rahmen von Praktikums- oder Bachelorarbeiten. Außerdem danke ich Sabine Dummer für ihre Unterstützung.

Dr. M. Lebuhn, Elena Madge-Pimentel und Bernhard Munk von der LfL-AQU danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung von einigen RNA- und DNA-Proben.

Carmen Marin-Perez von der LfL danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Außerdem danke ich ihr für die regelmäßigen Gärrest-Lieferungen, für die Durchführung der Gasanalysen und die Zurverfügungstellung von Proben aus den Technikumsfermentern der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) sowie der Daten zum Biogasertrag der inokulierten Fermenter.

Frederike Hahn von der Universität Hohenheim danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Inokulation des Technikumsfermenters und für die Lieferung der Fermenterproben. Außerdem danke ich ihr für die Zurverfügungstellung von Proben aus den Technikumsfermentern der Universität Hohenheim und der Daten zum Biogasertrag der inokulierten Fermenter.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleiten.