Charakterisierung der anaeroben Versäuerung von synthetischem Abwasser unter psychrophilen Bedingungen

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Marina Heinrich

aus Dresden

Hauptberichter:	Prof. Dr. Th. Hirth
Mitberichter:	Prof. Dr. K.-H. Engesser
Tag der mündlichen Prüfung:	10.11.2017

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP der Universität Stuttgart

2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, verfasst habe.

_____

Marina Heinrich

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie im Forschungsgebiet Umwelt-Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Thomas Hirth durchgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Thomas Hirth möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung und seinem Interesse am Gelingen dieser Arbeit danken.

Prof. Walter Trösch danke ich für die Idee zu dem spannenden Thema und für die wissenschaftliche Betreuung.

Bei Dr. Dirk Benndorf und Fabian Kohrs aus der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik der Otto von Guericke Universität Magdeburg bedanke ich mich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und labortechnische Unterstützung auf dem Gebiet der Metaproteomanalyse.

Bei der gesamten Abteilung Umweltbiotechnologie des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die freundliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie das allgemein gute Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Hedwig Pilgram, Steffen Görner und Alexander Laug, die mir im Labor und bei der Anlagentechnik tatkräftig zur Seite standen.

Anja Grohmann danke ich für die Durchführung ihrer Bachelorarbeit auf diesem Thema.

Bei Dr. Hans Weber und Dr. Tosca Zech möchte ich mich für persönliche Ratschläge, fachliche Diskussionen und die Unterstützung bei der schriftlichen Arbeit bedanken.

Meinen Eltern und Freunden danke ich, dass sie mich auf dem langen Weg bis zu diesem Ziel begleitet und stets unterstützt haben.

Mit seinen fünf Sinnen ausgestattet, erforscht der Mensch die Welt, die ihn umgibt, und nennt dieses Abenteuer Wissenschaft.

Edwin P. Hubble

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... *VII*

Abbildungsverzeichnis ..... *VIII*

Tabellenverzeichnis ..... *XII*

Kurzfassung ..... *XIV*

Abstract ..... *XVI*

1 Einleitung und Zielsetzung *1*

1.1 Einleitung und Motivation **1**

1.2 Zielstellung **2**

2 Stand der Wissenschaft *4*

2.1 Der anaerobe Abbauprozess **4**

2.1.1 Die Versäuerung von Zuckern 5

2.1.2 Die Versäuerung von Aminosäuren 6

2.2 Die Mikroorganismen des anaeroben Abbaus **7**

2.2.1 Hydrolytische und acidogene Bakterien 7

2.2.2 Acetogene Bakterien 8

2.2.3 Methanogene *Archaea* 10

2.3 Einflussfaktoren auf die anaeroben biologischen Abbauvorgänge **11**

2.3.1 Einfluss von Ammonium und Schwefelwasserstoff 11

2.3.2 Einfluss des Wasserstoffpartialdrucks 13

2.3.3 Einfluss von Temperatur und Verweilzeit 14

2.4 Molekularbiologische Methoden **15**

3 Material und Methoden *19*

3.1 Fermentationsversuche **19**

3.1.1 Versuchsaufbau und Probenahme 19

3.1.2 Versuchsdurchführung 20

3.1.3 Synthetisches Substrat 21

3.1.4 Inokulum 23

3.2 Analytische Methoden **24**

3.2.1 Gasanalytik 24

3.2.2 Bestimmung von Trockenrückstand und organischem Trockenrückstand 24

3.2.3 Bestimmung der organischen Säuren 24

3.2.4 Bestimmung von CSB und Stickstoff 24

3.2.5 Bestimmung weiterer Gärprodukte 25

3.3 Berechnungen **25**

3.3.1 Gasnormvolumen 25

3.3.2 Korrektur des Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalts ... 26
3.4 Mikroskopische Untersuchungen im Auflicht ... 26
3.5 Fluoreszenz in situ Hybridisierung ... 26
3.5.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung nach Nielsen et al. (2009) ... 26
3.5.2 Eingesetzte Oligonukleotidsonden ... 27
3.5.3 Fixierung der Proben ... 28
3.5.4 Objektträger-Vorbereitung ... 29
3.5.5 Immobilisierung der fixierten Proben und Dehydrierung ... 29
3.5.6 Hybridisierung und Waschschritt ... 29
3.5.7 Mikroskopie und Bildauswertung mit MATLAB ... 31
3.6 Metaproteomanalyse ... 32
3.6.1 Probennahme und Probenvorbereitung ... 32
3.6.2 Zellaufschluss, Extraktion, Fällung und Reinigung der Proteine ... 32
3.6.3 Proteinquantifizierung mit Amido Schwarz ... 33
3.6.4 Proteinauftrennung mit SDS-Gelelektrophorese und 2D-Gelelektrophorese ... 34
3.6.5 Fixierung, Visualisierung und Trocknen der Gele ... 37
3.6.6 Auswertung der Gele mit Delta2D ... 37
3.6.7 *In-Gel*-Verdau ... 38
3.6.8 Massenspektrometrie mit der ESI-Ionenfalle ... 39
3.6.9 Massenspektrometrie mit MALDI-TOF/TOF ... 39
3.6.10 Bioinformatik-Werkzeuge ... 40
4 Ergebnisse der I. Versuchsphase – Die methanogenen Archaea ... 41
4.1 Gasbildung und -zusammensetzung ... 42
4.2 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand ... 46
4.3 Organische Säuren, CSB und pH-Wert ... 49
4.4 Lichtmikroskopische Untersuchungen ... 51
5 Ergebnisse der II. Versuchsphase – Charakterisierung der Acidogenese ... 53
5.1 Biomassekonzentration ... 53
5.2 pH-Wert ... 55
5.3 Spektrum der organischen Säuren ... 57
5.4 Alkoholische Gärprodukte ... 63
5.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen ... 65
5.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung ... 67
5.6.1 Hybridisierungsdauer und allgemeine Hybridisierbarkeit ... 67
5.6.2 Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den Mikroorganismenpopulationen der Reaktoren ... 68
5.7 Metaproteomanalyse ... 76
5.7.1 Ergebnisse zu Zellaufschluss und Proteinextraktion ... 77

5.7.2 SDS-Gelelektrophorese und ESI-Ionenfalle 79
5.7.3 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF 89
6 Diskussion 99
6.1 Zusammenhang zwischen Spektrum der Metabolite und Populationszusammensetzung 99
6.1.1 Zusammenhang zwischen dem Produktspektrum und den Ergebnissen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung 99
6.1.2 Zusammenhang zwischen dem Produktspektrum und den Ergebnissen der Metaproteom-analyse 105
6.2 Vergleich der FISH-Ergebnisse mit den Metaproteom-Ergebnissen 109
6.3 Vergleichbarkeit der ESI-Ergebnisse und MALDI-Ergebnisse 112
6.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis 113
7 Zusammenfassung und Ausblick 116
8 Literaturverzeichnis 119
9 Anhang 128
9.1 Geräte und Messmethoden 128
9.2 Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen 132
9.3 MATLAB-Algorithmus 137
9.4 Ergebnistabellen zur Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Metaproteomanalyse 142

Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	zweidimensionale Gelelektrophorese
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
ACN	Acetonitril
BSA	Bovine Serum Albumin
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DTT	Dithiothreitol
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridization
H_2O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRT	hydraulische Verweilzeit
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
L, l	Liter
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NH_4-N	Ammonium-Stickstoff
nm	Nanometer
OLR	organische Raumbelastung
PCR	Polymerase Chain Reaction
RSF	Rotationsscheibenfilter
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRT	Schlammverweilzeit
TCA	Trichloressigsäure
TN	Gesamtstickstoff
TOF	Time of Flight
TRFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
TR	Trockenrückstand
oTR	organischer Trockenrückstand
upm	Umdrehungen pro Minute
VE	Vollentsalzt
VWZ	Verweilzeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Übersicht über die Arbeitsphasen – von der Inokula-Auswahl bis zur Charakterisierung der acidogenen Abbauphase 3

Abbildung 2-1: Schema des vierstufigen, anaeroben Abbauprozesses verändert nach [Bischofsberger, 2005] 4

Abbildung 2-2: Verschiebung der Konzentrationen von undissoziierten Substraten und Hemmstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert [Grepmeier, 2002] 12

Abbildung 2-3: pH-Wert-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht NH_3/ NH_4-N (links) und temperatur-abhängige Hemmung der Methanbildung durch NH_3 (rechts) [Weiland, 2003] ... 12

Abbildung 2-4: pH-Wert-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht H_2S/ HS^- (links) und temperaturabhängige Hemmung der Methanbildung durch H_2S (rechts) [Weiland, 2003; Kroiss, 1985] 13

Abbildung 3-1: Schema und Foto eines verwendeten 1L-Glasreaktors 19

Abbildung 3-2: Schema der verschiedenen Fermentationsversuche 20

Abbildung 3-3: Schema der Fluoreszenz in situ Hybridisierung 27

Abbildung 3-4: Prinzip der 2D-PAGE mit den drei Hauptschritten IEF, Äquilibrierung und SDS-PAGE 35

Abbildung 3-5: Auswertung der 2D-PAGE-Gele mit der Software Delta2D 38

Abbildung 4-1: Verlauf der gebildeten Biogasmengen der Reaktoren R1 - R6 während der ersten 180 Kultivierungstage 42

Abbildung 4-2: Verlauf der gebildeten Biogasmengen der Reaktoren R7 - R9 und Schlamm-verweilzeiten (SRT) über den Versuchszeitraum von 130 Tagen 44

Abbildung 4-3: Verlauf der mittleren, gebildeten Biogasmengen und Schlammverweilzeiten (SRT) der Re-aktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 45

Abbildung 4-4: Mittlerer Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalt (mit den Konfidenz-intervallen) im Biogas der Reaktoren R1 - R6 während der Kultivierung bei 20 °C 46

Abbildung 4-5: Verlauf von Trockenrückstand und organischen Trockenrückstand sowie der Schlammverweilzeiten (SRT) für die Reaktoren R1 - R3 (20 °C) und R4 - R6 (20 °C bzw. 10 °C) 47

Abbildung 4-6: Verlauf von Trockenrückstand und organischen Trockenrückstand sowie der Schlammverweilzeit (SRT) für die Reaktoren R7 - R8 (38 °C) 48

Abbildung 4-7: Verlauf der Acetat- und Propionatkonzentration als Mittelwerte für R1 - R6 und des pH-Werts mit den Konfidenzintervallen 49

Abbildung 4-8: Verlauf der CSB-Konzentrationen im Filtrat der Reaktoren R1 - R6 50

Abbildung 4-9: Methanogene *Archaea* in Reaktor R2 nach (A) 30 d, (B) 113 d und (C) 164 d Kultivierung, T = 20 °C, SRT = 14 d (A + B) und 10 d (C) 51

Abbildung 4-10: Methanogene *Archaea* in den Reaktoren R7 - R9 (38 °C) zum (A) Startzeitpunkt, nach (B) 65 Tagen, nach (C) 95 Tagen und nach (D) 110 Tagen. Ab etwa 90 Tagen lassen sich neben kleinen Stäbchen (*Methanobacterium sp*.) und Kokken auch Zellagglomerate von *Methanosarcina sp.* beobachten. 52

Abbildung 5-1: Mittlerer Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand mit Konfidenzintervallen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C und Schlammverweilzeiten von 12 d bis 1d 54

Abbildung 5-2: links: R2 bei SRT = 8 d. Die Biomasse besteht fast nur noch aus Mikroorganismen und nur noch wenigen anderen Feststoffen. Rechts: Reaktoren R1 - R3 bei SRT = 1 d. Die Konzentration an Biomasse hat etwas abgenommen. Nur die schnell wachsenden Mikroorganismen sind noch in den Reaktoren verblieben. 54

Abbildung 5-3: Verlauf der pH-Werte sowie der Schlammverweilzeiten (SRT) für die Reaktoren mit 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 56

Abbildung 5-4: Mittlere Konzentrationen der organischen Säuren sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 58

Abbildung 5-5: Mittlere Acetatkonzentrationen sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 59

Abbildung 5-6: Mittlere Propionatkonzentrationen sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 61

Abbildung 5-7: Mittlere Konzentrationen weiterer organischer Säuren sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 62

Abbildung 5-8: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 10 °C-Reaktoren (R4 - R6) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen 63

Abbildung 5-9: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 20 °C-Reaktoren (R1 - R3) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen 64

Abbildung 5-10: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 38 °C-Reaktoren (R7 - R9) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen 64

Abbildung 5-11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mikroorganismenpopulationen der Reaktoren bei 10 °C (R4 - R6), bei 20 °C (R1 - R3) und bei 38 °C (R7 - R9) mit einer SRT = 1 d. Es werden die Unterschiede sowohl zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen als auch innerhalb gleicher Temperatur (vor allem bei 38 °C) deutlich. 65

Abbildung 5-12: Mikroorganismenpopulation des Reaktors R3 (20 °C) bei einer Schlammverweilzeit von 12 d (A), 8 d (B), 4 d (C) und 1 d (D). Es ist eine deutliche Änderung der Zusammensetzung anhand der Morphologie der Zellen erkennbar. 66

Abbildung 5-13: Anteile der mit der EUB338-Sonde markierten Zellen für verschiedene Bakterien-Reinkulturen bei unterschiedlichen Hybridisierungszeiten 68

Abbildung 5-14: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen der 10 °C, 20 °C und 38 °C-Reaktoren (SRT = 8 d, 4 d und 1 d) 70

Abbildung 5-15: Hybridisierungen für die Reaktoren bei 10 °C und SRT = 8 d mit der allgemeinen Bakteriensonde EUB338Mix (A-D grün, E rot) und den Cy3-markierten (rot) Sonden ClostI (A), Synm700 (B), CFB719 (C), GAM42a (D) und der 6-FAM-markierten Sonde HGC69a (E). Die Zellen wurden für die Quantifizierung mit DAPI (blau) gegengefärbt. 71

Abbildung 5-16: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 10 °C-Reaktoren R4, R5 und R6 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d) 73

Abbildung 5-17: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 20 °C-Reaktoren R1, R2 und R3 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d) 74

Abbildung 5-18: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 38 °C-Reaktoren R7, R8 und R9 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d) 75

Abbildung 5-19: links: SDS-Gel von verschiedenen Schlammproben (K, M: OECD-Medium; Kn, Kn37: reales Abwasser) nach Aufschluss mit Kugelmühle, Phenolextraktion und Ammoniumacetat-Fällung; rechts: 2D-PAGE der Probe M (klein, für 7 cm IPG-Streifen) 77

Abbildung 5-20: Großes 2D-PAGE-Gel (18 cm IPG-Streifen) der Probe M 78

Abbildung 5-21: Proteinkonzentration in der Reaktorprobe nach verschiedenen Aufschluss-zeiten mit dem MiniLys-Homogenisator 79

Abbildung 5-22: Coomassie gefärbte SDS-Gele von Proteinextrakten (100 µg) der Reaktoren R4 - R6 (10 °C), R1 - R3 (20 °C) und R7 - R9 (38 °C) für die Schlammverweilzeiten von 1 d, 4 d und 8 d. 80

Abbildung 5-23: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R4 (10 °C, SRT = 8 d) 82

Abbildung 5-24: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R4 (10 °C, SRT = 8 d) 83

Abbildung 5-25: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI- Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R1 (20 °C, SRT = 8 d) 84

Abbildung 5-26: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R1 (20 °C, SRT = 8 d) 86

Abbildung 5-27: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R9 (38 °C, SRT = 8 d) 87

Abbildung 5-28: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R9 (38 °C, SRT = 8 d) 88

Abbildung 5-29: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d) mit Gel B (R5, 10 °C, SRT = 4 d). 90

Abbildung 5-30: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d) mit Gel C (R6, 10 °C, SRT = 1 d). 91

Abbildung 5-31: Identifizierte Proteinpots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel E (R2, 20 °C, SRT = 4 d). 92

Abbildung 5-32: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel F (R2, 20 °C, SRT = 1 d). 93

Abbildung 5-33: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d). 95

Abbildung 5-34: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel E (R2, 20 °C, SRT = 4 d) mit Gel B (R5, 10 °C, SRT = 4 d). 96

Abbildung 5-35: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel F (R2, 20 °C, SRT = 1 d) mit Gel C (R6, 10 °C, SRT = 1 d). 97

Abbildung 6-1: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 10 °C-Reaktoren 100

Abbildung 6-2: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 20 °C-Reaktoren 101

Abbildung 6-3: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 38 °C-Reaktoren 103

Abbildung 6-4: Zusammenhang zwischen den Metaproteomdaten und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die Reaktoren R4 (10 °C), R1 (20 °C) und R9 (38 °C) mit SRT = 8 d 107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Generationszeiten verschiedener acetogener Bakterien in Abhängigkeit vom Substrat (Meisgeier, 2007) 9

Tabelle 2-2: Wachtsumsgeschwindigkeit der verschiedenen methanogenen *Archaea* (Jetten et al., 1991) 11

Tabelle 3-1: Schlammverweilzeiten der Fermentationsversuche in den 1 L-Glasreaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur 21

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des OECD-Mediums einfach konzentriert nach DIN 38 412 – L24 22

Tabelle 3-3: Analytische Daten des synthetischen Abwassers (einfach konzentriertes OECD-Medium, ohne Glucose) 22

Tabelle 3-4: Auswahl der Schlämme aus verschiedenen Kläranlagen für die Fermentations-versuche 23

Tabelle 3-5: Verwendete Oligonukleotidsonden mit Sequenz, Spezifität, Formamid-konzentration, Farbstoff und Referenz 28

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für verschiedene Formamid-konzentrationen 30

Tabelle 3-7: Zusammensetzung des Waschpuffers entsprechend der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers 30

Tabelle 3-8: Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendeten Filtersätze mit Extinktions- und Emissionswellenlängen 31

Tabelle 3-9: IEF-Protokoll für kleine IPG-Streifen (7 cm) 36

Tabelle 3-10: IEF-Protokoll für große IPG-Streifen (18 cm) 36

Tabelle 3-11: Protokoll zum Waschen und Entfärben der Coomassie-gefärbten Proteinspots 39

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der MALDI-Standardlösung 40

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der MALDI-Matrixlösung 40

Tabelle 6-1: Vergleich der FISH-Daten mit den Ergebnissen der Metaproteomanalyse für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C mit einer SRT = 8 d 110

Tabelle 9-1: Komponenten und Eigenschaften des Micro-Gaschromatographen Typ CP490 (Varan/ Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) 128

Tabelle 9-2: Komponenten und Eigenschaften des Gaschromatographen Typ 3900 (Varian/Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) 128

Tabelle 9-3: HPLC-Gerät und Messbedingungen (Perkin Elmer, Shelton, USA) 129

Tabelle 9-4: Messprinzip, Störquellen und Messbereich der verwendeten kolorimetrischen Küvettentests (Hach-Lange, Düsseldorf, Deutschland) (Hach-Lange, 2001-2003 66) 129

Tabelle 9-5: nanoHPLC-MS/MS und Messbedingungen 130

Tabelle 9-6: MALDI-TOF/TOF-Gerät (Bruker) und Messbedingungen..... 130

Tabelle 9-7: MASCOT-Sucheinstellungen und benutzte Datenbanken 131

Tabelle 9-8: Ergebnisse mit Konfidenzen der FISH-Analysen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C mit den verschiedenen Gensonden 142

Tabelle 9-9: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R4, 10 °C, SRT = 8 d, R5, 10 °C, SRT = 4 d und R6, 10 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF 143

Tabelle 9-10: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R3, 20 °C, SRT = 8 d, R2, 20 °C, SRT = 4 d und R2, 20 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF 145

Tabelle 9-11: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R4, 10 °C, SRT = 8 d, R5, 10 °C, SRT = 4 d und R6, 10 °C, SRT = 1 d sowie R3, 20 °C, SRT = 8 d, R2, 20 °C, SRT = 4 d und R2, 20 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF 147

Kurzfassung

Die anaerobe Abwasserreinigung bei mesophilen Temperaturen ist aufgrund der Reaktionskinetiken, Wachstumsraten und Temperaturoptima der Mikroorganismen weit verbreitet. Die Beheizung des Abwassers, das mit Umgebungstemperatur oder niedriger ankommt, führt zu erhöhten Heizkosten. Anaerobe Reaktoren, betrieben bei niedrigen Temperaturen (< 20 °C), bieten da eine kostensparende Alternative. Bisher existieren allerdings nur wenige Untersuchungen zum anaeroben Abbauprozess bei psychrophilen Temperaturen. Besondere Aufmerksamkeit erhielten dabei die methanogegen *Archaea*, da diese sehr empfindlich auf Veränderungen des pH-Wertes und der Temperatur reagieren. Dagegen ist noch wenig bekannt über die große Vielfalt der versäuernden Bakterien und deren Funktion beim Prozess.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Temperatur und Schlammverweilzeit auf das Produktspektrum der hydrolysierenden/versäuernden Bakterien zu untersuchen sowie diese zu identifizieren und deren Funktion im Prozess besser zu verstehen.

Dazu wurden je drei 1 L-Glasreaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C mit synthetischem Abwasser (OECD-Medium + Glucose) betrieben. Die erste Versuchsphase diente dazu, die methanogenen *Archaea* auszuwaschen und so eine bessere Charakterisierung der acidogenen Population zu ermöglichen. Beginnend bei 16 d Schlammverweilzeit wurde diese schrittweise gesenkt und die methanogenen *Archaea* sowie die Biogasbildung beobachtet. In der zweiten Versuchsphase wurde die Schlammverweilzeit bei allen Reaktoren weiter bis auf 1 d gesenkt. Parallel dazu wurde die Konzentration an organischen Säuren (C2 - C8) und verschiedener Alkohole mittels Gaschromatographie und HPLC gemessen. Die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgte mit den zwei molekularbiologischen Methoden Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Metaproteomanalyse.

Die Ergebnisse zeigen zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Reaktoren unterschiedlicher Temperatur sowohl in der Zusammensetzung der Reaktorpopulation als auch im Produktspektrum. Je höher die Betriebstemperatur desto stärker veränderte sich die Populationszusammensetzung bei den verschiedenen Schlammverweilzeiten. Bei den 10 °C- und 38 °C-Reaktoren bildeten Clostridien die dominanteste Gruppe. In diesen Reaktoren wurden höhere Konzentrationen an Acetat als bei den 20 °C-Reaktoren bestimmt. In den 38 °C-Reaktoren konnten außer Ethanol nahezu keine Alkohole nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Reaktoren mit 10 °C und 20 °C Betriebstemperatur.

Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnten Bakterien der Phyla *Actinobacteria* (HGC69a) und *Bacteroidetes* (CFB719), der Klassen *Clostridia* (ClostI) und γ-*Proteobacteria* (Gam42a) sowie der Familie *Syntrophomonadaceae* (Synm700) nachgewiesen und deren Anteile quantifiziert werden. Eine Identifizierung der Proteine in der Gesamtprobe erfolgte für je einen Reaktor unterschiedlicher Temperatur (R4 (10 °C), R1 (20 °C) und R9 (38 °C)) bei einer Schlammverweilzeit von 8 d. Dazu wurden aus den SDS-Gelen alle Proteinbanden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit nanoHPLC-ESI-MS/MS gemessen. Dabei konnten 769 Proteine identifiziert sowie verschiedenen Funktionen und Spezies zugeordnet werden.

Bei der 38 °C-Reaktorprobe fanden sich zudem Proteine der Methanogenese. Der Vergleich mit den FISH-Ergebnissen brachte gute Übereinstimmungen. Lediglich bei den Actinobakterien traten größere Unterschiede hinsichtlich des Anteils an der Reaktorpopulation auf. Mit der ESI-Metaproteomanalyse konnte zudem die Aktivität von Vertretern der Klasse *Negativicutes* in den 20 °C-Reaktoren sowie der Klasse *Synergistetes* in den 38 °C-Reaktoren nachgewiesen werden.

Als zweites erfolgte ein Vergleich der 10 °C- und 20 °C-Reaktoren bei verschiedenen Schlammverweilzeiten (SRT = 8 d, 4 d und 1 d) über 2D-PAGE. Ausgewählte Spots der einzelnen Gelvergleiche wurden mittels MALDI-TOF/TOF analysiert. Die Messungen ergaben 163 identifizierte Proteine. Darunter waren viele Proteine der Glykolyse und anderer Stoffwechselwege.

Abstract

The anaerobic waste water treatment is widespread, because of optimal reaction kinetics, growth rate and temperature optima of the microorganisms. To heat the ambient or low temperature wastewater results in increased heating costs. Therefore, low-temperature anaerobic bioreactors (< 20 °C) are a cost-saving alternative. Only a few studies exist about the psychrophilic anaerobic degradation process. Special attention was paid thereby for the methanogenic *Archaea*, beacause they are very sensitive to changes in pH and temperature. In contrast, very little is known about the wide varity of hydrolytic/acidogenic bacteria and their functional activities.

The aim of this study was to investigate the influence of temperature and sludge retention time on the product range by the hydrolytic/acidogenic bacteria as well as identification and characterisation of these bacteria for better understanding of their functional activities. For that, nine 1l-bioreactors, three for each temperature (10 °C, 20 °C, 38 °C), were fed with synthetic wastewater (OECD-media + glucose). The first experimental phase was used to wash out the methanogenic *Archaea* for a better characterisation of the acidogenic population. Starting with 16 d sludge retention time this was progressively reduced and the methanogenic *Archaea* and the biogas production have been observed. During the second experimental phase sludge rentention time was further reduced to 1 d at the end. At the same time volatile fatty acid (C2 – C8) and different alcohols were measured by gaschromatography and HPLC. The investigation of the microbial community was carried out by fluorescence in situ hybridisation (FISH) and metaproteomic.

The results show some significant differences in product range and microbial community structure between the reactors of different temperature.

The higher the operating temperature, the more the population composition changed at the different sludge retention times. *Clostridia* formed the most dominant group in the 10 °C and 38 °C reactors. Higher concentrations of acetate were determined in these reactors than in the 20 °C reactors. Except ethanol almost no alcohols could be detected in the 38 ° C reactors, compared to the reactors at 10 °C and 20 °C operating temperature.

Bacteria of the phyla *Actinobacteria* (HGC69a) and *Bacteroidetes* (CFB719), the classes *Clostridia* (ClostI) and γ-*Proteobacteria* (Gam42a) as well as of the family *Syntrophomonadaceae* (Synm700) were detected by FISH and quantified to DAPI-dyed cells. An identification of proteins in the whole sample was carried out for one reactor each temperature (R4 (10 °C), R1 (20 °C) and R9 (38 °C)) for a sludge retention time of 8 d. All protein bands from the SDS-gels were cut-out, tryptical digested and the peptides measured by nanoHPLC-ESI-MS/MS. Thereby 769 proteins could be identified and assigned to functional activities and species. For the 38 °C reactor sample proteins active in methanogenesis were found.

The comparison with the FISH results showed good consistencies. Only in the case of the actinobacteria major differences were in the proportion of the reactor population. The ESI metaproteome analysis also demonstrated the activity of *Negativicutes* in the 20 °C reactors and the *Synergistees* in the 38 °C reactors.

Further comparisons were done of 2D-PAGE-gels for the 10 °C and 20 °C reactors at different sludge retention times (SRT = 8 d, 4 d and 1 d).Peptide measurements of selected protein spots by MALDI-TOF/TOF amounted to 163 identified proteins. Among them were many proteins of glycolysis and other metabolic pathways.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung und Motivation

Die anaerobe Abwasserreinigung ist eine inzwischen essentielle und gut etablierte Technologie für die Reinigung verschiedenster Abwässer. Aufgrund der Reaktionsraten und Temperaturoptima der anaeroben Mikroorganismen werden die meisten Faulreaktoren bei mesophilen Temperaturen betrieben. Das Abwasser kommt jedoch mit Umgebungstemperatur oder kälter bei der Faulung an und muss dort aufgeheizt werden. Diese Erwärmung des Abwassers bzw. Schlammes kann bis zu 60 % des Wärmeverbrauchs der anaeroben Behandlung auf Kläranlagen ausmachen (MURL, 1999). Anaerobe Reaktoren, die bei psychrophilen (< 20 °C) Temperaturen betrieben werden, bieten somit eine attraktive und kostensparende Alternative.

Unabhängig von der Betriebstemperatur kann der anaerobe Abbau organischer Substanzen in mehrere Phasen unterteilt werden, wobei eine Vielzahl an Mikroorganismen über komplexe Stoffwechselwege zusammenarbeitet. Die hydrolysierenden und versäuernden Bakterien spalten die organischen Substanzen aus denen kurzkettige, organische Säuren, wie Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure, entstehen. Die acetogenen Bakterien bilden aus langkettigen Säuren Essigsäure und Wasserstoff für die methanogenen *Archaea*, die daraus Methan und Kohlenstoffdioxid bilden. Dieser Prozess unterliegt einem sensiblen Gleichgewicht, da die einzelnen metabolischen Gruppen von Mikroorganismen sehr unterschiedliche Bedingungen bevorzugen und unterschiedlich auf Störungen reagieren.

In einstufigen Systemen, in denen alle Mikroorganismen in einem Reaktor zusammenarbeiten, können schon kleine Änderungen, wie zum Beispiel eine veränderte Betriebstemperatur oder Substratzusammensetzung, zu Störungen des Abbauprozesses führen. Dies kann zu hohen Konzentrationen an organischen Säuren im Reaktor führen, die den Abbau zu Methan stören. Zudem muss stets ein Kompromiss bei den Betriebsbedingungen eingegangen werden, da die Mikroorganismen unterschiedliche Bedürfnisse an ihre Umgebung haben. Zweistufige Reaktorsysteme bieten hingegen mehr Sicherheit gegenüber Betriebsstörungen und eine bessere Anpassung der Bedingungen an die jeweiligen Mikroorganismen. In der ersten Stufe finden die Hydrolyse und die Versäuerung statt, in der zweiten die Methanogenese. Für eine optimale Auslegung und Betriebsweise solcher Reaktorsysteme muss der Einfluss von Temperatur und Verweilzeit auf die Mikroorganismenpopulation und deren Stoffwechselprodukte bekannt sein. Die Kenntnisse über die Zusammenhänge können außerdem helfen, Störungen bei anaeroben Prozessen schneller zu erkennen, diesen entgegen zu wirken und die Prozesse besser zu steuern.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen in einstufigen Reaktorsystemen bei mesophilen und auch einige bei psychrophilen Temperaturen für verschiedenste Abwässer. Dabei wurden vor allem die methanogenen *Archaea* intensiv hinsichtlich vorkommender Spezies, Aktivität und Funktion untersucht. (Collins et al., 2003; Karakashev et al., 2005; Abram et al., 2011) Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden (PCR, TRFLP, FISH, Metaproteomanalyse) konn-

ten zudem die verschiedenen Stoffwechselwege und die daran beteiligten Enzyme identifiziert werden.

Über die weit größere Gruppe der hydrolysierenden/versäuernden Bakterien ist im Vergleich dazu recht wenig bekannt. Erst ein kleiner Teil der beteiligten Spezies wurde mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert und charakterisiert. Sie ermöglichen erste Einblicke in diese mikrobielle Gemeinschaft. Die meisten Untersuchungen erfolgten in einstufigen Prozessen unter mesophilen Bedingungen. Aussagen zu gebildeten Stoffwechselprodukten waren nicht oder nur eingeschränkt möglich, da diese durch die methanogenen *Archaea* sofort umgesetzt wurden. (Liu et al. , 2001; Kim et al., 2011) Andere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Art und Konzentration gebildeter organischer Säuren unter dem Einfluss unterschiedlicher Temperaturen und hydraulischer Verweilzeiten, allerdings ohne die beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren und zu charakterisieren (Cha und Noike, 1997; Maharaj und Elefsionitis, 2001). Somit sind keine Aussagen über deren Reaktion auf veränderte Bedingungen (Temperaturen, Verweilzeiten) oder Veränderungen der Populationszusammensetzung möglich.

Es konnten keine Veröffentlichungen gefunden werden, bei denen unter psychrophilen Bedingungen die Versäuerungsphase sowohl hinsichtlich der Mikroorganismen und Stoffwechselwege als auch des Produktspektrums untersucht wurde. Gerade für zweistufige Systeme ist es aber wichtig, nicht nur die Methanogenese genau zu verstehen, sondern auch ein besseres Verständnis für die Mikroorganismen und ablaufenden Reaktionen der Versäuerungsphase zu besitzen. So kann auch die erste Stufe gezielt gesteuert und optimiert werden.

1.2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Charakterisierung der Gemeinschaft der hydrolysierenden/versäuernden Bakterien in anaeroben Reaktoren mit verschiedener Betriebstemperatur (10 °C, 20 °C, 38 °C) und bei unterschiedlichen Schlammverweilzeiten (8 d bis 1 d). Dabei wird zum einen untersucht, wie sich die zwei Parameter auf das Produktspektrum, d.h. organische Säuren und Alkohole, auswirken. Diese sind wichtige Zwischenprodukte für den weiteren Abbauprozess aber auch interessante Wertstoffe für andere industrielle Wirtschaftszweige. Als Substrat wird feststofffreies, synthetisches Abwasser mit definierter Zusammensetzung verwendet, um eine stets konstante Zulaufkonzentration und -zusammensetzung zu gewährleisten.

Zum anderen werden mittels molekularbiologischer Methoden die beteiligten Bakterien identifiziert und ihre Aktivität untersucht. Mikroskopie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung liefern Aussagen zur Struktur und den Anteilen der vorhandenen Bakterien an den Reaktorpopulationen. Die über Metaproteomanalyse identifizierten Proteine geben Aufschluss über die Stoffwechselwege und Funktionen einzelner Bakteriengruppen.

Abbildung 1-1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Arbeitsphasen, von der Auswahl des Inokulums, über das Auswaschen der methanogenen *Archaea* aus den Reaktoren, bis hin zur Charakterisierung der acidogenen Abbauphase.

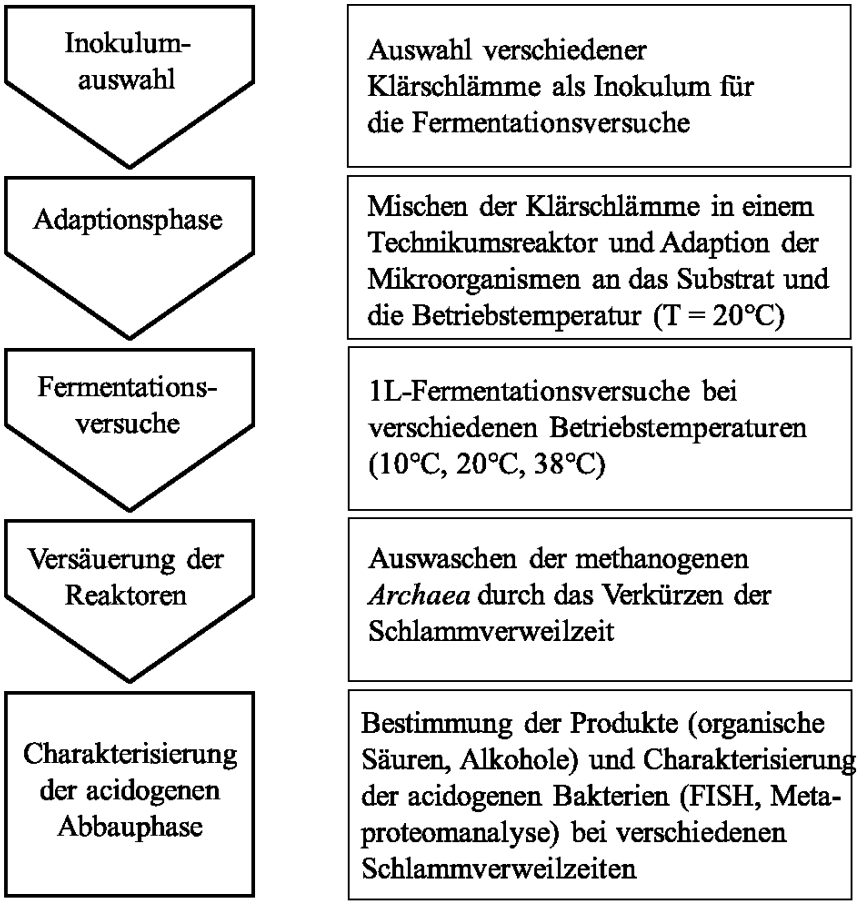

Abbildung 1-1: Übersicht über die Arbeitsphasen – von der Inokula-Auswahl bis zur Charakterisierung der acidogenen Abbauphase

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Der anaerobe Abbauprozess

Der anaerobe Abbau von Substraten ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Mikroorganismen. Prinzipiell lässt er sich in vier Stufen unterteilen (Abbildung 2-1). Im ersten Schritt, der Hydrolyse, werden hochmolekulare Stoffe wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette durch extrazelluläre Enzyme hydrolytisch-fermentativer Bakterien in niedermolekulare Stoffe zerlegt. Dazu gehören unter anderem Cellulasen, Amylasen, Proteasen und Lipasen. Die Kohlenhydrate werden dabei zu Zuckern (Mono-, Disaccharide) abgebaut, Fette zu Fettsäuren und Proteine zu Dipeptiden und Aminosäuren (Besgen und Kempkens, 2004).

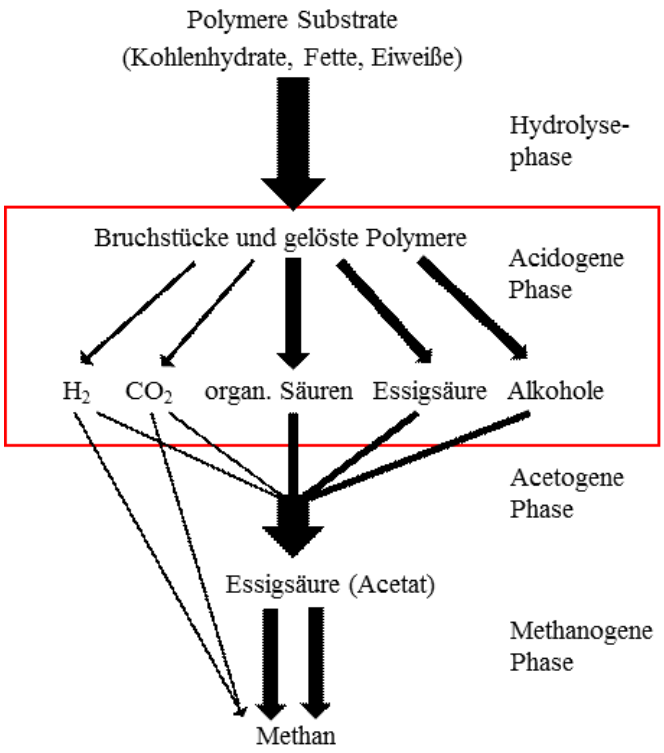

Abbildung 2-1: Schema des vierstufigen, anaeroben Abbauprozesses verändert nach [Bischofsberger, 2005]

Im zweiten Schritt, der Acidogenese, werden diese Mono- und Oligomere durch die obligat oder fakultativ anaeroben versäuernden Bakterien aufgenommen und abgebaut. Als Hauptprodukte werden die Carboxylsäuren (Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure) und Alkohole (Ethanol, Propanol, Butanol) gebildet. In geringeren Mengen entstehen auch Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff, Ammoniak und Schwefelwasserstoff. Art und Konzentration der einzelnen Gärprodukte hängen dabei von der Konzentration des intermediär gebildeten Wasserstoffs ab. Je höher der Wasserstoffpartialdruck, desto weniger reduzierte Produkte (Essigsäure, Wasserstoff) werden gebildet (Mudrack und Kunst, 1994). Bei der Versäuerung ändert

sich der Energiegehalt (CSB) des Substrates (z.B. Abwasser) nur wenig (ca. 10 % Abnahme). Die Abnahme hängt von dem Anteil an CSB ab, der als CO_2 und H_2/H_2O über die Gasphase verschwindet (Bischofsberger, 2005).

Nicht alle Produkte aus der Acidogenese können direkt von den methanogenen *Archaea* verwertet werden. Sie werden daher in einem dritten Schritt, der Acetogenese, weiter zerlegt. So werden die kurzkettigen Carbonsäuren, Propionsäure und Buttersäure, sowie Milchsäure, Glyzerin und Alkohole durch acetogene Bakterien zu Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff umgesetzt. Die längerkettigen Säuren werden durch ß-Oxidation abgebaut und dabei schrittweise um je zwei C-Atome verkürzt (Grepmeier, 2002). Die acetogenen Bakterien produzieren dabei selbst Wasserstoff, benötigen aber eine niedrige Wasserstoffkonzentration. Sie können daher nur in Symbiose mit wasserstoffverwertenden Mikroorganismen wie Sulfatreduzierern oder methanogenen *Archaea* existieren.

Die methanogenen *Archaea* bilden die letzten Glieder in der Reihe des anaeroben Abbaus. Aus den Produkten der Acidogenese und der Acetogenese bilden sie die zwei Hauptkomponenten des Biogases, Methan und Kohlenstoffdioxid.

2.1.1 Die Versäuerung von Zuckern

Die Versäuerung der Monosaccharide (Glucose) ist leichter als die der Eiweiße und stellt daher in der Regel nicht den limitierenden Schritt dar. Das Spektrum der gebildeten Produkte hängt stark vom pH-Wert und dem Wasserstoffpartialdruck ab. Bei einer Substratlimitierung, d.h. bei einer niedrigen H^+-Ionen-Konzentration, entstehen hauptsächlich Acetat, CO_2 und H_2. Bei einem Substratüberschuss hingegen entstehen, neben CO_2 und H_2, längerkettige flüchtige Fettsäuren, Lactat und Alkohole. Grund dafür ist die Rolle des Wasserstofftransporters NAD^+ beim anaeroben Stoffwechsel. Bei niedrigen H_2-Partialdrücken werden die beim Substrat abgespaltenen H^+-Ionen hauptsächlich auf das NAD^+ übertragen, und es erfolgt danach eine Regeneration (Oxidation) mit H_2-Bildung:

$$NADH + H^+ \rightarrow H_2 + NAD^+ \qquad \Delta G'_0 = +18{,}07 \text{ kJ/mol}$$

Ist der H_2-Partialdruck sehr hoch, verschiebt sich das Gleichgewicht weg von $NAD^+ + H_2$, wodurch das NAD^+ mit in den Gärungsweg einfließt und die Art der Stoffwechselprodukte beeinflusst werden. So entstehen beispielsweise bei der Buttersäuregärung durch Clostridien statt Buttersäure Butanol sowie Aceton und 2-Propanol (Butanol-Aceton-Gärung) (Bischofsberger, 2005). Anders als bei proteinhaltigen Substraten, nimmt der pH-Wert bei der Versäuerung von Zuckern stark ab. So kann bei einem pH-Wert < 5,0 die gelöste Glucose auch in Alkohol (Ethanol) umgewandelt werden.

2.1.2 Die Versäuerung von Aminosäuren

Die Hydrolyse der Eiweiße ist wesentlich komplexer als die der Kohlenhydrate. Dabei spalten extrazelluläre Enzyme (Proteasen) die Stoffe und es entstehen Aminosäuren. Für die Versäuerung werden die gebildeten Dipeptide und Aminosäuren in die Bakterienzellen aufgenommen und dort weiter abgebaut. Der optimale pH-Wert für Hydrolyse und Versäuerung liegt bei 7,0 - 7,5 (Bischofsberger, 2005). Trotz der Bildung von Säuren sinkt der pH-Wert kaum, da bei der Desaminierung alkalisch reagierender Ammoniak entsteht. Neben dem Ammoniak entstehen auch H_2 und CO_2 sowie flüchtige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, i-Buttersäure, i-Valeriansäure, 2-Methylbuttersäure) (ATV-Arbeitsberichte, 1994). Die in die Bakterien aufgenommenen Dipeptide werden zunächst durch Dipeptidasen in ihre zwei Aminosäuren zerlegt. Die einzelnen Aminosäuren werden dann entweder einzeln oder durch eine gekoppelte Oxidations-Reduktions-Reaktion (Stickland-Reaktion) abgebaut.

a) Einzelne Aminosäuren

Einige Aminosäuren können direkt als Energie- und Kohlenstofflieferant für Anaerobier dienen. So wird beispielsweise Alanin von *C. propionicum* über den Acrylat-Weg fermentiert. *Peptostreptococcus micros* baut Glycin über folgenden Weg ab:

$$4\ \text{Glycin} + 2\ H_2O \rightarrow 4\ NH_3 + 2\ CO_2 + 3\ CH_3COOH$$

Dabei werden mehrere Enzyme aktiv: Decarboxylase, Wasserstofftransport-Protein, Lipoamid-Dehydrogenase, eine Transferase und eine Glycinreductase.

Andere Beispiele sind die Fermentation von Glutamat durch obligat anaerobe Bakterien (*C. tetanomorphum*), Aspartat (durch viele fakultativ und einige obligat anaerobe Bakterien) und Threonin (durch *C. propionicum, Peptostreptococcus prevotii*). Arginin wird zu Ornithin, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak durch Vertreter der Clostridien, Streptokokken, Halobakterien, Eubakterien und Mycoplasma fermentiert. Lysin wird durch *C. sticklandii* und *C. subterminale* zu Acetat und Butyrat umgesetzt (Gottschalk, 1986).

b) Stickland-Reaktion

Viele der Clostridien bevorzugen die Versäuerung aus einem Mix von Aminosäuren. Dazu gehören praktisch alle proteolytischen Clostridien, wie zum Beispiel *C. sporogenes*, *C. sticklandii, C. histolyticum* und *C. botulinum*. Für die Oxidation einer Aminosäure, zum Beispiel Alanin, ist ein niedriger H_2-Partialdruck erforderlich. Dieser kann entweder durch Reduktion einer zweiten Aminosäure, zum Beispiel Glycin, oder durch syntrophe Kopplung mit Methanbakterien erreicht werden: (ATV-Arbeitsberichte, 1994)

- Desaminierung und Decarboxylierung von Alanin zu Acetat, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak:
  $\text{Alanin} + 2\ H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + NH_3 + 2\ H_2$

- Reduktive Gycinumsetzung zu Acetat und Ammoniak:
  2 Glycin + 2 H_2 → 2 CH_3COOH + 2 NH_3

- Wasserstoffabbau durch Methanbakterien:
  2 H_2 + 0,5 CO_2 → 0,5 CH_4 + H_2O

Einige Aminosäuren werden bevorzugt als H_2-Donatoren (Leucin, Valin, Histidin), andere als H_2-Akzeptoren (Prolin, Tryptophan, Ornitin) benutzt.

c) Heterozyklische Verbindungen

Verschiedene Vertreter der Clostridien können Purine und Pyrimidine vollständig fermentieren. So kann *C. purinolyticum* aus Purinen die vier Produkte Kohlenstoffdioxid, Ammonium, Acetat und Formiat bilden. Dabei sind Kohlenstoffdioxid und Ammonium, aufgrund des hohen N-Gehalts und der zwei einzelnen C in den Purinen, die zwei Hauptprodukte. Als Zwischenprodukt der Purin-Fermentation entsteht Xanthin (Gottschalk, 1986).

2.2 Die Mikroorganismen des anaeroben Abbaus

2.2.1 Hydrolytische und acidogene Bakterien

Die hydrolysierenden und versäuernden (acidogenen) Bakterien bilden eine sehr heterogene Gruppe des anaeroben Abbaus, zu der sowohl fakultative als auch obligate Anaerobier gehören. Sie tragen dazu bei, dass der Sauerstoffgehalt im Substrat deutlich vermindert wird (Spendlin, 1991). Hydrolysierende und versäuernde Bakterien sind oft dieselben Bakterien. Zuerst wird das Substrat durch ihre extrazellulären Enzyme gespalten, in die Zellen aufgenommen und dort zu organischen Säuren und Alkoholen umgesetzt.

Die acidogenen Bakterien haben eine große pH-Toleranz, so dass das Milieu sehr sauer oder basisch sein kann. Chen et al (2007) beispielsweise untersuchten erfolgreich hydrolysierende/ versäuernde Bakterien bei pH-Werten von 4,0 bis 11,0 beim anaeroben Abbau von Belebtschlamm. Der optimale pH-Wert für die Hydrolyse und Acidogenese liegt im Bereich von 5,2 bis 6,3 (Weiland, 2003).

Die Arten der Gärungen (Propionsäure-, Buttersäure-, Milchsäuregärung) hängen von den Milieubedingungen (Substrat, pH-Wert, Wasserstoffpartialdruck, Temperatur) und den Mikroorganismen der Mischkultur ab (Bischofsberger, 2005). Neben der hohen pH-Wert-Toleranz zeigen sie sich in ihrer Aktivität weniger anfällig gegenüber niedrigen Temperaturen und Temperaturschwankungen als acetogene Bakterien und methanogene *Archaea*. Untersuchungen zum anaeroben Abbau von kommunalem und industriellem Abwasser haben gezeigt, dass bei einer Temperatursenkung von 30 °C bis auf 8 °C die Acidogenese zwar negativ beeinflusst wurde, jedoch weniger stark als die nachfolgenden Reaktionen (Cha und Noike, 1997; Maharaj und Elefsionitis, 2001).

So heterogen wie die Gruppe der acidogenen Bakterien ist, so vielseitig sind auch die Stoffwechselwege dieser Bakterien. Zum Beispiel kann Propionat über verschiedene Wege gebildet werden. *Clostridium propionicum* und *Megasphaera elsdenii* bauen Lactat über den Acrylat-Weg (Acryloyl-CoA-Weg) zu Propionat ab. Propionibakterien und andere Propionat bildende Bakterien hingegen nutzen den Succinat-Propionat-Weg. Andere bilden als Stoffwechselprodukt Acetat, wie *Clostridium aceticum* und *Acetobacterium woodii,* die H_2 und CO_2 zu Acetat fermentieren. *Clostridium formicoaceticum* nutzt den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, um aus Hexose Acetat zu bilden. Das Hauptprodukt von vielen Clostridien, Butyrivibrios und Eubakterien ist Butyrat. Es wird aus Zuckern über Pyruvat, Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA und Butyryl-CoA gebildet. Die Produkte hängen zum Teil stark vom pH-Wert im Reaktor ab. Einige Clostridien, wie beispielsweise *C. acetobutylicum*, bilden bei pH-Werten < 4,5 Aceton und Butanol, statt Butyrat. (Gottschalk, 1986)

Zu den hydrolytischen/acidogenen Bakterien gehören Vertreter der Gattungen *Bacillus, Pseudomonas, Clostridium, Micrococcus, Bacteroides, Peptococcus, Bifidobacterium*, *Staphylococcus* und *Alcaligenes* (Kunst und Mudrack, 1993). Kim et al. (2011) fanden Vertreter von *Aeromonas spp*. und *Clostridium sticklandii* in allen untersuchten Reaktoren, unabhängig von der Art des Substrates.

Bei Meisgeier (2007) werden Generationszeiten abhängig vom Substrat angegeben. Danach liegen diese beim Abbau von Kohlenhydraten bei 1 - 24 h, von Eiweißen bei 12 - 36 h und für Fette (Faulschlamm) als Substrat bei bis zu 48 h. Andere Angaben (Weiland, 2003) liegen bei < 24 h für *Bacteroides* und 24 - 36 h für *Clostridia*.

2.2.2 Acetogene Bakterien

Die syntrophen bzw. acetogenen Bakterien sind strikt anaerob und schwer als Reinkulturen zu kultivieren. Sie wandeln Carbonsäuren (C3-C6) und langkettige Fettsäuren in Acetat, CO_2 und H_2 um und machen sie so zugänglich für die methanogenen *Archaea*. Syntrophe Bakterien und methanogene *Archaea* leben in enger räumlicher Nähe und Symbiose zusammen. Zum einen verbrauchen die methanogenen *Archaea* den in der Acetogenese gebildeten Wasserstoff, der in größeren Konzentrationen schädlich für die syntrophen Bakterien ist und diese hemmt. Zum anderen sind die meisten Reaktionen der syntrophen Bakterien endergon, d.h. sie müssen mehr Energie zuführen als sie gewinnen. Gewonnen wird Energie erst aus der nachfolgenden, wasserstoffverwertenden Reaktion. Die methanogenen *Archaea* geben dann Energie aus der Methanbildungsreaktion an ihre syntrophen, symbiotischen Partner ab. So laufen beispielsweise bei der Symbiose eines Buttersäure abbauenden, acetogenen Bakteriums (*Syntrophomonas wolfei*) in Cokultur mit *Methanospirillum hungatii* folgende Reaktionen ab (Bischofsberger, 2005):

$$CH_3(CH_2)_2COOH + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CH_3COOH + 2\ H_2 \qquad \Delta G'_0 = +\ 48{,}2\ kJ/mol$$

$$4\ H_2 + H_2CO_3 \rightarrow CH_4 + 3\ H_2O \qquad \Delta G'_0 = -\ 33{,}9\ kJ/mol$$

Weitere Reaktionen der Acetogenese sind:

Propionsäure-Abbau:

$CH_3CH_2COOH + 2\ H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3\ H_2$ $\Delta G'_0 = + 76{,}0$ kJ/mol

Isovaleriansäure-Abbau:

$CH_3CH(CH_3)CH_2COOH + CO_2 + 2\ H_2O \rightarrow 3\ CH_3COOH + H_2$

$\Delta G'_0 = + 25{,}2$ kJ/ mol

Ethanol-Abbau:

$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2$ $\Delta G'_0 = + 9{,}6$ kJ/ mol

Essigsäure-Abbau:

$CH_3COOH + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CO_2 + 4\ H_2$ $\Delta G'_0 = + 94{,}9$ kJ/mol

Die Gesamtreaktionen können nur exergon ablaufen, wenn der Wasserstoffpartialdruck bei 10^{-4} atm oder niedriger liegt. Dies ist abhängig vom Substrat. So kann Ethanol noch bei einem Wasserstoffpartialdruck von 10^{-2} atm exergon vergoren werden, wohingegen Propionat bei 10^{-4} atm nicht mehr thermodynamisch günstig umgesetzt werden kann (Bischofsberger, 2005). Die acetogenen Bakterien leben an der Grenze thermodynamisch möglicher Energiegewinnung (Schink, 1997) und wachsen daher nur langsam. Typische Generationszeiten acetogener Bakterien liegen bei 80 - 90 h (Weiland, 2003; Bischofberger, 2005). Meisgeier (2007) geben Generationszeiten für verschiedene acetogene Bakterien, in Abhängigkeit des jeweils umgesetzten Substrates an (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Generationszeiten verschiedener acetogener Bakterien in Abhängigkeit vom Substrat (Meisgeier, 2007)

Substrat	Generationszeit
Methanol und Essigsäure	9 – 12 h
Milchsäure	12 – 18 h
Buttersäure	60 – 80 h
Propionsäure	60 – 120 h
Fettsäuren	2 – 10 d

Zu den syntrophen Bakterien gehören Arten der Gattungen *Acetobacterium* wie *A. woodii*, *Clostridium* (*C. aceticum*), *Syntrophomonas* (*S. wolfei*), *Syntrophobacter* (*S. wolinii*) und *Desulfovibrio* (*D. vulgaris*) (Schink, 1997)

2.2.3 Methanogene *Archaea*

Die methanogenen *Archaea* bilden die letzte Gruppe des anaeroben Abbaus und sind strikt anaerob. Sie werden in sechs Ordnungen unterteilt: *Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanocellales, Methanosarcinales* und *Methanopyrales* (NCBI Taxonomy). Aufgrund der Substrate, die sie verwerten, können diese zwei Gruppen zugeordnet werden. Die hydrogenotrophen Methanogenen verwerten Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, viele Vertreter verwerten auch Formiat und Sekundäralkohole. Dazu gehören die *Methanobacteriales, Methanococcales* und *Methanomicrobiales*. Die zweite Gruppe bilden die acetoklastischen Methanogenen. Sie können neben Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff auch Acetat als Substrat nutzen. Als einzige sind dazu – soweit bisher bekannt – nur die zwei Gattungen *Methanosaeta spp*. und *Methanosarcina spp*. fähig. Letztere besitzen das größte Substratspektrum von allen bisher bekannten Methanbildnern. Sie können neben den bereits genannten Substraten auch verschiedene Methylverbindungen (-amine, -thiole) sowie CO umsetzen (Schlegel, 1992). Allerdings können die Vertreter der *Methanosarcinales* kein Formiat nutzen.

Es gibt drei prinzipielle Stoffwechselwege in der Methanogenese (Gottschalk, 1986):

Kohlenstoffdioxid-Typen

$CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$ $\quad \Delta G'_0 = -136{,}0$ kJ/mol CH_4

$4\ HCOOH \rightarrow CH_4 + 3\ CO_2 + 2\ H_2O$ $\quad \Delta G'_0 = -144{,}2$ kJ/mol CH_4

Methylverbindungen

$4\ CH_3OH \rightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O$ $\quad \Delta G'_0 = -106{,}5$ kJ/mol CH_4

Acetat (Essigsäure)

$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ $\quad \Delta G'_0 = -37$ kJ/mol CH_4

Die aus der Umsetzung von Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und Formiat nutzbare Energie ist wesentlich höher als die aus Acetat. Dies zeigt sich unter anderem in der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen methanogenen *Archaea* (Tabelle 2-2).

Mit den Genrationszeiten von 5 - 15 Tagen liegen die methanogenen *Archaea* weit über den hydrolysierenden/acidogenen Bakterien und werden bei zu geringen Schlammverweilzeiten aus dem Reaktor ausgewaschen.

Die methanogenen *Archaea* reagieren sehr sensitiv auf Temperatur- und pH-Wert-Änderungen. Ihre Temperaturoptima befinden sich einmal im thermophilen Bereich bei 50 °C - 55 °C oder im mesophilen bei 35 °C - 38 °C. Sie sind aber auch außerhalb dieser Bereiche aktiv. So konnten McKeown et al. (2009) aktive Methanogene noch bis 5 °C nachweisen. Abhängig von der Temperatur, wird das Methan entweder bevorzugt aus Acetat oder aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet. Conrad (1999) fanden heraus, dass bei 30 °C

etwa 70 % des gebildeten Methans aus Acetat und nur 30 % aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff stammen. Bei 10 °C verschiebt sich dies sogar hin zu 85 % aus Acetat (Conrad, 2002). Andere Gruppen (Connaughton et al. , 2006; Peng et al, 2008) hingegen berichten aus der Abwasserreinigung bei niedrigen Temperaturen (< 20 °C), dass eine erhöhte Aktivität der hydrogenotrophen gegenüber den acetoklastischen Methanogenen zu verzeichnen ist.

Tabelle 2-2: Wachtsumsgeschwindigkeit der verschiedenen methanogenen *Archaea* (Jetten et al., 1991)

Methanogene *Archaea*	**Wachstumsgeschwindigkeit**
Acetoklastische Methanogene	
Methanosarcina	0,3 d^{-1}
Methanosaeta	0,1 d^{-1}
Hydrogenotrophe Methanogene	
Methanobrevibacter arboriphilus	1,4 d^{-1}

Auch die Substratzusammensetzung und die Stabilität beeinflussen die Population der Methanogenen in anaeroben Reaktoren. So ist *Methanosaeta* dominant, wenn wenig Acetat (< 400 mg/l) im Reaktor vorhanden ist. *Methanosarcina* findet sich besonders häufig bei hohen Acetatkonzentrationen (Jetten et al., 1992).

Das pH-Wert-Optimum der methanogenen *Archaea* liegt bei etwa 6,6 - 7,6 (Hauer, 1993).

2.3 Einflussfaktoren auf die anaeroben biologischen Abbauvorgänge

2.3.1 Einfluss von Ammonium und Schwefelwasserstoff

Ammonium (NH_4^+) und Schwefelwasserstoff (H_2S) sind essentielle Bausteine für das Wachstum und die Aktivität der anaeroben Mikroorganismen. Sie entstehen vor allem bei der Hydrolyse von Eiweißen bzw. der Fermentation von Aminosäuren. In ihrer undissoziierten Form wirken sie ab bestimmten Konzentrationen toxisch auf die Mikroorganismenzellen und können diese in ihrer Aktivität hemmen oder gar zu deren Absterben führen. Das Gleichgewicht von NH_4^+/ NH_3 und HS^-/ H_2S ist vom pH-Wert, aber auch von der Temperatur abhängig. Abbildung 2-2 zeigt die Verschiebungen der undissozierten Formen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Mit steigendem pH-Wert steigt der Ammoniakanteil in der Flüssigphase. Während bei pH 6,0 fast ausschließlich Ammonium vorkommt, liegt der Anteil des freien Ammoniaks bei pH 8,0 schon bei fast 10 % (siehe Abbildung 2-3).

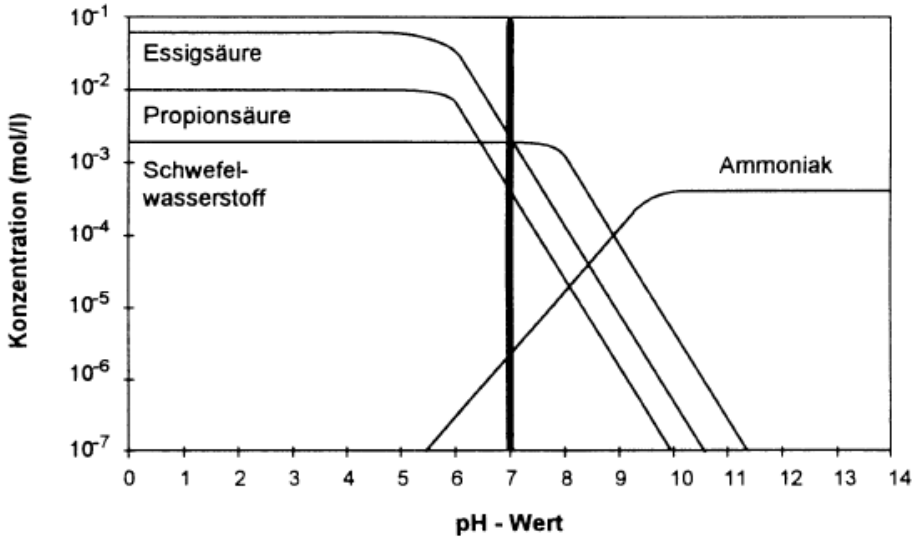

Abbildung 2-2: Verschiebung der Konzentrationen von undissoziierten Substraten und Hemmstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert [Grepmeier, 2002]

Mit ansteigender Temperatur im Fermenter kommt es ebenfalls zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des Ammoniaks, allerdings ist der Einfluss geringer als der des pH-Wertes (Yu und Fang, 2003).

In der Literatur werden sehr verschiedene Hemmkonzentrationen für das freie Ammoniak angegeben, was wohl in der Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur begründet ist.

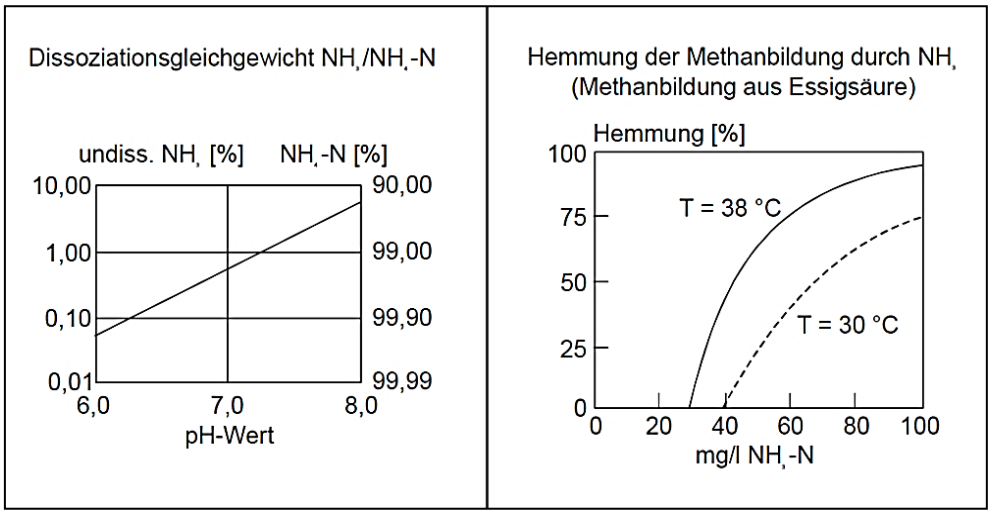

Abbildung 2-3: pH-Wert-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht NH_3/ NH_4-N (links) und temperaturabhängige Hemmung der Methanbildung durch NH_3 (rechts) [Weiland, 2003]

Für ein nicht an hohe Sickstoffgehalte angepasstes Vergärungssystem liegt die Hemmkonzentration offenbar im Bereich 80 - 250 mg/l für freies Ammoniak bzw. 1,7 - 4 g/l für die Gesamtkonzentration an Ammonium und Ammoniak. Angepasste Mikroorganismenpopu-

lationen in Biogassystemen können laut Meisgeier (2007) bis 8 g NH_4^+/l stabil arbeiten. Calli et al. (2005) geben 6 (bis 12) g NH_4^+/l bzw. 0,8 - 1,1 g NH_3 /l an.

Die Hemmung kann in verschiedenen Stadien im Biogasprozess auftreten. Häufig wurde eine Beeinträchtigung vor allem der acetoklastischen Methanogenese beschrieben, anderen Berichten zufolge war insbesondere die Acetogenese betroffen. Bauer et al. (2009) weist darauf hin, dass auch die Hydrolyse/Acidogenese durch Ammoniak gehemmt werden kann.

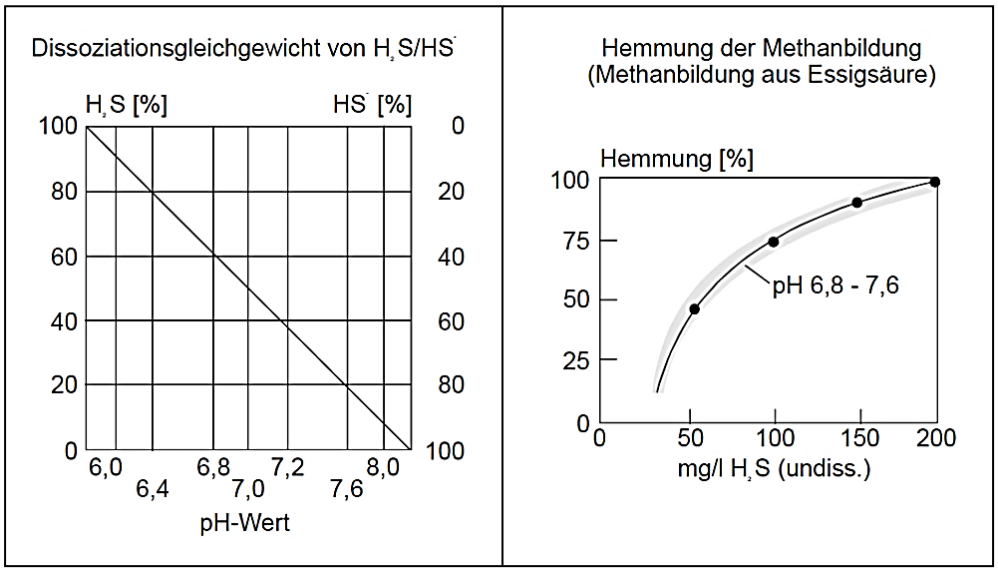

Abbildung 2-4: pH-Wert-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht H_2S/ HS^- (links) und temperaturabhängige Hemmung der Methanbildung durch H_2S (rechts) [Weiland, 2003; Kroiss, 1985]

Anders als beim Gleichgewicht von Ammoniak zum gelösten Ammonium steigt mit sinkendem pH-Wert der Anteil an freiem H_2S gegenüber den gelösten Sulfiden (S^{2-}, HS^-) (siehe Abbildung 2-4). Bei pH 6,0 liegt das H_2S zu 90 % undissoziert vor und kann je nach Menge toxisch wirken.

Freies Sulfid fällt Schwermetalle und damit auch Spurenelemente aus. Dadurch kann es zu einem Mangel an Mikronährstoffen kommen und eine Hemmung, vor allem der Methanogenese, auslösen. Nach Kroiss (1985) (Abbildung 2-4) beginnt eine Hemmung bei 25 - 50 mg H_2S/l, abhängig von der Temperatur. Ab einer Hemmung von 50 % ist eine stabile Methanbildung kaum noch zu erreichen, weil dann bei den methanogenen *Archaea* die Wachstumsrate fast der Sterberate entspricht.

2.3.2 Einfluss des Wasserstoffpartialdrucks

Wie schon in Abschnitt 2.1 beschrieben, spielt der Wasserstoff bei den anaeroben Abbauvorgängen eine wichtige Rolle. Der Einfluss des Wasserstoffpartialdrucks auf die einzelnen Mikroorganismengruppen ist dabei sehr unterschiedlich. Die meisten versäuernden Bakterien

werden durch einen hohen Wasserstoffpartialdruck zwar nicht in ihrem Wachstum behindert, aber es ändert sich die Zusammensetzung der Ausscheidungsprodukte. Anders verhält sich dies bei den wasserstoffproduzierenden acetogenen Bakterien. Diese können durch einen hohen Wasserstoffpartialdruck gehemmt werden. Sie sind daher auf die wasserstoffverbrauchenden methanogenen *Archaea* angewiesen. Diese sind auch gegenüber höheren Konzentrationen an Wasserstoff nicht empfindlich. (Schlegel, 1992)

2.3.3 Einfluss von Temperatur und Verweilzeit

Da es sich bei den anaeroben Vorgängen um biochemische Prozesse handelt, sind diese in hohem Maße von der Temperatur abhängig. Es gibt drei Temperaturbereiche, denen die Mikroorganismen über ihr Temperaturoptimum zugeordnet werden (Besgen und Kempkens, 2004):

- Psychrophile Biozönose (< 25°C)
- Mesophile Biozönose (30-45°C)
- Thermophile Biozönose (45-60°C)

Diese Unterteilung wird hauptsächlich auf die acetogenen Bakterien und die methanogenen *Archaea* angewendet. Die Arbeitsgruppe um O'Flaherty fand bei der anaeroben Reinigung von verschiedenen Abwässern zwar psychrotolerante Methanogene, aber noch keine psychrophilen (Connaughton et al., 2006; McKeown et al., 2009). Die versäuernden Bakterien sind temperaturunempfindlicher und ihr Temperaturoptimum liegt laut Grepmeier (2002) bei etwa 30 °C. Maharaj und Elefsiniotis (2001) geben, abhängig von der Abwasserzusammensetzung, 22 °C oder 30 °C als optimale Temperatur an. Leben die Mikroorganismen außerhalb ihres Optimums, so verringert sich ihre Aktivität und damit auch der Substratumsatz bzw. die Produktivität. Sind die Temperaturen zu niedrig oder zu hoch, kann die Aktivität vollständig eingestellt werden und bis zum Tod der Mikroorganismen führen. Bei langsamen Änderungen erfolgt meist eine Adaption an die veränderten Temperaturverhältnisse. Ein schneller Wechsel hingegen beeinträchtigt alle anaeroben Mikroorganismen, zumindest kurzzeitig, sehr stark (Che und Noike, 1997). Wie schnell ein Temperaturwechsel stattfindet und bei welchen Temperaturen, beeinflusst auch die Reaktion der Mikroorganismen auf einen Verweilzeitwechsel. Liegt die Temperatur außerhalb ihres Optimums, können sie sich schwerer anpassen. So kommt es zur Verringerung der Abbaurate vom Substrat oder gar Verschwinden von Mikroorganismen aus dem System durch Auswaschen. Untersuchungen von Cha und Noike (1997) zeigen, dass bei niedrigen Temperaturen und kurzen Verweilzeiten die Biozönose besonders stark beeinträchtigt wurde, wenn die Temperatur schnell von 30 °C auf 15 °C gesenkt und die Verweilzeit von 48 h auf 6 h reduziert wird. Sowohl die Temperatur als auch die Verweilzeit beeinflussen also nicht nur die Art der Stoffwechselprodukte und die Aktivität der Mikroorganismen, sondern auch die Zusammensetzung der Biozönose im Reaktor. In offenen Reaktorsystemen können die Mikroorganismen nur verbleiben, wenn ihre Generationszeit kürzer ist als die Verweilzeit. Diese wird in zwei Arten unterschieden. Die hydraulische Verweilzeit

(HRT) gibt die mittlere Verweilzeit der Flüssigphase im Reaktorsystem an. Die Schlammverweilzeit (SRT) beschreibt die mittlere Verweilzeit von Feststoffpartikeln und damit auch Mikroorganismen in einem System. Für offene Systeme gilt HRT gleich SRT. Gibt es eine Schlammrückhaltung (z.B. Membranen) oder sind die Mikroorganismen auf Trägern im Reaktor fixiert (z.B. Festbettreaktor), dann können HRT und SRT unabhängig voneinander eingestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass beispielsweise langsam wachsende Bakterien zurück gehalten werden können und gleichzeitig hohe Durchsatzraten vom Substrat (Abwasser) gefahren werden. Auf diese Weise können hohe Produktions- bzw. Abbauraten erreicht werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Der Blick in die „Blackbox“ des komplexen, anaeroben Abbauprozesses ist mit konventionellen Methoden, wie Aktivitätstests und der Most Probable Number (MPN)-Methode, nur begrenzt möglich. Zwar können dabei Informationen zu einzelnen Organismen gewonnen werden, aber über die komplexen syntrophen und symbiotischen Beziehungen geben sie keinen Aufschluss. Zudem ist nur ein kleiner Teil der Mikroorganismen überhaupt als Reinkultur im Labor kultivierbar. Ab den 1990er Jahren entwickelten sich verschiedene molekularbiologische Methoden, mit denen es möglich ist, Mikroorganismen *in situ* zu untersuchen und nicht-kultivierbare Mikroorganismen zu identifizieren und quantifizieren (Hobson et al., 1994; Amann et al., 1995; Muyzer und Smalla, 1998). Viele der Techniken beruhen auf der Amplifizierung von DNS/ RNS über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (z.B. 16S rRNS Klonierung, DGGE, T-RFLP). Dabei werden zuerst die Nukleinsäuren aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert und in mehreren Schritten mit Primern amplifiziert. Eine weit verbreitete Methode ist die Amplifizierung und Klonierung der 16S rRNS, gefolgt von der Sequenzierung und Identifizierung der Mikroorganismen über Datenbanken (Sanz und Köchling, 2007). Damit können sehr präzise taxonomische Studien und phylogenetische Stammbäume erzielt werden. Die Klonierung ist allerdings sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Im Vergleich dazu ist die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), bei der eine Auftrennung denaturierter PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese erfolgt, eine schnelle und einfache Methode, um einen Überblick über die dominanten Spezies eines Systems zu erhalten. Die zu trennenden DNS- oder RNS-Fragmente haben alle die gleiche Größe, aber unterschiedliche Nukleotid-Sequenzen, wodurch sie verschieden schnell durch das Gel wandern. Die Anzahl der Banden entspricht der Anzahl der dominanten Spezies (Sanz und Köchling, 2007). Über die Position im Gel können die Banden mittels Datenbanken oder anhand der Banden von Reinkulturen zugeordnet werden. Änderungen von Populationen können mit dieser Methode gut sichtbar gemacht werden.

Bei der terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP)-Methode wird die Amplifizierung mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt. Im Anschluss werden die PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme in Fragmente zerlegt. Es werden dann nur die fluoreszenzmarkierten Fragmente sequenziert und mit Gendatenbanken (z.B. Greengenes, RDP,

Silva) verglichen, um so die Organismen in der Probe zu identifizieren (Liu et al., 1997; Cardenas und Tiedje, 2008). Der größte Vorteil dieser Methode liegt im Gebrauch eines automatischen Sequenzers, der reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Der Nachteil all der genannten, PCR-basierten Methoden ist die fehlende Möglichkeit der Quantifizierung der Organismen, da stets nur mit undefinierter Anzahl an DNS/RNS-Stücken gearbeitet wird. Zudem werden nicht alle DNS/RNS-Stücke gleich gut amplifiziert oder liegen in sehr geringer Ausgangskonzentration vor. Dadurch fallen sie bei der Sequenzierung raus und es ist keine Identifizierung dieser Mikroorganismen möglich (Sanz und Köchling, 2007). Ein Ausnahme bildet die real-time bzw. quantitative PCR. Auch hier sind die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Anders als bei anderen PCR-Methoden wird in jedem Lauf die Fluoreszenz in „Echtzeit“ gemessen. Daraus kann auf die Menge der amplifizierten DNS / RNS geschlossen und eine Quantifizierung als Kopienzahl pro Reaktion erreicht werden. Sie ist also keine direkte Nachweismethode für Mikroorganismen, da die Anzahl an DNS / RNS-Stücken im Genom und auch die Anzahl der Genome pro Zelle sehr unterschiedlich sind (Nielsen et al., 2009).

Die bisher einzige Methode der direkten Quantifizierung von Zellen, ist die Ganzzellhybridisierung bzw. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Bei der FISH werden an die rRNS in den Zellen spezifische fluoreszenzmarkierte Oligosonden gebunden. Je aktiver die Zellen sind, desto mehr rRNS ist vorhanden, woran die Oligosonden binden können. Die Zellen leuchten dann umso intensiver (Manz et al., 1993) unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abschnitt 3.5). Auf diese Weise können die Zellen einzeln ausgezählt oder mittels Auswertungssoftware quantifiziert werden. Dabei werden normalerweise einzelne Spezies, Familien, Ordnungen etc., bezogen auf die Gesamtzahl der markierten Zellen, quantifiziert. Eine Methode zur absoluten Zellzahlbestimmung (als Zellzahl pro ml) haben Daims et al. (2001) beschrieben. Dabei werden die Proben mit bekannten Mengen an *E. coli*-Zellen versetzt, die als interner Standard dienen. Die Methode liefert gute Ergebnisse, wenn die mit Oligosonden markierte Population morphologisch homogen ist.

Zu Beginn wurde die FISH-Methode in Biofilmen und Reinkulturen angewendet (DeLong et al., 1989; Poulsen et al., 1993). Danach wurde diese in komplexeren Systemen, wie beim Nachweis von planktonischen Bakterien und in der aeroben Abwasserreinigung, etabliert (DeLong et al., 1999; Manz et al., 1994). Seit ein paar Jahren wird diese Technik nun auch in der anaeroben Abwasserreinigung und landwirtschaftlichen Biogasanlagen eingesetzt, um die Prozesse besser verstehen und steuern zu können (Whiteley und Bailey, 2000; Ariesyady et al., 2007; Xia et al. 2012). Die besondere Herausforderung besteht dabei in den hohen Feststoffgehalten. Das Substrat besitzt zum Teil eine sehr starke Autofluoreszenz und die Mikroorganismen haften daran, was die eigentliche Analyse erschwert (Vesey et al., 1997; Weber, 2000). Auch der Nachweis und die Quantifizierung der methanogenen *Archaea* sind nicht immer einfach. Sie zeigen ebenfalls eine Autofluoreszenz im grünen Bereich und haben zum Teil sehr schwer permeabilisierbare Zellwände, so dass die Oligosonden nicht in die Zellen eindringen und binden können (Sorensen et al., 1997).

Die Oligosonden für die FISH werden anhand von Daten aus 16S rRNS Klon-Bibliotheken entwickelt. Je umfangreicher diese Datenbanken sind, desto mehr Sonden können entwickelt werden, mit deren Hilfe dann Informationen über die Zusammensetzung von Populationen gewonnen werden können. Die Verbesserung der Fluoreszenzfarbstoffe hat es möglich gemacht, von den Reinkulturen hin zu komplexen Systemen zu gehen. Mit intensiver leuchtenden Farbstoffen (z.B. Cy3, Cy5) oder doppeltmarkierten Oligosonden ist es möglich, auch geringe Konzentrationen an Zellen oder Einzelzellen nachweisen zu können (Wessendorf und Brelje, 1992; DeLong et al., 1999). Die verbesserten Farbstoffe in Kombination mit der Epifluoreszenzmikroskopie liefern gute Bilder für Proben mit geringer Autofluoreszenz. Für die Untersuchung von Biofilmen oder Schlammflocken ist die konofokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) weit besser geeignet. Sie zeichnet sich durch eine höhere optische Auflösung aus und hebt so die Zellen vor dem autofluoreszierenden Hintergrund deutlicher hervor. Dabei rastert ein fokussierter Laserstrahl das Präparat ab und erzeugt so sehr scharfe Bilder der fluoreszierenden Zellen, während das Licht aus anderen Bereichen (Hintergrund) durch eine Lochblende im Strahlengang blockiert wird.

Gute mikroskopische Bilder sind die Voraussetzung für eine gute Auswertung der Ergebnisse. In den letzten Jahren wird die Auszählung der einzelnen Zellen unter dem Mikroskop immer mehr durch die Bildauswertung mittels Softwaremethoden (z.B. daime, ImageJ) abgelöst (Oda et al., 2000; Daims et al., 2001). Diese sind zwar bisher nur semi-automatisch, bieten aber trotzdem eine enorme Zeitersparnis, vor allem bei einer großen Probenanzahl.

Über die Leuchtintensität der markierten Zellen lassen sich zwar grobe Rückschlüsse auf die Aktivität der Zellen ziehen, aber es ist nicht möglich, die Stoffwechselaktivitäten oder -wege genauer zu betrachten.

Einen anderen Weg, die komplexen anaeroben Mischpopulationen zu untersuchen, bietet die Metaproteomanalyse (siehe Abschnitt 3.6). Dabei werden die Proteine der komplexen Mischkulturen identifiziert und teilweise sogar quantifiziert (Belnap et al., 2011). Die identifizierten Proteine werden Funktionen zugeordnet und geben so Aufschluss über die Aktivität und Interaktionen der Mikroorganismen. Im Gegensatz zu PCR-basierten Methoden oder FISH, können auch physiologische Reaktionen der Mikroorganismen auf veränderte Umweltbedingungen frühzeitig erkannt werden (Heyer et al., 2013). Mit Hilfe von Datenbankanalysen besteht zudem die Möglichkeit der Identifizierung der aktiven Mikroorganismen über deren Homologie zu anderen Spezies. Die erfolgreiche Identifizierung der Proteine aus komplexen Systemen mit vielen verschiedenen Mikroorganismen hängt sehr stark von der Menge an Metagenomdaten in den vorhandenen Datenbanken ab.

Die Metaproteomanalyse wurde schon sehr erfolgreich bei Mikroorganismen im Ozean (Kan et al., 2005; Sowell et al., 2009), in Biofilmen von sauren Sickerwässern (Ram et al., 2005) sowie bei Untersuchungen zur Reinigung von kontaminierten Böden und Grundwasser (Benndorf et al., 2007; Wilkins et al., 2009) angewendet. Auch in landwirtschaftlichen Biogasanlagen konnten positive Ergebnisse erzielt werden (Hanreich et al., 2013; Heyer et al., 2013). Im Abwasserbereich gibt es Untersuchungen von Belebtschlammbakterien für die

Phosphor-Rückgewinnung (Park et al., 2008; Wilmes und Bond, 2004). Die bisher einzige Veröffentlichung von Metaproteomergebnissen in der anaeroben Abwasserreinigung stammen von der Arbeitsgruppe um O'Flaherty (Abram et al., 2011; O'Reilly et al., 2010). Die Proben wurden nach 300 Tagen Laufzeit aus einem 3,5 L-Laborreaktor entnommen, der mit synthetischem, Glucose-basiertem Abwasser bei 15 °C betrieben wurde.

Durch Kombination von PCR-basierten oder FISH-Methoden mit der Metaproteomanalyse, kann eine Verbindung zwischen individuellen, mikrobiellen Spezies und deren Funktion hergestellt werden. Das Wissen über diese komplexen Gemeinschaften kann auf diese Weise erweitert werden und zukünftig der Steuerung und Regelung von biologischen Systemen dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Fermentationsversuche

3.1.1 Versuchsaufbau und Probenahme

Für die Fermentationsversuche wurden doppelwandige 1 Liter-Glasreaktoren verwendet (Gaßner Glastechnik GmbH, München). Das Fließschema sowie ein Foto eines Reaktors sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

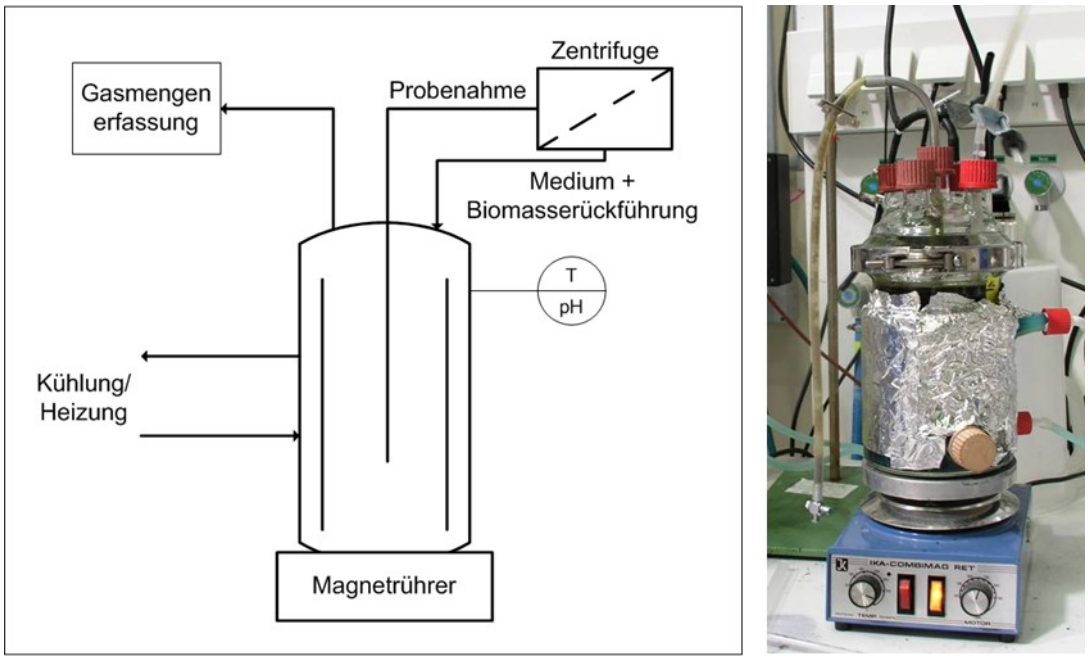

Abbildung 3-1: Schema und Foto eines verwendeten 1L-Glasreaktors

Die Durchmischung (200 U/min ± 20 U/min) erfolgte mittels Magnetrührern (IKA-Werke GmbH & Co. KG) und Magnetrührstäbchen. Über Anschlüsse im Deckel der Reaktoren wurden die Proben entnommen und das Substrat zugeführt. Die Biomasserückhaltung erfolgte durch die Entnahme und Zentrifugation von Schlamm mit anschließender Rückführung der Schlammpellets in den jeweiligen Reaktor. Die gebildete Biogasmenge wurde mittels Glaszylinder erfasst. Der Gasschlauch führte vom Reaktorkopf in den umgestülpten Glaszylinder, der mit Sperrflüssigkeit (3,5 M Natriumchloridlösung, 5 g/l Zitronensäure in VE-Wasser) gefüllt war. Das einströmende Gas hat die Sperrflüssigkeit verdrängt und so konnte die Menge Biogas pro Tag ermittelt werden. Teilweise waren die Reaktoren mit online pH-Messsonden ausgestattet. Zusätzlich wurden in allen Proben täglich der pH-Wert und die Temperatur gemessen.

3.1.2 Versuchsdurchführung

In Abbildung 3-2 ist eine Übersicht von der Auswahl des Inokulums bis zu den Fermentationsversuchen in den 1 Liter-Glasreaktoren dargestellt.

Um ein breites Spektrum an anaeroben Mikroorganismen für die Versuche bereitstellen zu können, wurden fünf verschiedene Klärschlämme ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.4). Diese wurden in einem 40 Liter-Anaerobreaktor gemischt und bei 20 °C betrieben. In diesem erfolgte die Adaption der Mikroorganismen an die Betriebstemperatur und das synthetische Substrat (OECD-Medium, Abschnitt 3.1.3). Der adaptierte Schlamm diente dann als Inokulum für die Fermentationsversuche in den 1 Liter-Glasreaktoren.

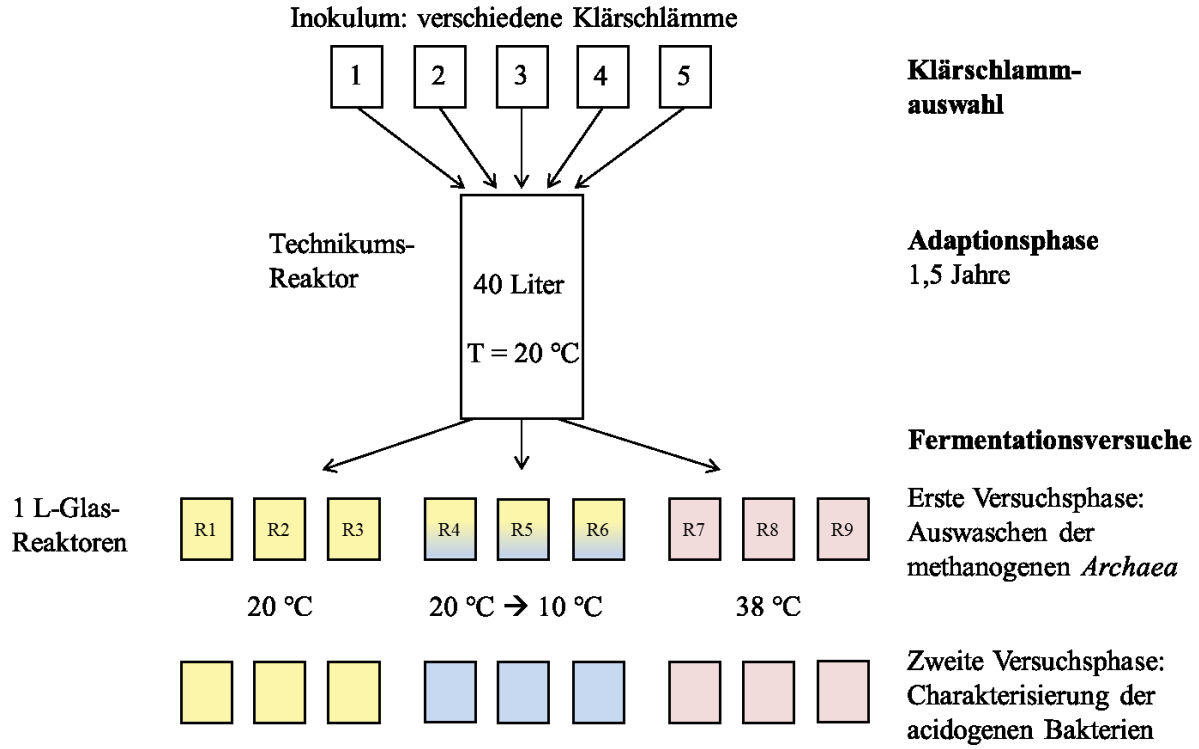

Abbildung 3-2: Schema der verschiedenen Fermentationsversuche

Die Fermentationsversuche in den 1 L-Reaktoren wurden bei Betriebstemperaturen von 10 °C, 20 °C und 38 °C durchgeführt, wobei für jede Betriebstemperatur drei Reaktoren parallel betrieben wurden. Die Reaktoren R1 - R6 wurden mit 20 °C gestartet, wobei R4 - R6 nach kurzen Adaptionsphasen schrittweise erst auf 15 °C und schließlich auf 10 °C abgekühlt wurden. Die Reaktoren R7 - R9 konnten direkt mit einer Betriebstemperatur von 38 °C gestartet werden, da hier keine Adaptionsphase notwendig war. In dieser ersten Versuchsphase lag der Fokus auf dem Einfluss von Temperatur und Schlammverweilzeit (SRT) auf die methanogenen *Archaea*. Diese sollten am Ende alle ausgewaschen oder inaktiviert sein, um in der zweiten Versuchsphase die versäuernden Bakterien und deren Stoffwechselprodukte genauer untersuchen zu können.

Als Substrat für die Reaktoren wurde ein synthetisches Abwasser mit definierter Zusammensetzung (siehe Tabelle 3-2) verwendet. Der CSB des zugeführten Substrates lag bei 5.000 mg/l. Es wurde täglich frisch hergestellt und je Reaktor 400 ml des 10-fach konzentrierten Mediums zugeführt. Das entspricht einer hydraulischen Verweilzeit in den Reaktoren von 2,5 d und einer CSB-Raumbelastung von 2 g / (l*d). Die hydraulische Verweilzeit (HRT) wurde über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten. Die Schlammverweilzeit (SRT) hingegen wurde, wie in Tabelle 3-1 dargestellt, variiert.

Da die hydraulische Verweilzeit fast über den gesamten Fermentationszeitraum niedriger als die Schlammverweilzeit war, wurden zweimal täglich je 200 ml Schlamm aus jedem Reaktor entnommen. Davon wurde die entsprechende Menge für die einzustellende Schlammverweilzeit verworfen und der Rest zentrifugiert (22.000 x g, 10 - 30 min, RT) (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter GmbH). Der zellfreie Überstand wurde dann ebenfalls verworfen und die Schlammpellets in je 200 ml Medium gelöst und zurück in die Reaktoren gegeben.

Tabelle 3-1: Schlammverweilzeiten der Fermentationsversuche in den 1 L-Glasreaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

10 °C	20 °C	38 °C
–	14 d	–
12 d	12 d	12 d
10 d	10 d	–
8 d	8 d	8 d
6 d	6 d	–
4 d	4 d	4 d
2 d	2 d	–
1 d	1 d	1 d

Während der ersten und zweiten Versuchsphase wurden die Schlämme der einzelnen Reaktoren hinsichtlich verschiedener chemisch-physikalischen Parameter (pH-Wert, T, CSB, Biogasmenge, Biogaszusammensetzung) untersucht. Zur mikrobiologischen Charakterisierung der Reaktorschlämme wurden mikrobiologische und molekularbiologische Methoden eingesetzt.

3.1.3 Synthetisches Substrat

Als Substrat für die Fermentationen wurde OECD-Medium, ein synthetisches Abwasser (nach DIN 38 412 - L24, Tabelle 3-2), eingesetzt. Es hatte den Vorteil, dass es je nach gebrauchter Menge hergestellt werden konnte und stets eine nahezu gleiche Zusammensetzung besaß. Es war frei von Feststoffen, da alle Substanzen gelöst vorlagen. Dadurch sollte der Anteil störender Feststoffe in den Reaktoren gesenkt werden, um die Mikroorganismen besser untersuchen zu können.

Aufgrund der Handhabung wurde zunächst ein 100-fach konzentriertes OECD-Medium hergestellt und vor Gebrauch mit Leitungswasser auf die 10-fache Konzentration verdünnt (analytische Daten siehe Tabelle 3-3). Dem verdünnten Medium wurde noch Glucose (1,87 g/l) als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle zugemischt. Der CSB dieses Mediums lag 5.000 mg/l.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des OECD-Mediums einfach konzentriert nach DIN 38 412 – L24

Substanz	Menge [mg/l]
Pepton aus Casein, prankreatisch	160
Fleischextrakt	110
Harnstoff	30
Dikaliumhydrogenphosphat	28
Natriumchlorid	7
Calciumchlorid-Dihydrat	4
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2

Tabelle 3-3: Analytische Daten des synthetischen Abwassers (einfach konzentriertes OECD-Medium, ohne Glucose)

Parameter	[mg/l]
pH-Wert	7,1 [-]
CSB	325
BSB_5	293
TC	108,9
IC	4,9
TOC	104
N_{ges}	28,5
NH_4^+-N	1,9
NO_3-N	<0,23
NO_2-N	<0,015
PO_4-P	6,2

3.1.4 Inokulum

Als Inokulum für die Versuche in den 1 Liter-Glasreaktoren wurde eine Mischung aus Schlämmen verschiedener kommunaler Kläranlagen und Technikumsanlagen zusammengestellt (siehe Tabelle 3-4). Durch diese breite Auswahl sollten die Reaktoren mit einem möglichst breiten Spektrum an Mikroorganismen beimpft werden.

Die Schlämme wurden zunächst in einem 40 Liter-Technikumsreaktor gemischt und als Vorratsbehälter für die 1 Liter-Versuchsreaktoren benutzt. Vor Beginn der Versuche wurde der Reaktor über ein Jahr bei 20 °C mit synthetischem Abwasser (wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben) beschickt und mit vollständiger Schlammrückhaltung betrieben. Für die Schlammrückhaltung kam ein Rotationsscheibenfilter (Fraunhofer IGB, Stuttgart) zum Einsatz. Diese Zeit diente als Adaptionszeit für die Mikroorganismen an das synthetische Substrat.

Tabelle 3-4: Auswahl der Schlämme aus verschiedenen Kläranlagen für die Fermentationsversuche

Kläranlage/ Technikums-anlage	Betriebs-temperatur [°C]		Eigenschaften
1	30	-	Schlamm aus dem UASB-Reaktor einer Saft produzierenden Firma, bestehend aus Schlammpellets mit sehr hoher Konzentration an methanogenen *Archaea*
2	Unbeheizt	-	Überschussschlamm aus dem Speicherbecken der kommunalen KA Renquishausen, der sich ganzjährig im offenen Becken befindet
3	20	-	Schlamm einer Fraunhofer IGB-Technikumsanlage, 3-5 Jahre Betrieb, ursprünglich aus der Faulung auf der KA Tauberbischofsheim entnommen
4	15-20	-	Schlamm aus der Pilot-KA des Fraunhofer IGB in Knittlingen, der bei Versuchen (1 Jahr, bei Raumtemperatur) in einer Technikumsanlage genutzt wurde; anschließend 3 Monate Lagerung bei 4 °C
5	30-32	-	Schlamm aus der 1. Stufe der 2-stufigen kommunalen KA Bad Kreuznach

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Gasanalytik

Bei den Fermentationsversuchen wurden regelmäßig Gasproben mittels Gasspeicherbeutel (100 ml, Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH, Bochum) entnommen. Diese wurden mit einen Micro-Gaschromatographen (Typ 490, Varian/Agilent Technologies, Waldbronn) verbunden und die Hauptkomponenten Methan (CH_4) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) sowie die Nebenkomponenten Stickstoff (N_2), Sauerstoff (O_2), Schwefelwasserstoff (H_2S) und Wasserstoff (H_2) bestimmt. Als Trägergas diente Argon. Die einzelnen Gaskomponenten wurden über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor erfasst. Eine Liste mit den Komponenten des verwendeten Micro-GC ist Tabelle 9-1 im Anhang zu entnehmen.

3.2.2 Bestimmung von Trockenrückstand und organischem Trockenrückstand

Um die Schlammkonzentration der Reaktoren zu überprüfen, wurden regelmäßig der Trockenrückstand (TR) und der organische Trockenrückstand (oTR) der Proben bestimmt.

Der TR entspricht dem Trockenmasseanteil der Probe, und gibt den Prozentsatz an gelösten und ungelösten nicht wasserdampfflüchtigen Feststoffen in der Suspensionsmasse an (Bischofsberger, 2005). Die Bestimmung des TR und des oTR erfolgte gravimetrisch gemäß DIN EN 12880 (2001). Hierzu wurden 5 bis 10 g Probe in Porzellantiegel eingewogen und 24 h bei 105 °C getrocknet, bis sich ein konstantes Gewicht einstellte. Die erhaltene Trockenmasse, bezogen auf die Feuchtmasse, ergibt den Trockenrückstand in Gewichtsprozent. Für die Bestimmung des oTR wurden die Tiegel mit der getrockneten Schlammprobe für 4 h in einen Ofen mit 500 °C gestellt. Die Differenz zwischen der dabei übrig bleibenden Asche und der zuvor bestimmten Trockenmasse, bezogen auf die Feuchtmasse, ergibt den organischen Trockenrückstand in Gewichtsprozent.

3.2.3 Bestimmung der organischen Säuren

Die Bestimmung der flüchtigen, organischen Säuren (C2 - C8) erfolgte mit Hilfe eines Gaschromatographen (Typ 3900 mit Autosampler Typ 8400, Varian/Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Als Trägergas diente Helium. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID). Mit dieser Methode konnten die organischen Säuren Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure, Valeriansäure, Capronsäure, Önanthsäure und Octansäure qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Komponenten und Eigenschaften des GC sind im Anhang in Tabelle 9-2 dargestellt.

3.2.4 Bestimmung von CSB und Stickstoff

Für die Bestimmung von CSB und Stickstoff wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand filtriert (Minisart® plus Spritzenvorsatzfilter 17823, 0,2 µm, Sartorius).

Sowohl CSB als auch Gesamtstickstoff der Proben wurden mittels kolorimetrischer Küvetten-Tests (Hach-Lange-Schnelltest, CSB LCK 514, TN LCK 338) und photometrischer Messung (Typ Lasa 100, Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland) bestimmt.

Die Messprinzipien und Störquellen der Hach-Lange-Schnelltests sind in Tabelle 9-4 aufgeführt.

3.2.5 Bestimmung weiterer Gärprodukte

Mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) (Komponenten und Messbedingungen siehe Anhang Tabelle 9-3) wurden Ethanol, Isopropanol, Propanol, 2-Butanol, 1-Butanol sowie tert-Butanol aus dem Filtrat bestimmt. Die Proben wurden 1:2 mit dem Laufmittel verdünnt, filtriert (Spartan 13, 0,2 µm, Whatman, Deutschland) und in 2 ml HPLC-Injektionsflaschen abgefüllt. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine Aminex HPX 87 H-Säule (Biorad, München). Als Laufmittel diente 5 mM Schwefelsäure mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,53 ml /min. Die Detektion der Substanzen erfolgte über einen RI-Detektor (ERC-7511).

3.3 Berechnungen

3.3.1 Gasnormvolumen

Damit die täglich gemessenen Biogasvolumen vergleichbar sind, müssen diese Temperatur und Druck bereinigt auf ein Normgasvolumen umgerechnet werden. Dazu wurden die Gleichung (x) aus der VDI-Richtlinie 4630 (2006) sowie zusätzlich die Magnus-Formel (y) (Sonntag, 1990) verwendet.

$$V_{tr,\,0} = V \cdot \frac{(p - p_W) \cdot T_0}{p_0 \cdot T} \qquad (x)$$

$$p_W(t) = 6{,}112\ \text{hPa} \cdot \exp\left(\frac{17{,}62 \cdot t}{243{,}12\ °\text{C} + t}\right) \qquad (y)$$

$V_{tr,0}$ = Volumen des trockenen Gases im Normzustand in ml_N
V = abgelesenes Volumen des Gases in ml
p = Druck der Gasphase zum Zeitpunkt der Ablesung in hPa
p_w = Dampfdruck des Wassers in Abhängigkeit von der Temperatur des umgebenden Raumes in hPa
T_0 = Normtemperatur; T_0 = 273 K

p_0 = Normdruck; p_0 = 1013 hPa
T = Temperatur des Biogases oder des umgebenden Raumes in K
t = Temperatur des Biogases oder des umgebenden Raumes in °C

3.3.2 Korrektur des Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalts

Bei der Substratzufuhr und Biomasserückführung konnte ein tägliches Öffnen der Reaktoren und damit eine kurzzeitige Vermischung der Biogasproben mit Luft nicht verhindert werden. Es wurde daher eine Korrektur für die zwei Hauptkomponenten im Biogas, Methan und Kohlenstoffdioxid, durchgeführt. Dies ist ohne eine Feuchte- oder Kopfraumkorrektur möglich, da beide Konzentrationen zeitgleich bestimmt wurden. (VDI-Richtlinie 4630, 2006)

$$C_{tr,\,korr} = C_{CH_4(CO_2)} \cdot \frac{100}{C_{CH_4} + C_{CO_2}} \qquad (z)$$

$C_{tr,\,korr}$ = korrigierte Konzentration der Biogaskomponente im trockenenen Gas in Vol.-%
$C_{CH4(CO2)}$ = gemessene Konzentration an Methan (oder Kohlenstoffdioxid) im Gas in Vol.-%
C_{CH4} = gemessene Methankonzentration im Gas in Vol.-%
C_{CO2} = gemessene Kohlenstoffdioxidonzentration im Gas in Vol.-%

3.4 Mikroskopische Untersuchungen im Auflicht

Die Proben der Reaktorbiozönose wurden hinsichtlich einer ersten Abschätzung der Zusammensetzung mikroskopisch im Auflicht untersucht. Dazu wurde ein Mikroskop Axiophot (Carl Zeiss AG) mit integriertem Aufnahmesystem (Typ Axiocam MRc, Carl Zeiss AG) eingesetzt. Im Auflicht konnten die Mikroorganismenpopulationen morphologisch charakterisiert und erste Unterschiede zwischen den Reaktoren ermittelt werden. Das Vorhandensein und die Aktivität von methanogenen *Archaea* konnte durch Anregung mit Licht im blauen Wellenbereich untersucht werden, wodurch sie grün-blau leuchten. Dafür wurde der Filtersatz Nr.5 (Anregung 395 - 440 nm, Strahlenteiler 460 nm, Emissionsfilter 470 nm) eingesetzt. Es konnten aufgrund der verschiedenen Morphologie auch die taxonomischen Ordnungen unterschieden werden.

3.5 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

3.5.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung nach Nielsen et al. (2009)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht, Aussagen sowohl über die Populationszusammensetzung in komplexen biolo-

gischen Systemen (Amann et al., 1995), als auch in eingeschränktem Umfang über die Aktivität der Mikroorganismen (Poulsen et al., 1993) zu treffen.

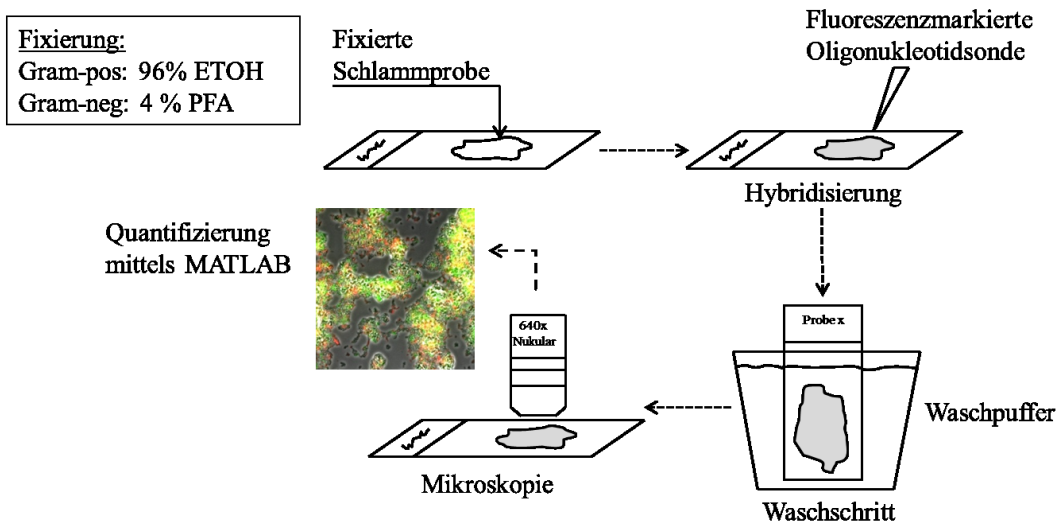

Abbildung 3-3: Schema der Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die fluoreszenzmarkierten Oligosonden binden komplementär an Zielstrukturen innerhalb der ribosomalen RNS. Die unterschiedlich stark konservierten Sequenzbereiche der rRNS ermöglichen es, spezifische fluoreszenzmarkierte Sonden auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen *in situ* einzusetzen und so die verschiedenen Mikroorganismenzellen zu visualisieren (Amann et al., 1995).

Abbildung 3-3 zeigt die Arbeitsschritte von der Fixierung der Proben bis zur softwareunterstützten Bildauswertung. Für die Untersuchung der mikrobiellen Population der Biogasreaktoren wurden jeweils vor Umstellung auf eine neue Schlammverweilzeit die Proben entnommen, fixiert, immobilisiert und hybridisiert. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit 4‘,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt und mittels eines Epifluoreszenzmikroskopes (Carl Zeiss AG) detektiert. Die Bildauswertung erfolgte über einen selbst entwickelten MATLAB-Algorithmus. Die eingesetzten Chemikalien und Lösungen sind im Anhang (Abschnitt 9.2) aufgelistet.

3.5.2 Eingesetzte Oligonukleotidsonden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden wurden durch die Firma Biomers GmbH hergestellt. Die Farbstoffe sind am 5‘-Ende der Nukleotidsequenzen gebunden. Die eingesetzten Sonden, deren Spezifität sowie die Formamidkonzentration sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

Tabelle 3-5: Verwendete Oligonukleotidsonden mit Sequenz, Spezifität, Formamidkonzentration, Farbstoff und Referenz

Sonde	Sequenz (5'-3')	*rRNA target site (E.coli-Nr)*	Spezifität	FA [%]	Referenz oder Quelle	Farbstoff
NON338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	16S	Nonsense	–	Wallner et al. (1993)	Cy3, 6-FAM
EUB338[a]	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	*most Bacteria*	–	Amann et al. (1990)	Cy3, 6-FAM
EUB338-II[a]	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	16S (338-355)	*Planctomycetales*	–	Daims et al. (1999)	Cy3, 6-FAM
EUB338-III[a]	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	16S (338-355)	*Verrucomicrobiales*	–	Daims et al. (1999)	Cy3, 6-FAM
ARC915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC C	16S (915-934)	*Archaea*	–	Stahl und Amann (1991)	6-FAM
HGC69A	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	23S (1901-1918)	*Actinobacteria* (hoher G+C Gram-pos. Bakt)	25	Roller et al. (1994)	6-FAM
LGC354A	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	16S (354-371)	*Firmicutes* (niedriger G+C Gram-pos. Bakt)	35	Meier et al. (1999)	6-FAM
LGC354B	CGG AAG ATT CCC TAC TGC		ohne *Syntrophomonadaceae*	35	Meier et al. (1999)	6-FAM
LGC354C	CCG AAG ATT CCC TAC TGC			35	Meier et al. (1999)	6-FAM
CFB719	AGC TGC CTT CGC AAT CGG	16S (719-736)	*Bacteroidetes*	30	Weller et al. (2000)	Cy3
GAM42a*	GCC TTC CCA CAT CGT TT	23S (1027-1043)	*γ-Proteobacteria*	35	Manz et al. (1992)	Cy3
Synbac824	GTA CCC GCT ACA CCT AGT	16S (824-841)	Syntrophobacter Gruppe	10	Ariesyady et al. (2007)	6-FAM
ClostI	TTC TTC CTA ATC TCT ACG CA	16S (696-716)	sub-Gruppe von *Clostridia* cluster I und II	30	Küsel et al. (1999)	Cy3
Synm700	ACT GGT RTT CCT CCT GAT TTC TA	16S (700-722)	*Syntrophomonadaceae*	30	Hansen et al. (1999)	Cy3

[a] die drei EUB-Sonden wurden zu gleichen Teilen gemischt und für die Hybridisierungen eingesetzt (EUB338Mix)

Die Oligonucleotidsonden wurden als Lyophilisate geliefert und mussten vor der Hybridisierung in TE-Puffer gelöst (Stammkonzentration von 0,5 µg/µl) und durch Verdünnen mit Aqua bidest auf eine Arbeitslösungskonzentration von 0,05 µg/µl eingestellt werden. Die Arbeitslösung wurde in Aliquoten bei - 20 °C gelagert.

3.5.3 Fixierung der Proben

Die Fixierung des Probenmaterials dient als Vorbereitung für die Hybridisierung mit den Oligonukleotidsonden. Dabei wird die Enzymaktivität in den Proben gestoppt und die Zellmembranen werden für die Oligonukleotidsonden permeabel gemacht.

Aus jedem der neun Rektoren wurden vor dem Umstellen auf eine neue Schlammverweilzeit etwa 200 ml Schlamm entnommen. Davon wurden 4 - 6 ml Probe für die Fixierung verwendet. Für die spätere Bestimmung von Gram-positiven Bakterien wurde ein Teil der Schlammprobe 1:1 mit 96%igen Ethanol gemischt und direkt bei - 20 °C eingefroren. Der andere Teil der Probe, für den Nachweis der Gram-negativen Bakterien, wurde 1:1 mit 8%igen Parafor-

maldehyd gemischt und für 5 h auf Eis gestellt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Probe zentrifugiert (3500 x g, 10 min, 10 °C), der Überstand entfernt und 2 ml eiskalte PBS/EtOH-Lösung zum Waschen dazugegeben, geschüttelt und wieder zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt wurden, je nach Zellmenge, 2 - 4 ml PBS/EtOH-Lösung zum Pellet gegeben und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

3.5.4 Objektträger-Vorbereitung

Für die mikroskopische Auswertung der FISH-Proben wurden teflonbeschichtete Objektträger (je 10 Reaktionsfelder, Durchmesser 5 mm von Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) verwendet. Für eine bessere Haftung der Proben, wurden die Objektträger zuerst einer Säurebehandlung unterzogen und anschließend mit einer Gelatinelösung beschichtet. Dazu wurden die Objektträger über Nacht (für 15 h) in Bechergläser mit 60 °C heißer 1 M HCl gestellt. Schließlich wurden sie mit Aqua bidest abgespült, kurz in 96 % iges EtOH getaucht und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger für 5 min in eine 70 °C heiße 0,5 %ige Gelatine-Lösung getaucht und anschließend über Nacht in senkrechter Position getrocknet. Die so beschichteten Objektträger wurden bis zur Verwendung trocken und kühl gelagert.

3.5.5 Immobilisierung der fixierten Proben und Dehydrierung

Auf den Objektträgern wurde je Reaktionsfeld 5 µl fixierte Probe flächendeckend mittels Pipette aufgegeben und im Hybridisierungsofen (Wärmeschrank Typ B30, Memmert GmbH & Co. KG) für 15 min bei 40 - 50 °C getrocknet. Dieser Schritt wurde je nach Zelldichte der Proben 2 bis 3 Mal wiederholt, um ausreichend Zellen für die mikroskopische Auswertung vorliegen zu haben. Nach dem letzten Trocknen wurden die immobilisierten Proben über eine Ethanolreihe (50 %, 80 % und 96 %) dehydriert. Dies führt zur Entwässerung der Proben und damit zu einer höheren Auflösung der mikroskopischen Bilder.

Die Objektträger mit den immobilisierten Proben wurden dazu je 3 min in die aufsteigend konzentrierten Ethanol-Lösungen getaucht und am Ende luftgetrocknet. Anschließend wurden sie bis zur Hybridisierung in 50 ml Reaktionsgefäßen bei - 20 °C eingefroren.

3.5.6 Hybridisierung und Waschschritt

Die Hybridisierung erfolgt mit hoher Stringenz der Sonden bezüglich der nachzuweisenden Mikroorganismen. Dazu wurden, je nach Oligosonde und festgelegter Hybridisierungstemperatur, die Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer und die Natriumchlorid-Konzentration im Waschpuffer eingestellt (siehe Tabelle 3-6 und Tabelle 3-7).

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für verschiedene Formamidkonzentrationen

Formamid [%]	Formamid [µl]	Milli-Q [µl]	5 M NaCl [µl]	1 M Tris/HCl [µl]	10 % SDS [µl]
10	200	1400	360	40	2
20	400	1200	360	40	2
25	500	1100	360	40	2
30	600	1000	360	40	2
35	700	900	360	40	2

Das Formamid erhöht die Stringenz und verringert die Schmelztemperatur durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen der DNS-Sonden. Das Natriumchlorid immobilisiert die hybridisierten Moleküle und wird statt Formamid verwendet, um den toxischen Abfall zu reduzieren (Lathe, 1985). Die Hybridisierung erfolgte bei 46 °C für 24 h in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach).

Tabelle 3-7: Zusammensetzung des Waschpuffers entsprechend der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers

Formamid [%]	1 M Tris/HCl [µl]	10 % SDS [µl]	5 M NaCl [µl]	0,5 M EDTA [µl]
10	200	1400	360	40
20	400	1200	360	40
25	500	1100	360	40
30	600	1000	360	40
35	700	900	360	40

Je Reaktionsfeld mit immobilisierter Probe wurden 8 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl einer domänenspezifischen (EUB338Mix, ARC915) sowie einer phyla- oder gattungsspezifischen Oligosonde aufgetragen. Mit dem restlichen Hybridisierungspuffer wurde ein Filterpapier befeuchtet, das zusammen mit dem Objektträger in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und im Wärmeschrank inkubiert wurde. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger vorsichtig mit etwas entsprechendem Waschpuffer gespült und anschließend für 15 min im 48 °C war-

men Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Objektträger kurz in kaltes Aqua bidest getaucht und an der Luft getrocknet.

3.5.7 Mikroskopie und Bildauswertung mit MATLAB

Vor dem Mikroskopieren wurden die hybridisierten Zellen zusätzlich mit 4‘, 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Diese nichtselektive Gegenfärbung ermöglichte die Bestimmung des Anteils verschiedener phylogenetischer Gruppen an der Gesamtreaktorpopulation.

Dazu wurden 10 µl DAPI-Lösung (5 µg/ml) auf jedes Reaktionsfeld gegeben und bei 4 °C für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Objektträger vorsichtig mit A. bidest gespült, im Dunkeln luftgetrocknet und bis zum Mikroskopieren bei - 20 °C eingefroren.

Die fluoreszenzmarkierten Proben wurde mittels eines Epifluoreszenzmikroskopes Typ Axio Observer Z1m der Firma Zeiss mit verschiedenen Filtersätzen (vgl. Tabelle 3-8) visualisiert. Die Proben wurden mit AF1 (Citifluor Ltd.) bedeckt, um ein Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Zellen zu verhindern. Es wurde bei 630-facher Vergrößerung mikroskopiert. Für die Aufnahmen mit der AXIO-Cam wurden mit der integrierten Software AxioVision Rel 4.8 feste Belichtungszeiten für den Cy3-Kanal (rot, 60 - 200 ms) und den FLUOS-Kanal (grün, 300 - 450 ms) eingestellt. Die Belichtungszeit für den DAPI-Kanal (blau) wurde stets auf optimale Belichtungswerte angepasst. Dies war für eine genauere Auswertung mit MATLAB notwendig.

Tabelle 3-8: Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendeten Filtersätze mit Extinktions- und Emissionswellenlängen

Filterblock	Extinktion [nm]	Emission [nm]
Filtersatz 49 DAPI	365/50	445/50
Filtersatz 38 EGFP	470/40	525/50
Filtersatz 43 HECY3	550/25	605/50

Je Reaktionsfeld wurden 10 - 15 Bilder an beliebigen Stellen aufgenommen und mittels eines eigens dafür programmierten MATLAB-Algorithmus (Quellcode siehe Anhang 9.3) ausgewertet. Das Prinzip beruht auf einer Flächenauswertung. Die Qualität der Hybridisierung konnte durch den Vergleich der domänenspezifisch-markierten Zellen bezogen auf die DAPI-gefärbten Zellen überprüft werden. Der Anteil der phyla- bzw. gattungsspezifisch-markierten Zellen konnte sowohl auf die domänenspezifisch-markierten als auch DAPI-gefärbten Zellen quantifiziert werden. Dabei erfolgte auch eine Korrektur der Hintergrundfluoreszenz und Autofluoreszenz der Zellen.

3.6 Metaproteomanalyse

Die Metaproteomanalyse ermöglicht die Identifizierung von Proteinen und damit von Mikroorganismen sowie deren Enzymen. Proteine reflektieren die aktuelle Funktionalität hinsichtlich metabolischer Reaktionen und Regulationen der Population und können als alternative Marker dienen. Veränderte Proteinmuster geben Aufschluss über physiologische Reaktionen der Mikroorganismen auf veränderte Bedingungen, wie zum Beispiel unterschiedliche Betriebstemperaturen oder hydraulische Verweilzeiten (HRT). Zudem lassen sich über die Enzyme Rückschlüsse auf die verschiedenen Stoffwechselwege im untersuchten System ziehen.

Für eine Identifizierung müssen die Proteine zuerst extrahiert und aufgereinigt werden. Danach erfolgt eine Auftrennung über SDS-PAGE oder 2D-PAGE. Ausgewählte Proteinbanden oder -spots werden tryptisch verdaut und so in Peptide zerlegt, die dann massenspektrometrisch analysiert werden. Die eigentliche Identifizierung erfolgt dann über den Abgleich der Peptidmassen und -sequenzen mit Datenbanken (NCBI, UniProt).

3.6.1 Probennahme und Probenvorbereitung

Für Vorversuche zum Zellaufschluss und Proteinfällung am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg wurden Proben aus vier verschiedenen Anaerobreaktoren entnommen. Zwei Proben wurden aus den Anaerobreaktoren der Pilotkläranlage des Fraunhofer IGB in Knittlingen entnommen. Diese wird mit realem, häuslichem Abwasser betrieben und besteht u.a. aus einem unbeheizten und einen beheizten (37 °C) Anaerobreaktor. Die anderen zwei Proben stammten aus einem 10 Liter- und dem 40 Liter-Technikumsreaktor, dessen Schlamm als Inokulum für die 1 Liter-Reaktoren diente. Beide enthielten den gleichen Klärschlamm und wurden mit synthetischem Abwasser betrieben.

Die Probenahme aus den 1 Liter-Versuchsreaktoren erfolgte jeweils am Ende der verschiedenen Schlammverweilzeiten (8 d, 4 d, 1 d).

Alle Proben wurden direkt zentrifugiert (30.000 x g, 15 min, RT, Zentrifuge Avanti J-26XP, Beckmann Coulter) und das Pellet anschließend bei - 20 °C eingefroren.

3.6.2 Zellaufschluss, Extraktion, Fällung und Reinigung der Proteine

Um die Proteine für die Analysen verfügbar zu machen, müssen die Zellen aufgeschlossen, die Proteine extrahiert, ausgefällt und von Verunreinigungen, beispielsweise Huminstoffen, gereinigt werden.

Zellaufschluss und Phenolextraktion

Es wurden 250 mg stichfeste Reaktorprobe, 250 µl Reinstwasser, 0,172 g Saccharose, 500 µl Phenollösung und 1 g Silica Kügelchen zusammen in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und in einer Kugelmühle (30 min, 30 Hz, Kugelmühle MM400, Retsch) geschüttelt.

Für jede Probe wurden mehrere Reaktionsgefäße mit dieser Mischung angesetzt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 10.000 x g, RT, Biofuge Primo R H7590, Thermo Scientific) bildeten sich drei Schichten im Reaktionsgefäß. Nur die oberste Schicht, die Phenolphase mit den darin gelösten Proteinen, wurde abgenommen und in einem 25 ml Reaktionsgefäß mit gleicher Menge Reinstwasser auf einem Thermomixer (10 min, 1.000 rpm, RT, Thermomixer Comfort, Eppendorf) gewaschen. Die Phenolphasen der gleichen Probe wurden zusammengeführt. Nach dem Zentrifugieren wurde die nun unten befindliche Phenolphase entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem die anschließende Fällung der Proteine erfolgte.

Bei den Zellaufschlüssen der Proben am Fraunhofer IGB Stuttgart kam ein Minilys-Homogenisator (Minilys, Bertin Technologies) zum Einsatz. Bei diesem müssen passende Aufschluss-Tubes verwendet werden, so dass die Proben- und Chemikalienmengen wie folgt angepasst werden mussten: 2.000 - 2.600 mg Reaktorprobe, 860 mg Saccharose, 2 ml Phenollösung und 5 g Silica Kügelchen. Zudem wurden Untersuchungen zur besten Aufschlusszeit durchgeführt. Das ist die Zeit, bei der die größte Proteinmenge in der aufgeschlossenen Probe bestimmt wurde.

Fällung und Aufreinigung der Proteine

Für die Fällung wurde 0,1 M eiskaltes Ammoniumacetat in Methanol in 4-fachen Volumen zur Phenollösung mit den Proteinen gegeben und für 1h bei - 20 °C inkubiert. Danach wurde der Fällungsschritt mit dem 3-fachen Volumen an Ammoniumacetatlösung wiederholt. Dazwischen und danach wurde die Mischung zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, RT) und der Überstand verworfen.

In dem Proteinpellet konnten noch Reste der Phenollösung und Salze enthalten sein. Um diese zu entfernen, wurde das Pellet abwechselnd je zweimal mit dem 3-fachen Volumen an eiskaltem Aceton (80 %) und Ethanol (70 %) für 15 min bei - 20 °C gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Proteinpellet bis zur weiteren Verwendung in Ethanol (70 %) bei - 20 °C gelagert.

3.6.3 Proteinquantifizierung mit Amido Schwarz

Frühere Arbeiten (Kohrs, 2011 und Hanreich et. al, 2011) zeigen, dass weder die Lowry- noch die Bradford-Methode für die Quantifizierung in Umweltproben geeignet sind. Daher wurde die Methode mit Amido Schwarz nach Popov et al. (1975) verwendet. Sie weist eine hohe Sensitivität auf und wird nicht durch Ionen oder Sekundärmetabolite beeinflusst.

Die Proben und Standards wurden als Triplikate gemessen. Je 50 µl Probe (ggf. mit Reinstwasser verdünnt) oder BSA-Standard, im Bereich von 0,01 - 1,0 µg/µl, wurden 300 µl Amido Schwarz Lösung dazugegeben. Nach 5 min Fällung wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert (4 min, 16.400 x g, RT) und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde zweimal mit 500 µl Essigsäure/Methanol (1:10 v/v) gewaschen und anschließend in 1 ml 0,1 M NaOH

resuspendiert. Es wurde dann die Extinktion bei 615 nm gemessen (U-2900 Spectrophotometer, HITACHI) und über eine BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet.

3.6.4 Proteinauftrennung mit SDS-Gelelektrophorese und 2D-Gelelektrophorese

Die Trennung der Proteine wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) und zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) (O'Farell, 1975) durchgeführt. Die 2D-PAGE ist eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung, bei der die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden, und der SDS-PAGE.

SDS-PAGE für Vorversuche zum Zellaufschluss und zur Fällung

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Die Gelgießkammer wurde zusammengebaut, das 12 % Trenngel hergestellt und bis etwa 1,5 cm unter den oberen Glasrand hineingegossen. Für eine glatte Gelkante wurde das Gel mit 1 ml wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Nach 1 h Polymerisation wurde das restliche Butanol mit Reinstwasser abgespült. Nun wurde das 4 % Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen und ein Kamm für die Probentaschen hineingesteckt. Nach 30 min Polymerisation konnte der Kamm entfernt und die Probentaschen mit Reinstwasser gespült werden. Die fertigen Gele wurden entweder sofort verwendet oder bis zu 2 Tagen in feuchten Tüchern bei 4 °C gelagert.

Für den Lauf der SDS-PAGE wurde das Gel in der Elektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra System, BioRad) eingebaut und diese bis zur Markierung mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Von den in Ethanol gelagerten Proben wurde so viel entnommen, dass nach dem Verdampfen des Ethanols (10 min, 60 °C, Thermomixer) 25 µg getrocknetes Protein vorhanden waren. Dieses Proteinpellet wurde mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und im Thermomixer (5 min, 60 °C, 1.400 rpm) inkubiert und anschließend zentrifugiert (2 min, 16,400 x g, RT). Diese Proben sowie die BSA-Standards (1 und 3 µg/µl) und der Proteinstandard (Prestained ProteinLadder #22619, Thermo Fisher Scientific) wurden dann in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Der Lauf erfolgte erst bei 10 mA, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat, danach wurde auf 20 mA pro Gel erhöht. Daran schloss sich die Fixierung und Visualisierung der Proteine an.

SDS-PAGE für Proteinidentifizierung mit nanoHPLC-MS/MS

Die Durchführung der SDS-PAGE für die anschießende Proteinidentifizierung ist prinzipiell identisch mit der zuvor geschilderten Methode. Es wurden jedoch Probenmengen mit 100 µg Protein verwendet. Diese wurden mit der gleichen Menge Wasser und dem 10-fachen Volumen an Aceton (absolut) gemischt und für 1 h bei - 20 °C für eine Fällung inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (30 min, 10.000 x g, 4 °C) und Abtrennen des Acetons wurde das restliche Aceton bei RT abgedampft. Die getrockneten Proben wurde dann in 11 µl SDS-

Probenpuffer gelöst und auf einem Thermoshaker erhitzt (5 min, 60 °C, 1.400 rpm). Um nicht lösliche Substanzen abzutrennen, wurde im Anschluss zentrifugiert (5 min, 16.200 x g, RT) und anschließend in die Taschen des Sammelgel pipettiert. Die Laufbedingungen sind identisch mit der SDS-PAGE der Vorversuche.

2D-PAGE mit Paperbridge

Die 2D-PAGE besteht aus zwei Teilen, der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-PAGE. Sie kann mit unterschiedlich großen IPG-Steifen und Gelen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde sowohl mit 7 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) und kleinen Gelen (10 x 8 cm) als auch 18 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) und großen Gelen (20 x 20 cm) gearbeitet. Bei der IEF kamen Paperbridges zum Einsatz (siehe Abbildung 3-4), um eventuell noch vorhandene Störstoffe in den Proteinpellets zurückzuhalten und klare Proteinspotmuster auf den Gelen zu bekommen. Alle Reaktorproben wurden als Duplikate gemessen.

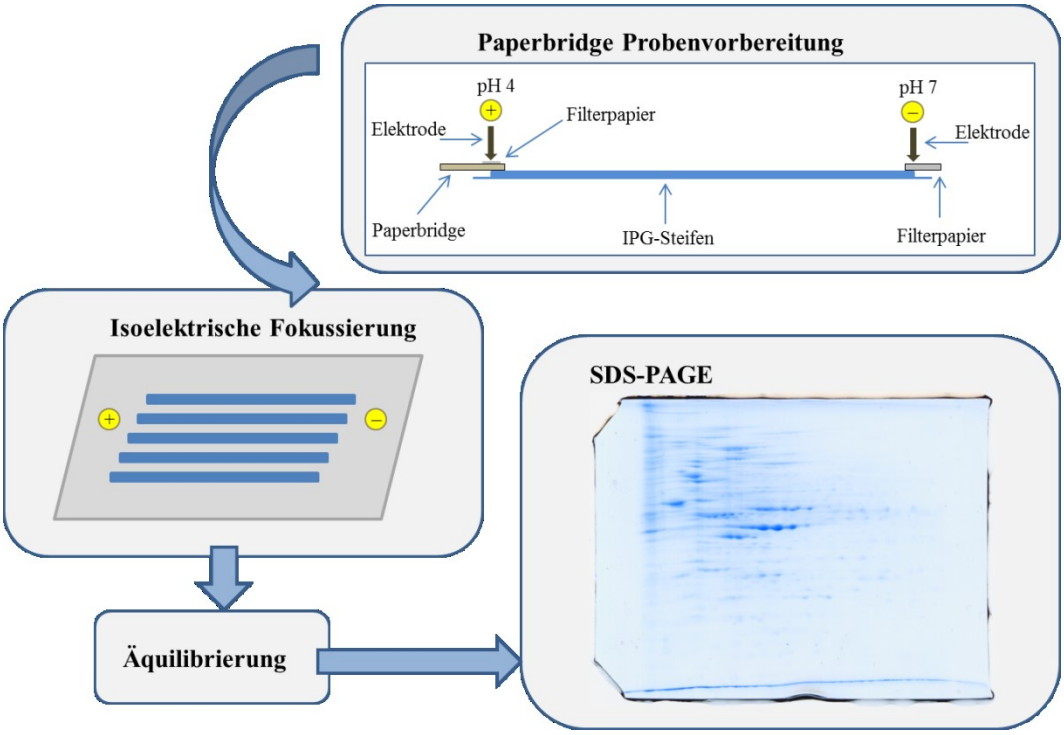

Abbildung 3-4: Prinzip der 2D-PAGE mit den drei Hauptschritten IEF, Äquilibrierung und SDS-PAGE

Isoelektrische Fokussierung

Für die Isoelektrische Fokussierung musste der Ethanol, in dem die Proteinpellets gelagert wurden, zunächst vollständig ausgedampft werden. Das trockene Pellet wurde dann über Nacht in 400 µl Destreak-Lösung mit 0,5 % Ampholinen gelöst. Für die kleinen Gele wurde 400 µg und für die großen 800 µg Protein eingesetzt. Die IPG-Streifen wurden ebenfalls über Nacht in 135 µl (7 cm Streifen) bzw. 347 µl (18 cm Streifen) der gleichen Destreak-

Ampholin-Mischung zum Quellen eingelegt. Den nächsten Tag wurden die IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben im IPG Manifold platziert, mit der „+"-Symbolseite Richtung Anode. Danach wurden auf der „ – "-Symbolseite Paper-Wick-Filter und auf der Anodenseite Paperbridge-Filter, leicht überlappend mit dem Gel, platziert (siehe Abbildung 3-4). Der Überstand der gelösten und zentrifugierten (30 min, 16.200 x g, RT) Proteinpellets wurde gleichmäßig auf den Paperbridge-Filter aufgegeben. Vor dem Platzieren der Elektroden wurden noch kleine, befeuchtete Filterpapiere auf die Paper-Wick-Filter aufgelegt. Anschließend wurden die Streifen mit reichlich Coverfluid bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die eingestellten Laufbedingungen der IEF-Einheit (IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech) finden sich in den Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10.

Tabelle 3-9: IEF-Protokoll für kleine IPG-Streifen (7 cm)

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Modus
1	200	2	Step and Hold
2	500	2	Step and Hold
3	1000	1	Step and Hold
4	5000	0,5	Gradient
5	5000	max. 6	Step and Hold
Voltstunden [Vh]:	20.000 - 30.000		
Dauer [h]:	11,5		
Temperatur [°C]:	20		
Stromstärke pro Streifen [µA]:	50		

Tabelle 3-10: IEF-Protokoll für große IPG-Streifen (18 cm)

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Modus
1	200	3	Step and Hold
2	1000	2	Step and Hold
3	8000	5	Gradient
4	8000	12	Step and Hold
Voltstunden [Vh]:	100.000 - 150.000		
Dauer [h]:	22		
Temperatur [°C]:	20		
Stromstärke pro Streifen [µA]:	50		

Äquilibrierung

Nach der IEF wurden die IPG-Streifen kurz mit Reinstwasser gewaschen. Danach wurden sie für 15 min in Äquilibrierlösung mit 2 % DTT und 15 min in Äquilibrierlösung mit 2,5 % IAA eingelegt. Zwischen den Schritten wurden die Streifen mit Reinstwasser gereinigt.

SDS-PAGE

Es wurde das gleiche Standardprotokoll wie bei der eindimensionalen SDS verwendet, allerdings bestanden die Gele nur aus 12 % Trenngel. Die IPG-Streifen mit den Proteinen wurden oben auf die Gele gelegt und mit flüssiger, bromphenolblau-gefärbter Agarose fixiert. Für die kleinen Gele wurden Hoefer SE250 Gelkammersysteme benutzt, für die großen Gele das System Protean II xi Cell, BioRad. Die kleinen Gele liefen mit 20 mA/ Gel, die großen Gele mit 40 mA/ Gel.

3.6.5 Fixierung, Visualisierung und Trocknen der Gele

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE mit Reinstwasser abgespült und in eine Schale mit Fixierungslösung gegeben, worin sie 1 h geschwenkt wurden (Schüttler K15/500, Noctua). Nach zweimal 10 min Waschen in Reinstwasser wurden die Gele über Nacht in kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt nach Neuhoff et al. (1985) und anschließend gescannt.

Die Gele wurden mit einem EPSON Expression 1680 und folgenden Einstellungen gescannt: Auflösung: 200 dpi, Helligkeit: - 10, Kontrast: 0 und Sättigung: 50.

Das Trocknen der Gele machte diese für längere Zeit haltbar. Dazu wurden die Gele für 10 min und die Cellophanfolien für 3 min in eine Glycerol-Lösung eingelegt. Anschließend wurden die Gele zwischen den Folien in einem Geltrocknungsrahmen (Maxi 24 x 24, Carl Roth) eingespannt und über zwei Tage in einem Abzug getrocknet.

3.6.6 Auswertung der Gele mit Delta2D

Für den Vergleich der 2D-PAGE-Gele mussten Variationen zwischen den einzelnen Gelen kompensiert werden. Dies wurde mit der Software Delta2D (DECODON, Version 3.4) erreicht. Es erlaubte zudem die Proteinexpressionen sowohl qualitativ wie quantitativ zu vergleichen (siehe Abbildung 3-5).

Die gescannten Gelbilder wurden in die Software geladen und miteinander „gewarpt“. Dabei werden gleiche Proteinspots übereinander gelegt und Variationen zwischen den einzelnen Gelen ausgeglichen.

Anschließend wurden alle Gele zu einem künstlichen Fusionsgel vereint und die Proteinspots detektiert. Für die Quantifizierung wurden die detektierten Spots dann wieder auf die Gelbilder der verschiedenen Reaktorproben übertragen.

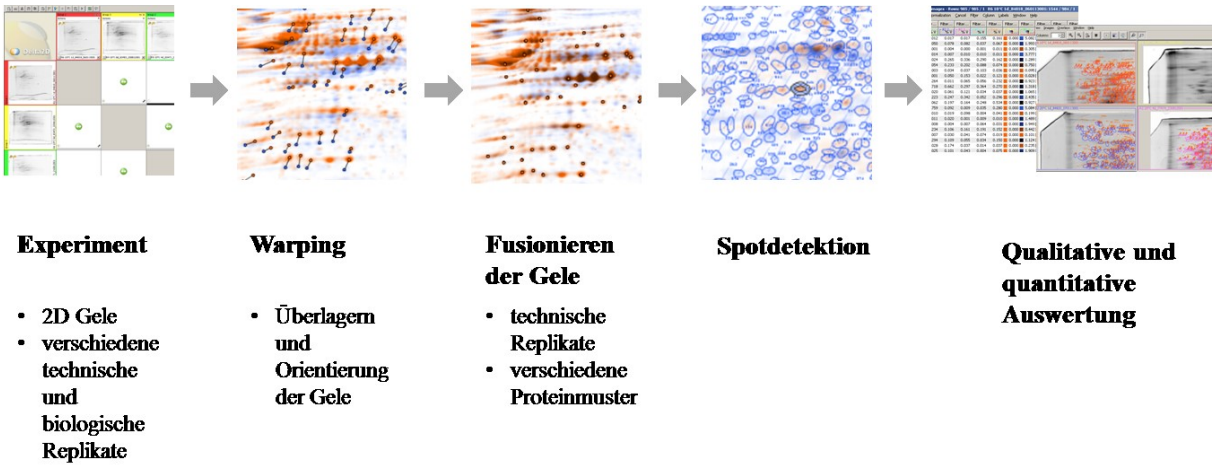

Abbildung 3-5: Auswertung der 2D-PAGE-Gele mit der Software Delta2D

3.6.7 *In-Gel*-Verdau

Für die Identifikation mit Massenspektrometrie müssen die Proteine in kleinere Peptide gespalten werden. Dies geschieht durch spezifische Proteasen, wie beispielsweise Trypsin, die an ganz spezifischen Stellen angreifen.

Dazu wurden ausgewählte Proteinspots (1 - 3 mm²) mit dem Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten und in Reaktionsgefäßen mit Reinstwasser für 3 min eingeweicht. Danach konnte die Cellophanfolie entfernt und die Gelstücke getrocknet und in Protein Low Bind Reaktionsgefäße (0,5 ml, Eppendorf LowBind Reaktionsgefäß) überführt werden. So konnten sie bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C gelagert werden. Die Gelstücke wurden, wie in Tabelle 3-11 dargestellt, gewaschen und entfärbt.

Bei den SDS-Gelen (für die nanoHPLC) wurden die Probenstreifen einzeln aus den Gelen ausgeschnitten und jeder Streifen in 10 gleiche Stücke von ca. 6 mm Länge geteilt. Diese Fragmente wurden nochmal zerteilt und für den tryptischen Verdau in neue Reaktionsgefäße überführt.

Der tryptische Verdau erfolgte nach dem Protokoll von Shevchenko und Shevchenko (2001). Für die Fragmente der Probenstreifen wurden die Volumina der Lösungen aufgrund der größeren Volumina der Gelstücke angepasst.

Es wurde eine Trypsin-Salzsäure-Lösung ($c_{Trypsin}$ = 1 µg/µl) mit 1 mM Salzsäure hergestellt und diese im Verhältnis 1:100 mit dem ABC-Puffer gemischt (Trypsinpuffer, $c_{Trypsin}$ = 0,01 µg/µl). Für den Verdau wurden 3 µl des Trypsinpuffers sowie 30 µl ABC-Puffer zu den einzelnen Gelstücken gegeben, so dass diese vollständig bedeckt waren. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Der Überstand wurde dann in neue Reaktionsgefäße überführt und die Gelreste für 30 min in Extraktionspuffer inkubiert. Schließlich wurden die Überstände einer jeden Probe zusammengeführt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Nutzung bei - 20 °C gelagert. Während der Inkubationschritte beim Waschen, Entfärben

und dem tryptischen Verdau wurden die Proben auf einem Thermomixer (500 rpm, 20 °C, Titramax 1000 Heidolph, RT) geschüttelt und danach die Lösungsmittel entfernt. Die Spots und Fragmente wurden nach dem Eintrocknen bei - 20 °C gelagert.

Tabelle 3-11: Protokoll zum Waschen und Entfärben der Coomassie-gefärbten Proteinspots

Nr.	Schritt	Zeit
1.	150 µl Waschlösung	30 min
2.	150 µl Acetonitril	5 min
3.	Vakuumzentrifugation (Refridge Vapor Trap RV T4104) → Eintrocknen	ca. 5 min
4.	150 µl DTT-Lösung	30 min
5.	150 µl Acetonitril	5 min
6.	150 µl IAA-Lösung	30 min
7.	150 µl Acetonitril	5 min
8.	150 µl ABC-Puffer	10 min
9.	150 µl Acetonitril	5 min
10.	Vakuumzentrifugation → Eintrocknen	ca. 5 min

Sowohl der tryptische Verdau als auch die nachfolgenden massensprektometrischen Analysen wurden am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

3.6.8 Massenspektrometrie mit der ESI-Ionenfalle

Die extrahierten, getrockneten Peptide aus den Fragmenten der Probenstreifen wurden mittels nanoHPLC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) gemessen (Komponenten und Messbedingungen siehe Anhang Tabelle 9-5). Dazu wurden diese zunächst in 11 µl mobile Phase A-Lösung gelöst. Je Lauf wurden dann 5 µl Probenvolumen injiziert.

3.6.9 Massenspektrometrie mit MALDI-TOF/TOF

Die massenspektrometrischen Messungen für die tryptisch verdauten Proteinspots wurden mit einem Ultraflex-II MALDI-TOF/TOF von Bruker Daltonics durchgeführt. Die Komponenten und Messbedingen sind in Tabelle 9-6 im Anhang aufgeführt.

Es mussten zunächst die Trägerplatten (*AnchorChip*) vorbereitet werden. Zuerst wurden sie mit 2-Propanol gereinigt und luftgetrocknet. Anschließend je 5 min mit 2-Propanol, danach mit 50 %-iger Acetonitrillösung und 0,1 % TFA in einem Ultraschallbad behandelt. Nach

dem abschließenden Trocknen konnten die Trägerplatten mit der Standardlösung (1 µl) (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-12) und den Proben gespottet werden. Dazu wurden die eingetrockneten Proben in 10 µl Acetonitril (50 %ig) resuspendiert.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der MALDI-Standardlösung

Volumen	Lösung	Zusammensetzung
748 µl	TA85	85 % ACN, 15 % vollentsalztes Wasser, 1 % TFA
8 µl	10 % TFA	90 % vollentsalztes Wasser, 10 % TFA
8 µl	0,1 M NH_4PO_3	900 µl vollentsalztes Wasser, 100 µl 1 M NH_4PO_3
36 µl	gesättigte HCCA	Je 1 mg α-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Säure (HCCA) 10 µl TA90 (90 % ACN, 10 % vollentsalztes Wasser, 1 % TFA) hinzugeben; Ultraschallbad (5 min), zentrifugieren (5 min, 16.400 x g, 20 °C)
4 µl	Standard	Peptidkalibrierstandard, Bruker Daltonics

Jede Probe wurde 4-mal (je 1 µl) aufgetragen. Die getrockneten Spots wurden schließlich mit je 1 µl Matrixlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-13) überdeckt und zum Auskristallisieren in einen verdunkelten Abzug gestellt. Das genaue Protokoll ist bei Kohrs (2011) zu finden.

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der MALDI-Matrixlösung

Volumen	Lösung	Zusammensetzung
748 µl	TA95	95 % ACN, 5 % vollentsalztes Wasser, 1 % TFA
8 µl	10 % TFA	90 % vollentsalztes Wasser, 10 % TFA
8 µl	0,1 M NH_4PO_3	900 µl vollentsalztes Wasser, 100 µl 1 M NH_4PO_3
36 µl	HCCA-Überstand	Je 1 mg α-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Säure (HCCA) 10 µl TA90 (90 % ACN, 10 % vollentsalztes Wasser, 1 % TFA) hinzugeben; Ultraschallbad (5 min), zentrifugieren (5 min, 16.400 x g, 20 °C)

3.6.10 Bioinformatik-Werkzeuge

Die Suche und Identifizierung der Peptide erfolgte über die Software MASCOT. Dabei wurden die gemessenen MS und MS/MS-Daten mit theoretischen MS und MS/MS-Daten aus Datenbanken NCBInr und UniProt_sprot verglichen (MASCOT-Such-Einstellungen siehe Tabelle 9-7 im Anhang).

4 Ergebnisse der I. Versuchsphase – Die methanogenen *Archaea*

Die Versuche in den anaeroben 1 L-Reaktoren liefen insgesamt über einen Zeitraum von etwa 300 Tagen bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren bzw. 127 Tagen bei den 38 °C-Reaktoren. Dabei wurden zwei Versuchsphasen unterschieden. In der ersten Versuchsphase standen die methanogenen *Archaea* im Mittelpunkt der Untersuchungen. In der zweiten Versuchsphase erfolgte eine Charakterisierung der acidogenen Bakterien und der von ihnen gebildeten Stoffwechselprodukte.

Ziel der ersten Versuchsphase war einerseits, die Zusammensetzung und Aktivität der methanogenen *Archaea*-Populationen bei 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur sowie unterschiedlichen Schlammverweilzeiten (SRT) zu untersuchen. Zum anderen sollten am Ende dieser Versuchsphase möglichst alle acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea* „ausgewaschen" sein. Die erste Versuchsphase erstreckte sich über 180 Tage.

Um ein möglichst breites Spektrum an Mikroorganismen für diese Versuche verfügbar zu haben, wurden Schlämme aus unterschiedlichsten Kläranlagen und Technikumsanlagen (siehe Abschnitt 3.1.4) entnommen und in einem 40 Liter-Reaktor gemischt. Darin hatten die Mikroorganismen 1,5 Jahre Zeit, um sich an das synthetische Abwasser und die Betriebstemperatur von 20 °C zu adaptieren. Die Biomasse wurde dabei mittels Membranfilter (ein Rotationscheibenfilter, 0,2 µm Porengröße, Fraunhofer IGB Stuttgart) vollständig zurückgehalten. Dieser Schlamm diente als Inokulum für die nachfolgenden Fermentationsversuche in 1 Liter-Glasreaktoren.

Sechs 1 Liter-Reaktoren (R1 - R6) wurden bei einer Betriebstemperatur von 20 °C, einer Schlammverweilzeit von 16 d und einer Raumbelastung von 1 g CSB/l*d^{-1} gestartet. Diese entspricht einer typischen Raumbelastung bei herkömmlichen, kommunalen Kläranlagen. Als Substrat diente wieder das mit Glucose angereicherte, synthetische Substrat. Nach 15 Tagen wurde die Raumbelastung auf 2 g CSB/l*d^{-1} erhöht und nach einer weiteren Woche (Tag 21) die Schlammverweilzeit auf 14 d gesenkt. Als Vorbereitung für die zweite Versuchsphase wurde bei drei der sechs 20 °C-Reaktoren (R4 - R6) im Verlauf der ersten Versuchsphase die Betriebstemperatur erst auf 15 °C und schließlich auf 10 °C gesenkt. Den Mikroorganismen wurde so ausreichend Zeit für eine Adaption an die niedrigen Temperaturen gegeben. Die erste Versuchsphase war nach etwa 180 Tagen abgeschlossen.

Weitere drei Reaktoren (R7 - R9) wurden mesophil betrieben. Es wurde direkt mit einer Betriebstemperatur von 38 °C gestartet, da eine Anpassung der methanogenen *Archaea* an höhere Temperaturen einfacher ist als an niedrige. Dabei lagen die Raumbelastung bei 2 g CSB/l*d^{-1} und die Schlammverweilzeit bei 12 d. Die erste Versuchsphase war hier nach etwa 122 Tagen abgeschlossen.

4.1 Gasbildung und -zusammensetzung

Die methanogene *Archaea*-Aktivität und die Zellmorphologien wurden einerseits durch Beobachtung im Mikroskop überwacht. Andererseits konnte die Aktivität indirekt über die zwei Parameter Biogasproduktion und Biogaszusammensetzung bewertet werden. Dazu wurden die täglich gebildeten Biogasmengen der sechs 20 °C-Reaktoren über den Zeitraum von 180 Tagen ermittelt, bis diese nahezu Null waren. Abbildung 4-1 zeigt die Kurvenverläufe der täglich gebildeten Biogasmengen der 20 °C-Reaktoren R1 - R6.

Zwischen den Versuchstagen 60 und 71 wurden sowohl die Substratzufuhr als auch der Biomasseabzug unterbrochen. Bei drei (R1, R2 und R6) der sechs Reaktoren erfolgte gleichzeitig eine Erhöhung der Biomassekonzentration durch erneute Zugabe von Schlamm aus dem 40 Liter-Technikumsreaktor. Alle sechs Reaktoren liefen danach mit einer Schlammverweilzeit von 14 d und einer Raumbelastung von 1 g CSB/l*d^{-1} bis Tag 122. Danach wurde die Raumbelastung wieder auf 2 g CSB/l*d^{-1} erhöht.

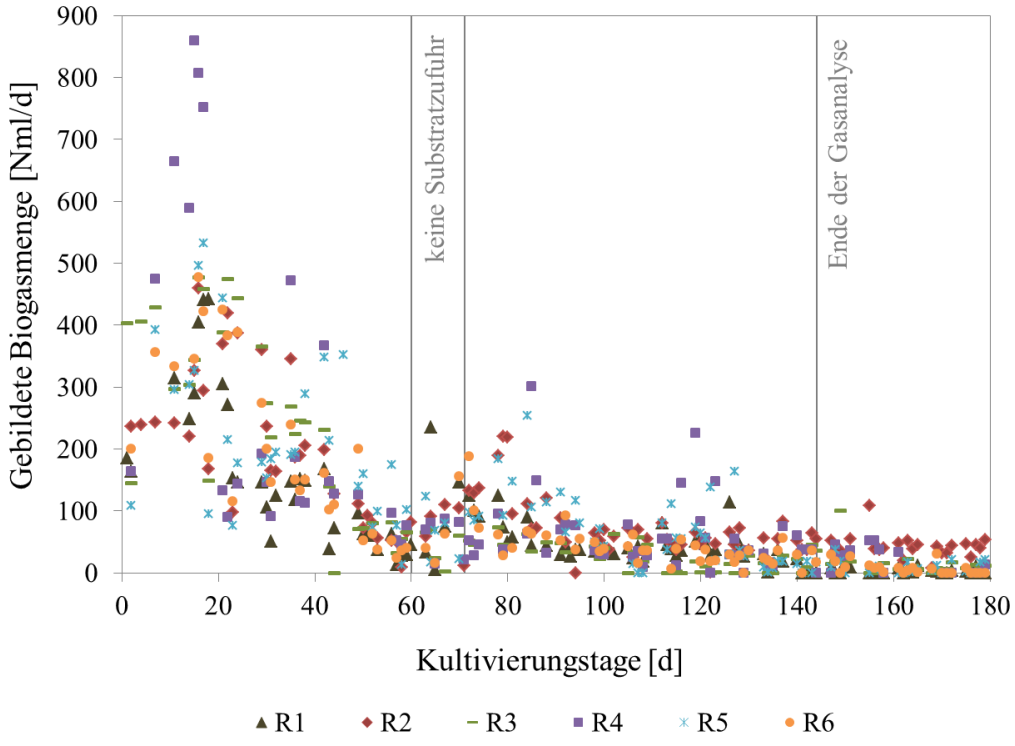

Abbildung 4-1: Verlauf der gebildeten Biogasmengen der Reaktoren R1 - R6 während der ersten 180 Kultivierungstage

Der Verlauf der Biogasbildung zeigt ein kontinuierliches Absinken der Biogasproduktion von Anfangs 400 - 800 Nml/d bis auf 0 - 10 Nml/d nach 180 Tagen. Alle sechs Reaktoren zeigen dabei einen vergleichbaren Kurvenverlauf. Das Absinken der gebildeten Biogasmenge zeigt, dass in allen Reaktoren die methanogenen *Archaea* ausgewaschen wurden, obwohl die

Schlammverweilzeiten (von 16 d und 14 d) oberhalb der Generationszeiten der methanogenen *Archaea* für den mesophilen Bereich lagen. Während der Zeit ohne Substratzufuhr (Tag 60 bis 71) und damit auch ohne Schlammabzug wurden die methanogenen *Archaea* nicht aus den Reaktoren ausgewaschen, sondern hatten Zeit wieder in den Schlammflocken zu wachsen. Die täglich gebildete Biogasmenge blieb konstant oder stieg zum Teil sogar wieder etwas. Bei drei (R2, R5 und R6) der sechs Reaktoren wurde zudem 500 ml neuer Schlamm aus dem 40 Liter-Technikumsreaktor zugeführt, um die Biomasse und damit die *Archaea*-Konzentration wieder zu erhöhen. Durch die erneute Substratzufuhr stieg die Biogasbildung kurzzeitig bei allen sechs Reaktoren an, bei denen mit Schlammzugabe (R2, R5 und R6) etwas mehr als bei den anderen drei Reaktoren (R1, R3 und R4). Nach 20 Tagen war die gebildete Biogasmenge bei allen sechs Reaktoren wieder gleich niedrig und fiel weiter ab. Bereits nach etwa 140 Tagen konnte keine Gasanalyse mehr durchgeführt werden, da die verfügbaren Biogasmengen zu gering waren.

Die 38 °C-Reaktoren (R7 - R9) wurden mit einer Schlammverweilzeit von 12 d und 2 g CSB/l* d^{-1} gestartet und in größeren Schritten (8 d, 4 d, 1 d) gesenkt. Dies war möglich, weil die methanogenen *Archaea* bei den mesophilen Temperaturen aktiver sind als bei niedrigeren Temperaturen. Schlammverweilzeiten von 12 d und 8 d liegen im Bereich üblicher methanogener Bedingungen (Miron et al., 2000; Kim et al., 2006). Um diese aus dem System auszuwaschen, müssen deshalb niedrigere Schlammverweilzeiten erreicht werden.

Abbildung 4-2 zeigt die täglich gebildeten Biogasmengen der drei 38 °C-Reaktoren. Deren Kurvenverlauf ist über den gesamten Zeitraum sehr ähnlich. Allerdings unterscheiden sich die gebildeten Biogasmengen von R7, R8 und R9 untereinander zum Teil um 250 Nml/d. Da alle drei Reaktoren unter den gleichen Bedingungen (T, Substrat, Raumbelastung) betrieben wurden, kann die Ursache für die unterschiedlichen Biogasmengen nur in einer unter-schiedlichen Populationszusammensetzung liegen. Trotz gleicher Betriebsbedingungen haben sich die Mikroorganismen in den drei Reaktoren unterschiedlich entwickelt.

Auffällig sind die konstanten Biogasmengen im Zeitraum zwischen Tag 40 und 95. Die Schlammverweilzeit wechselte in diesem Zeitraum von 10 d (bis Kultivierungstag 61) auf 8 d (Tag 61 bis 95). Trotz der veränderten Schlammverweilzeit ist keine Veränderung in der gebildeten Biogasmenge erkennbar. Nachdem zu Beginn ein Teil der methanogenen *Archaea* mit den Feststoffflocken ausgewaschen wurde, verblieben andere noch im System. Die Generationszeit dieser methanogenen *Archaea* lag also unterhalb der 8 d SRT, so dass sie schneller gewachsen sind als ausgewaschen wurden. Erst bei einer weiteren Verkürzung der Schlammverweilzeit auf 4 d sank auch die gebildete Biogasmenge.

Der Vergleich der Reaktoren R1 - R6 (20 °C) mit den Reaktoren R7 - R9 (38 °C) zeigt zum Teil deutliche Unterschiede bei den gebildeten Biogasmengen. In Abbildung 4-3 sind dazu die gemittelten Werte für die jeweilige Temperatur dargestellt. Auf eine Darstellung der Konfidenzintervalle wurde der Übersicht halber verzichtet und diese ausschließlich im Text diskutiert.

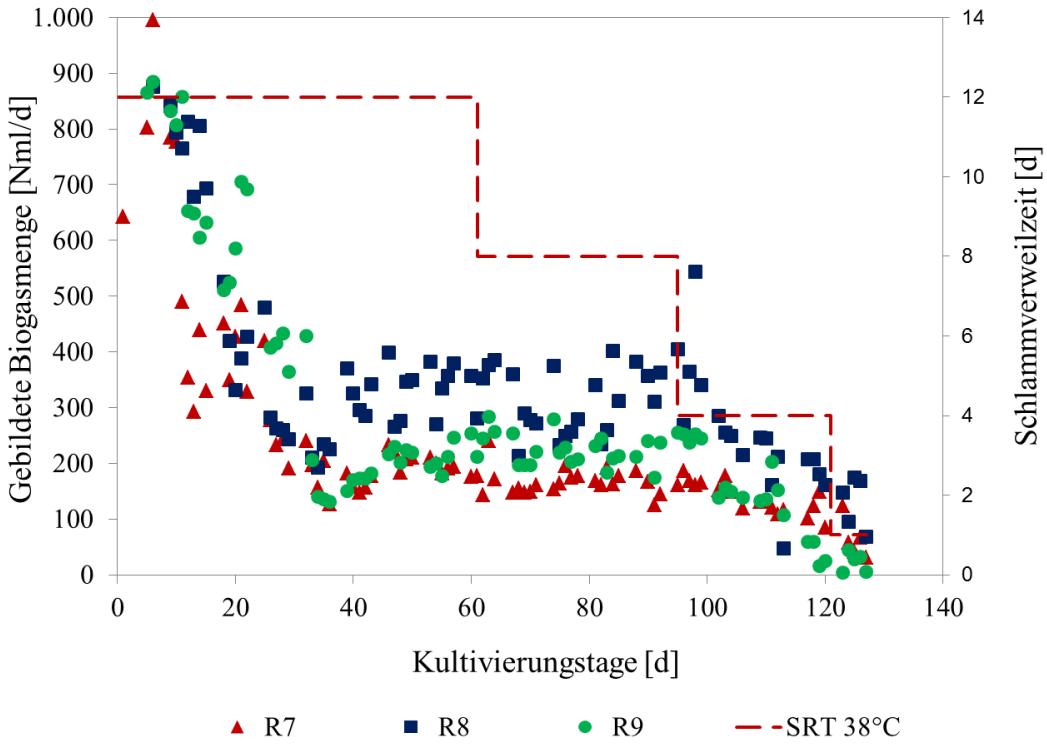

Abbildung 4-2: Verlauf der gebildeten Biogasmengen der Reaktoren R7 - R9 und Schlammverweilzeiten (SRT) über den Versuchszeitraum von 130 Tagen

Die Reaktoren R4 - R6 wurden zuerst bei 20 °C, später dann bei 15 °C (ab Tag 122) und schließlich bei 10 °C Betriebstemperatur (ab Tag 157) betrieben. Das schrittweise Absenken der Temperatur diente der Anpassung der Mikroorganismenpopulation. Der Kurvenverlauf und die gebildeten Biogasmengen sind vergleichbar mit dem der Reaktoren R1 - R3 mit einer gleichbleibenden Betriebstemperatur von 20 °C. Das Herabsetzen der Temperatur ab Tag 120 zeigte also keinen Einfluss auf die noch messbare Biogasbildung.

Die größere Biogasmenge bei den 38 °C-Reaktoren in den ersten 15 Tagen hat zwei Ursachen. Zum einen wurden die Reaktoren mit einer doppelt so großen Raumbelastung (2 g CSB/l*d^{-1}) wie die Reaktoren R1 - R6 betrieben. Zum anderen weisen die methanogenen *Archaea* bei dieser Temperatur eine höhere Aktivität auf. Diese zeigt sich auch zwischen Tag 40 und 95. Hier lagen die täglichen Biogasmengen mit 205 - 300 Nml/d im Mittel um 150 Nml/d höher als bei den Reaktoren mit 20 °C Betriebstemperatur. Das maximale Konfidenzintervall betrug für die Reaktoren R7 - R9 140 Nml/d, das durchschnittliche Konfidenzintervall 87 Nml/d. Somit lagen die Biogasmengen trotz des zum Teil hohen Konfidenzintervalls über denen der Reaktoren R1 - R6, die ein maximales Konfidenzintervall von 125 Nml/d aufwiesen. Gleichzeitig war die Schlammverweilzeit mit 12 d bzw. 8 d bei den 38 °C-Reaktoren kürzer als bei R1 - R6 mit 14 d.

Die methanogenen *Archaea* sind also auch bei einer Schlammverweilzeit von 8 d bei 38 °C noch in den Reaktoren aktiv, obwohl auch bei diesen Reaktoren ausschließlich feststofffreies,

synthetisches Substrat eingesetzt wurde. Dieses erschwert es den methanogenen *Archaea* im System zu verbleiben, da diese sich gewöhnlich an den Feststoffpartikeln bzw. in den Schlammflocken festsetzen. Bei den Reaktoren R1 - R6 wurde trotz der langen SRT von 14 d bereits nach 60 Tagen nur noch durchschnittlich 50 Nml/d Biogas gebildet. Der Einfluss der Temperatur auf die methanogenen *Archaea* ist also deutlich größer als der Einfluss der Schlammverweilzeit.

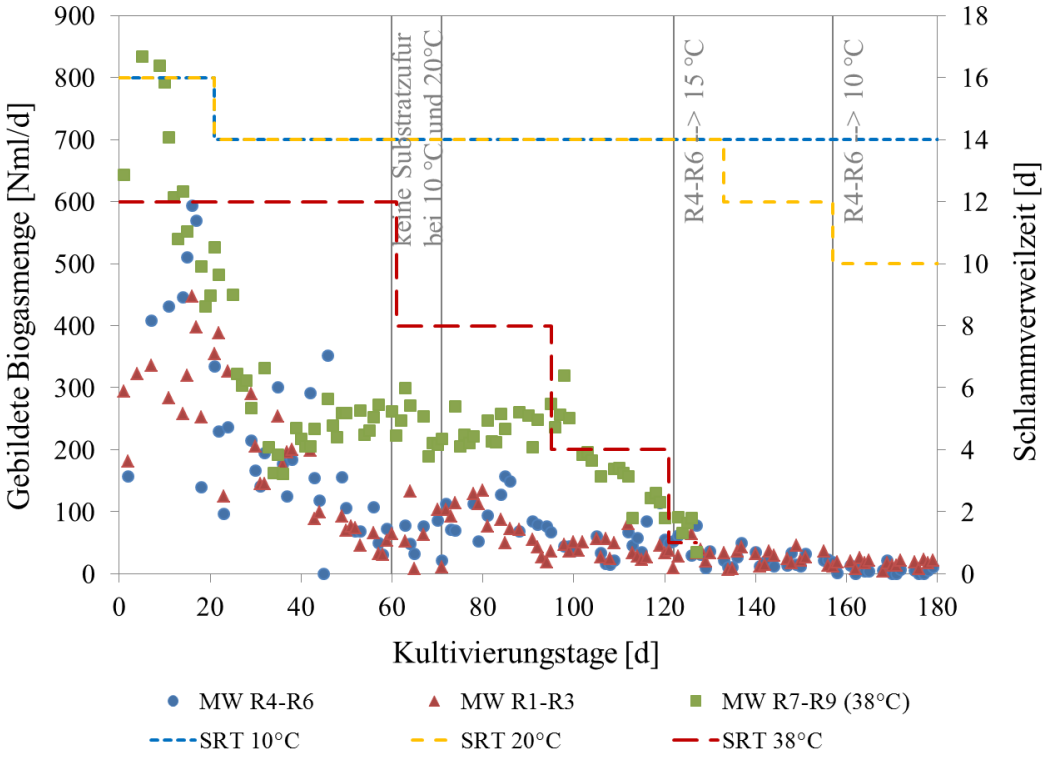

Abbildung 4-3: Verlauf der mittleren, gebildeten Biogasmengen und Schlammverweilzeiten (SRT) der Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

Für die Reaktoren R1 - R6 wurde neben der gebildeten Biogasmenge auch die Biogaszusammensetzung mittels Gaschromatographie während der ersten 145 Versuchstage gemessen. Danach war die gebildete Biogasmenge zu gering, um Gasanalysen durchführen zu können. Betrachtet wurden dabei vor allem die zwei Hauptkomponenten Methan und Kohlenstoffdioxid im Gas (siehe Abbildung 4-4).

Zu Beginn der Versuche lag der Methangehalt im für Biogasanlagen typischen Bereich von 65 - 70 %. Bis Tag 100 blieb dieser stabil bei 60 - 65 %. Die methanogenen *Archaea* haben bis zu diesem Zeitpunkt Acetat und CO_2 / H_2 zu Methan umgesetzt. Erst danach fiel der Methangehalt drastisch ab. Die methanogenen *Archaea* wurden aus den Reaktoren ausgewaschen. Der Kohlenstoffdioxidgehalt zeigt einen genau entgegengesetzten Verlauf. Von anfangs 30 % stieg der Kohlenstoffdioxidgehalt schließlich bis auf 65 %. Der Kohlenstoffdioxid

wurde in der Hydrolyse- und Acidogenesestufe weiterhin gebildet, aber in der methanogenen Stufe nicht mehr weiter umgesetzt.

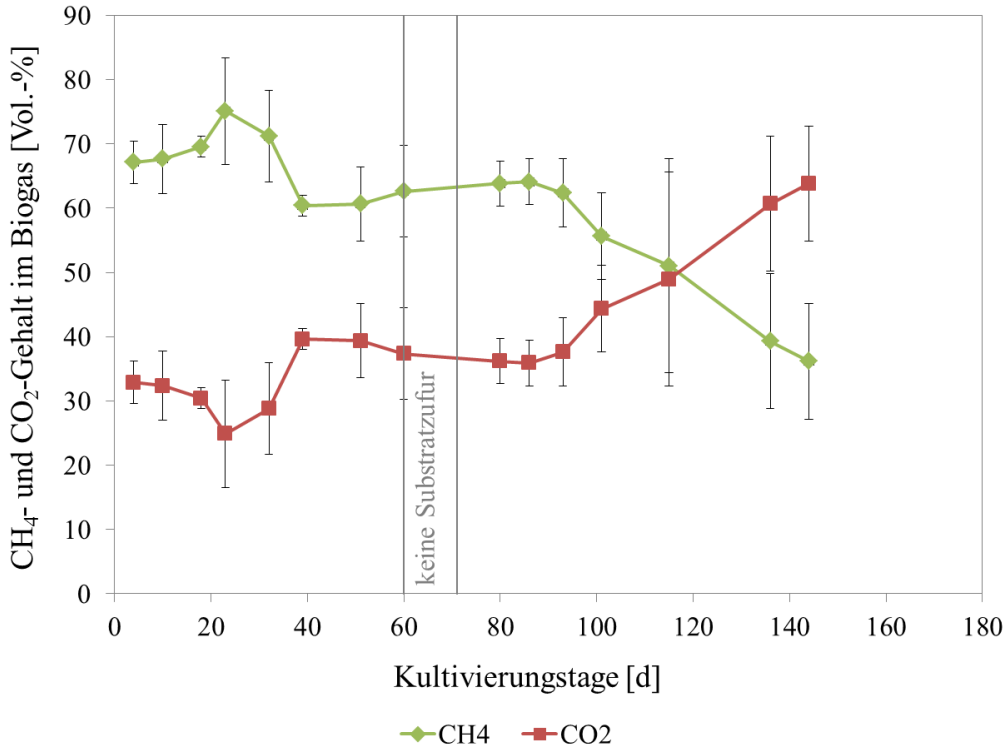

Abbildung 4-4: Mittlerer Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalt (mit den Konfidenzintervallen) im Biogas der Reaktoren R1 - R6 während der Kultivierung bei 20 °C

4.2 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand

Als Parameter für die Feststoff- und Biomassekonzentration dienten der Trockenrückstand (TR) und der organische Trockenrückstand (oTR). Abbildung 4-5 zeigt die Verläufe für die Reaktoren R1 - R6 bis zum Tag 180.

Zu Beginn der Versuche wurden der TR und oTR mit 4 % und 3 % in den Reaktoren bestimmt. Da es sich nur um Einzelwerte handelt, wurde der Übersichtlichkeit halber darauf verzichtet diese in der Abbildung 4-5 darzustellen. Weitere Messungen erfolgten erst wieder ab Tag 30. Innerhalb der ersten 40 Tage sanken der TR und oTR bis auf 0,7 % und 0,4 %. Daran ist sehr deutlich der Verlust von Schlammflocken und damit auch Bakterienflocken durch das Zuführen feststofffreien Substrates erkennbar. Die Biomasseerhöhung zwischen Tag 60 und 70 bei drei der Reaktoren (R2, R5 und R6) zeigte sich auch in einer etwas höheren Biogasproduktion als für die anderen Reaktoren. Nach etwa weiteren 30 Tagen wiesen alle sechs Reaktoren wieder vergleichbare TR- und oTR-Werte auf. Ab Tag 120 lagen diese dann konstant bei einem TR von 0,25 - 0,35 % und oTR von 0,2 - 0,3 % und veränderten sich nicht

mehr bis zum Ende der ersten Versuchsphase. Der oTR stellte ab dann fast ausschließlich die Bakterienmasse dar, denn die meisten feststoffhaltigen Schlammflocken mit den methanogenen *Archaea* waren ausgewaschen.

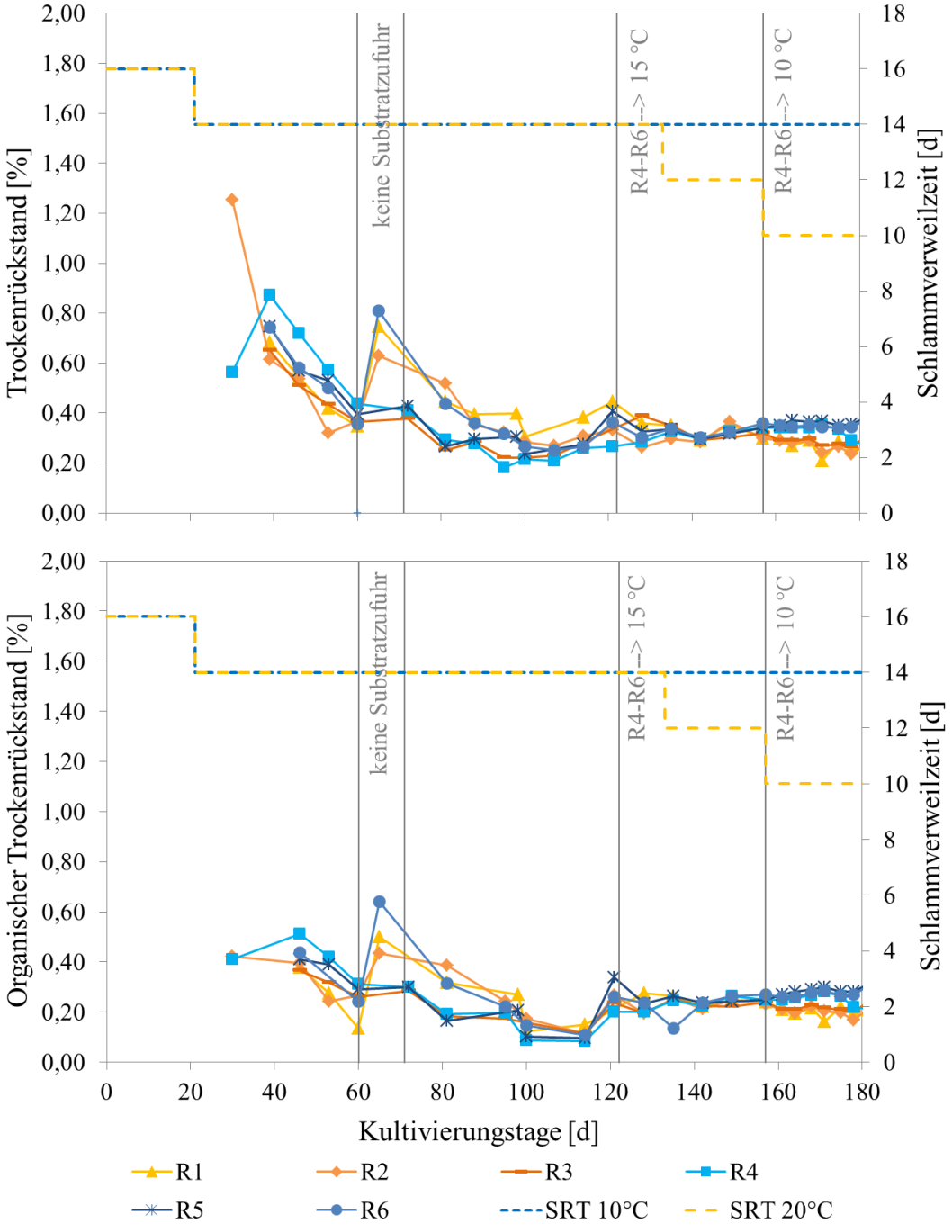

Abbildung 4-5: Verlauf von Trockenrückstand und organischen Trockenrückstand sowie der Schlammverweilzeiten (SRT) für die Reaktoren R1 - R3 (20 °C) und R4 - R6 (20 °C bzw. 10 °C)

Die TR/oTR-Werte der 38 °C-Reaktoren sind in Abbildung 4-6 dargestellt. Beim Start der Versuche lag der TR der Reaktoren bei 6 % und der oTR bei 5 %. Auch bei diesen drei Reaktoren sanken der TR und oTR deutlich innerhalb der ersten 40 Tage. Mit einem durchschnittlichen TR von 0,45 % und einem oTR von 0,3 % sind sie vergleichbar mit den TR- und oTR-Werten der Reaktoren R1 - R6.

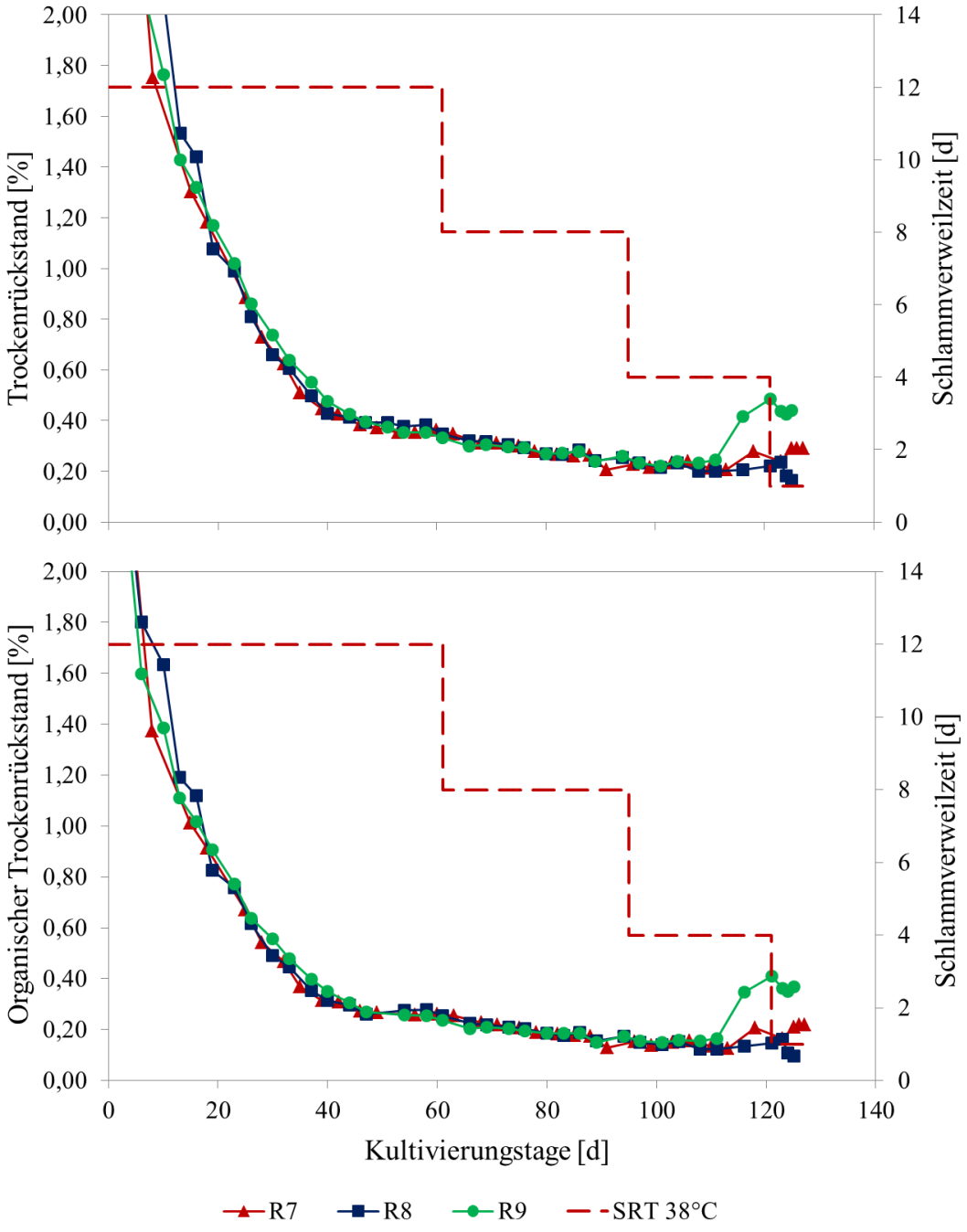

Abbildung 4-6: Verlauf von Trockenrückstand und organischen Trockenrückstand sowie der Schlammverweilzeit (SRT) für die Reaktoren R7 - R8 (38 °C)

Im weiteren Verlauf der ersten Versuchsphase blieben die TR/ oTR-Werte in allen neun Reaktoren konstant bei 0,15 - 0,25 % für den TR und 0,2 - 0,35 % für den oTR. Eine Ausnahme bildeten nur die drei Reaktoren R1, R2 und R6. Durch die Zugabe von neuem Schlamm am Tag 60 kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg vom TR und oTR. Nach 30 Tagen lagen diese jedoch wieder im Bereich der anderen drei Reaktoren. Somit besaßen während der gesamten ersten Versuchsphase alle neun Reaktoren ungefähr die gleiche Biomassekonzentration. Trotzdem lagen die Biogasmengen für die 38 °C-Reaktoren vor allem in dem Zeitraum vom Tag 60 bis Tag 110 im Mittel um 150 Nml/d höher als bei den 20 °C-Reaktoren (siehe Abbildung 4-3). Grund dafür sind die größere Anzahl und die höhere Aktivität der methanogenen *Archaea* in den 38 °C-Reaktoren aufgrund der höheren Temperatur.

Insgesamt zeigen die Verläufe der Trockenrückstände und organischen Trockenrückstände eine gute Übereinstimmung zwischen den Reaktoren R1 - R6 sowie zwischen R7 - R9.

4.3 Organische Säuren, CSB und pH-Wert

Neben der gebildeten Biogasmenge und -zusammensetzung wurden auch die organischen Säuren (C2 - C8), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) sowie der pH-Wert im Filtrat gemessen. Der CSB ist ein Summenparameter für alle organischen Substanzen in der Flüssigphase und Ausdruck für den Energiegehalt.

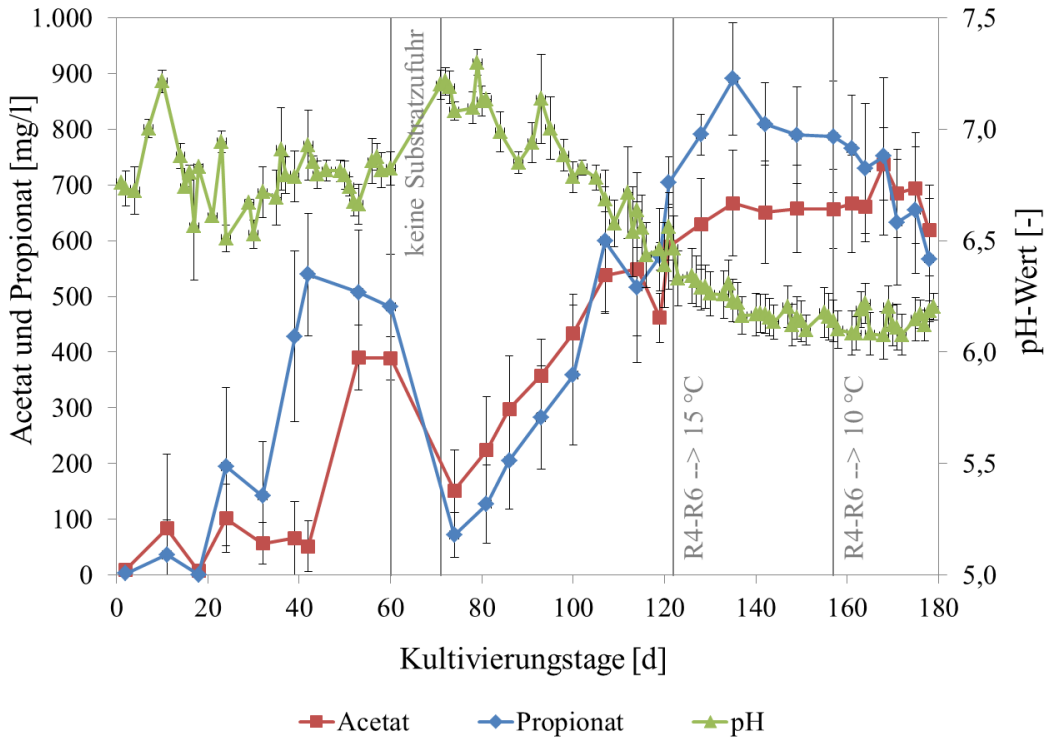

Abbildung 4-7: Verlauf der Acetat- und Propionatkonzentration als Mittelwerte für R1 - R6 und des pH-Werts mit den Konfidenzintervallen

In Abbildung 4-7 sind die Konzentrationsverläufe für Acetat und Propionat als Mittelwerte (mit Konfidenzintervallen) für die Reaktoren R1 - R6 sowie der über alle sechs Reaktoren gemittelte pH-Wert dargestellt. Nach einer kurzen Phase mit niedrigen Acetat- und Propionatkonzentrationen stiegen diese bis Tag 60 auf 360 ± 66 mg/l und 415 ± 143 mg/l. Durch das Auswaschen der methanogenen *Archaea* konnten die organischen Säuren nicht mehr so schnell abgebaut werden und deren Konzentration stieg. Im Zeitraum ohne Substratzufuhr (Tag 60 bis 71) hatten die acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea* ausreichend Zeit, die organischen Säuren wieder abzubauen. Wenige Tage nach der erneuten Substratzufuhr und dem weiteren Auswaschen der methanogenen *Archaea* sind auch die Acetat- und Propionatkonzentration wieder angestiegen. Ihr Maximum haben diese nach 135 Versuchstagen bei einer Acetatkonzentration von 670 ± 109 mg/l und einer Propionat-konzentration von 890 ± 73 mg/l erreicht.

Der pH-Wert fiel trotz der steigenden Konzentration an organischen Säuren von anfangs 6,8 - 7,2 nur auf 6,0 - 6,3 ab, da er durch das gebildete Ammonium aus den Proteinverbindungen gepuffert wurde. Die Säurebildner waren, im Gegensatz zu den methanogenen *Archaea*, weiter aktiv und bildeten Acetat, Propionat und andere Stoffwechselprodukte.

Die Stickstoffverbindungen im Substrat wirken der Versäuerung entgegen und verhindern ein weiteres Absinken des pH-Wertes.

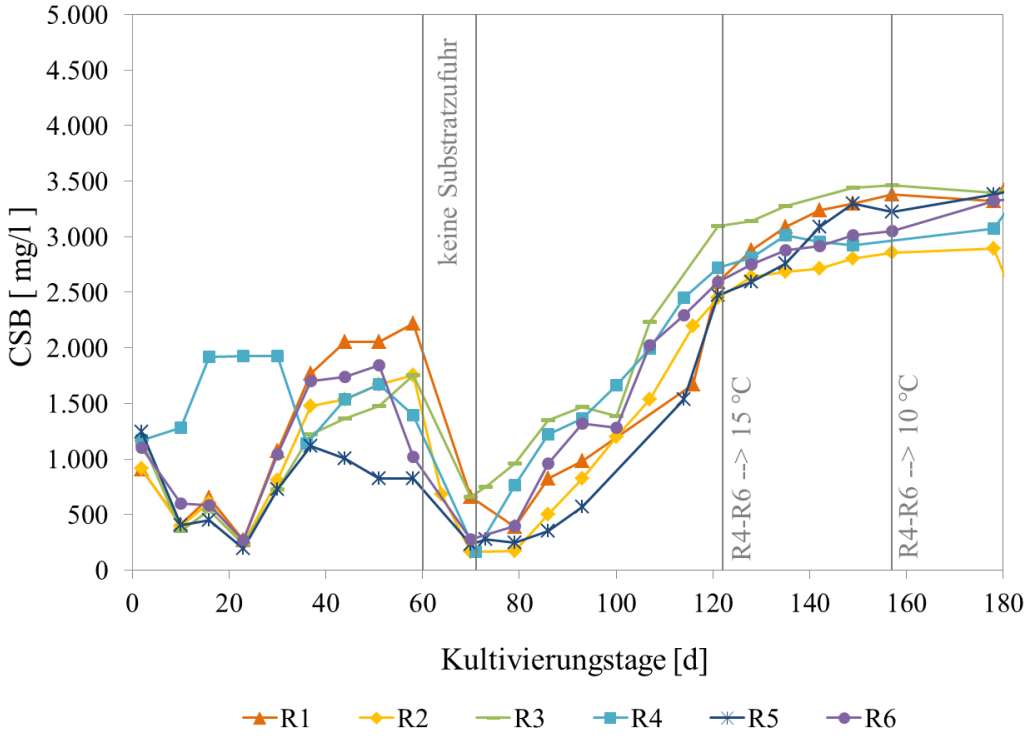

Abbildung 4-8: Verlauf der CSB-Konzentrationen im Filtrat der Reaktoren R1 - R6

Der CSB zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 4-8) wie der von Acetat und Propionat. Zwischen Tag 21 und 60 stieg die CSB-Konzentration in den Reaktoren R1 - R6 an, da die methanogenen *Archaea* langsam aus den Reaktoren ausgetragen wurden und so die Umsetzung zu Methan und CO_2 geringer wurde. Während des Substratstopps konnten diese wieder wachsen, ohne ausgewaschen zu werden. Acetat und andere Verbindungen wurden wieder abgebaut. Mit dem weiteren Auswaschen stiegen auch die CSB-Konzentrationen erneut, bis sie bei 3000 - 3500 mg/l ihr Maximum erreichten. Die Änderung der Temperatur von 20 °C auf zunächst 15 °C und dann 10 °C bei R4 - R6 zeigte keinen Einfluss.

Bei den 38 °C-Reaktoren fand sich für SRT = 12 d bei R8 und R9 eine CSB-Konzentration von 2.200 - 2.800 mg/l, während diese für R7 schon bei knapp 3200 mg/l lag. Für eine Schlammverweilzeit von 4 d lag der CSB bei allen drei Reaktoren um die 3500 - 4000 mg/l und blieb bis zum Ende der Versuche in diesem Bereich.

4.4 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen konnte die Aktivität der methanogenen *Archaea* direkt beobachtet werden. Dabei wurde der für methanogene *Archaea* spezifische Cofaktor F420 mit Licht bei 420 nm angeregt, so dass diese blau-grün leuchteten. Die Aufnahmen in Abbildung 4-9 zeigen beispielhaft die methanogenen *Archaea* in Reaktor R2 (20 °C) zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Nach den ersten 30 Tagen waren noch sehr viele methanogene *Archaea* im Reaktor. Diese verschwanden aber im Verlauf der Kultivierung trotz der noch langen Schlammverweilzeiten. So lag die Schlammverweilzeit nach 113 Tagen bei 14 d und nach 164 Tagen Kultivierung immerhin noch bei 10 d.

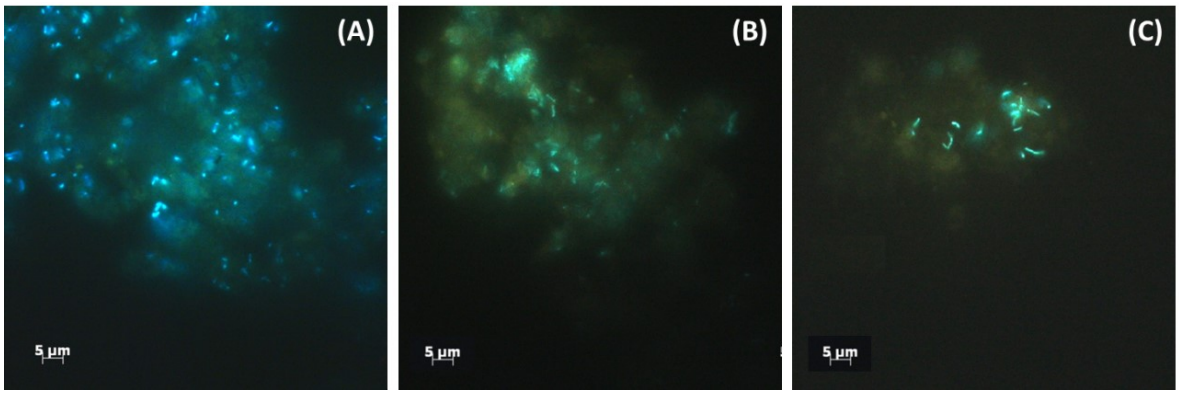

Abbildung 4-9: Methanogene *Archaea* in Reaktor R2 nach (A) 30 d, (B) 113 d und (C) 164 d Kultivierung, T = 20 °C, SRT = 14 d (A + B) und 10 d (C)

Gut zu sehen ist, dass die methanogenen *Archaea* ausschließlich in den Schlammflocken eingebettet vorliegen. Da mit dem synthetischen Abwasser keine neuen Feststoffe in die Reaktoren eingetragen wurden, hatten die *Archaea* keine Möglichkeit, sich dort festzusetzen und wurden so mit der Zeit „ausgewaschen“. Einzelne Schlammflocken konnten auch nach 170

Tagen und länger noch in den Reaktoren beobachtet werden, aber kein Leuchten der methanogenen *Archaea*. Es scheint also zusätzlich eine Hemmung durch die organischen Säuren eingesetzt zu haben.

Zu Beginn der ersten Versuchsphase war eine Mischung aus methanogenen *Archaea* verschiedener Morphologie in den 20 °C-Reaktoren zu erkennen. Vor allem die kleinen Stäbchen von *Methanobacterium sp.* und *Methanobrevibacter sp.*, aber auch Kokken von *Methanosarcina sp.*. Nach 164 Versuchstagen ließen sich schließlich fast nur noch kleine Stäbchen beobachten.

Die Reaktoren mit 38 °C Betriebstemperatur zeigten in den ersten 30 Tagen ein ähnliches Bild in der Morphologie der methanogenen *Archaea* (Abbildung 4-10, Bild (A)) wie die 20°C-Reaktoren. Nach 65 Versuchstagen (B, SRT = 12 d) konnten erstmals in einem der drei Reaktoren (R9) vereinzelt Zellagglomerate von *Methanosarcina sp*. beobachtet werden. Diese nahmen im Verlauf der Kultivierung zu. Nach 95 Tagen (C, SRT = 8 d) tauchten auch in R7 und R8 *Methanosarcina*-Pakete auf. Den größten Anteil an methanogenen Zellen machten aber während der gesamten Versuchsdauer die kleinen Stäbchen von *Methanobacterium sp.* aus.

Nach 110 Tagen (D, SRT = 4 d) nahm die Leuchtkraft der methanogenen *Archaea* in R7 und R9 stark ab und es waren nur noch wenige vorhanden. In R8 leuchteten sie etwas stärker. Schließlich waren am 121. Versuchstag (SRT = 4 d) bei keinem der drei 38 °C-Reaktoren mehr methanogene *Archaea* im violett angeregten Licht des Mikroskops sichtbar.

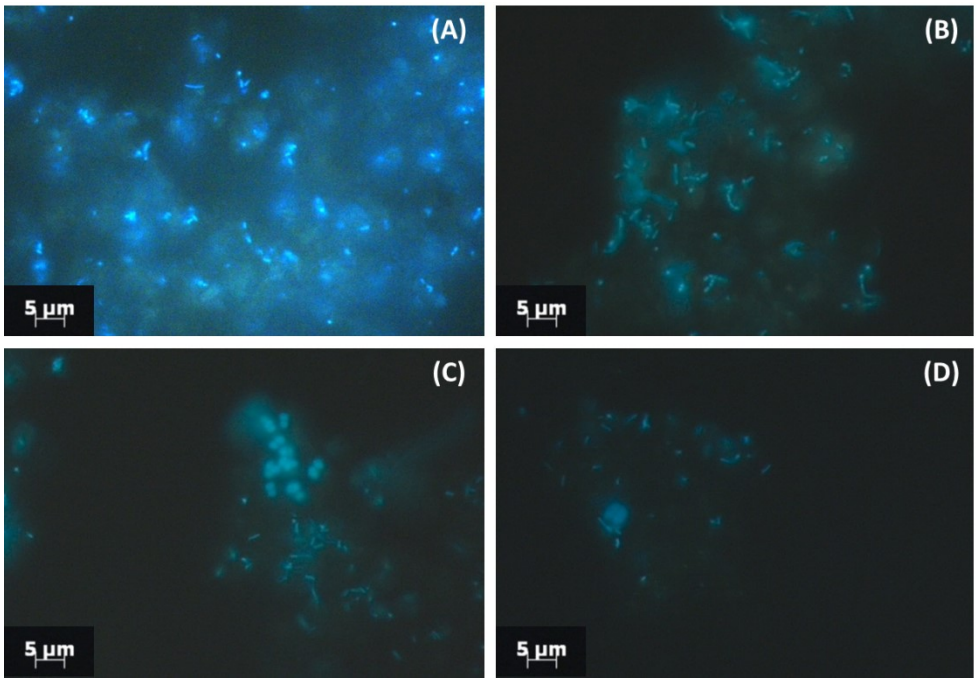

Abbildung 4-10: Methanogene *Archaea* in den Reaktoren R7 - R9 (38 °C) zum (A) Startzeitpunkt, nach (B) 65 Tagen, nach (C) 95 Tagen und nach (D) 110 Tagen. Ab etwa 90 Tagen lassen sich neben kleinen Stäbchen (*Methanobacterium sp.*) und Kokken auch Zellagglomerate von *Methanosarcina sp.* beobachten.

5 Ergebnisse der II. Versuchsphase – Charakterisierung der Aidogenese

Die zweite Versuchsphase erstreckte sich über einen Zeitraum von knapp 160 Tagen. Ziel dieser zweiten Versuchsphase war die Charakterisierung der acidogenen Bakterien und die Bestimmung der Produkte der Acidogenese. Eine Untersuchung der acidogenen Phase des anaeroben Abbaus unter Anwesenheit der acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea* war nur eingeschränkt möglich, da die Zwischenprodukte der Acidogenese direkt umgesetzt wurden und so nur schwer bis gar nicht nachweisbar waren. Die acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea* wurden daher durch entsprechend niedrige Schlammverweilzeiten und Zufuhr eines feststofffreien, synthetischen Abwassers (OECD-Medium) in der ersten Versuchsphase (siehe Kapitel 4) aus den Reaktoren R1 - R9 ausgewaschen.

Die Charakterisierung der acidogenen Bakterien und die Bestimmung der Produkte erfolgten für Schlammverweilzeiten zwischen 14 d und 1 d. Dabei wurde neben der Biomassekonzentration (Abschnitt 5.1) das Spektrum der kurzkettigen, organischen Säuren (C2 - C8) und alkoholischen Gärprodukte analysiert (Abschnitte 5.2 und 5.4). Diese bilden die Hauptprodukte der Versäuerung von Kohlenhydrat- und Proteinverbindungen. Die Charakterisierung der acidogenen Mikroorganismen erfolgte mit Hilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen und molekularbiologischen Methoden (FISH, Metaproteomanalyse), um eine ganzheitliche Betrachtung zu ermöglichen (Abschnitte 5.5, 5.6 und 5.7).

5.1 Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration wird durch die Parameter TR und oTR beschrieben. In der ersten Versuchsphase haben diese beiden Parameter neben den Bakterien noch einen großen Teil anderer organischer Feststoffe beinhaltet. Diese wurden im Verlauf der ersten Versuchsphase aus den Reaktoren ausgetragen. Durch die Zufuhr von feststofffreiem Medium bestand die Biomasse in der zweiten Versuchsphase fast ausschließlich aus Bakterien. Während zu Beginn der Versuche die Feststoffkonzentration stark abnahm (siehe Abbildung 4-5), hat diese sich in der zweiten Versuchsphase nur noch wenig verändert. Abbildung 5-1 zeigt den TR und den oTR in Abhängigkeit von der Schlammverweilzeit (12 d bis 1 d) als Mittelwerte mit den Konfidenzintervallen für die Reaktoren mit 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur.

Für die 10 °C- und 20 °C-Reaktoren ist zwischen SRT = 12 d und 6 d der TR von knapp 0,5 % auf 0,3 % gesunken und der oTR von 0,4 % auf durchschnittlich 0,25 %. Diese leichte Abnahme ist auf ein Auswaschen weiterer Bakterien zurückzuführen, deren Generationszeit länger war als die Schlammverweilzeit. Bei den 10 °C-Reaktoren zeigt der oTR einen kleinen Sprung zwischen 8 d und 6 d Schlammverweilzeit, während bei den 20 °C-Reaktoren dieser Sprung zwischen 6 d und 4 d auftrat. Ab einer Schlammverweilzeit von 4 d gab es keine signifikanten Veränderungen mehr im TR und oTR. Alle Feststoffe waren weitgehend ausge-

waschen und nur noch Mikroorganismen vorhanden. Die Farbe des Schlamms hat sich von anfangs fast schwarz zu beige und transparent verändert. In Abbildung 5-2 ist erkennbar, wie zwischen der Schlammverweilzeit von 8 d und 1 d die Biomassekonzentration nur noch leicht abnahm, aber schon das typische Aussehen einer Bakteriensuspension aufwies.

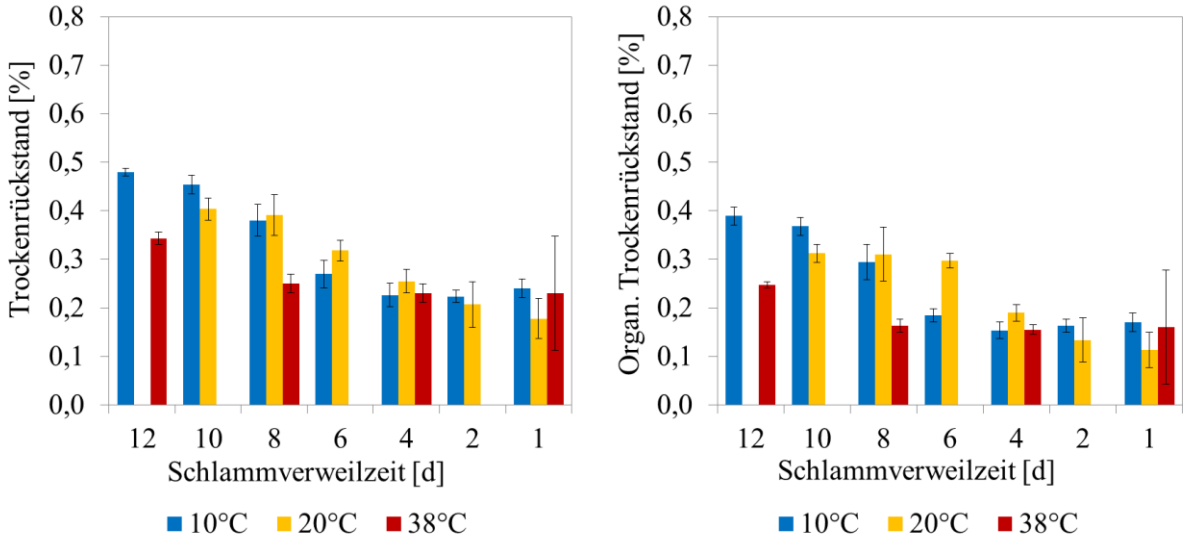

Abbildung 5-1: Mittlerer Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand mit Konfidenzintervallen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C und Schlammverweilzeiten von 12 d bis 1d

Abbildung 5-2: links: R2 bei SRT = 8 d. Die Biomasse besteht fast nur noch aus Mikroorganismen und nur noch wenigen anderen Feststoffen. Rechts: Reaktoren R1 - R3 bei SRT = 1 d. Die Konzentration an Biomasse hat etwas abgenommen. Nur die schnell wachsenden Mikroorganismen sind noch in den Reaktoren verblieben.

Die TR- und oTR-Werte der 38 °C-Reaktoren lagen bei 12 d und 8 d Schlammverweilzeit etwas niedriger als bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren. Zwischen diesen zwei Schlammverweilzeiten zeigt sich auch ein kleiner Sprung im oTR-Wert. Der TR sank dabei von 0,35 % auf 0,25 % und der oTR von 0,25 % auf 0,15 %. Danach blieben TR und oTR konstant. Ab einer Schlammverweilzeit von 4 d gab es keine Unterschiede mehr zwischen den neun Reaktoren.

Es dominierten jetzt in allen Reaktoren, unabhängig von der Temperatur, nur noch schnell wachsende, hydrolysierende/versäuernde Bakterien. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Populationen wurde mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Metaproteomanalyse untersucht.

5.2 pH-Wert

Die Art der gebildeten Metabolite (organischen Säuren und Alkohole) und die Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation sind abhängig von den Milieubedingungen, wie Art des Substrates, Temperatur und pH-Wert.

Abbildung 5-3 zeigt den Verlauf der pH-Werte sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C während der zweiten Versuchsphase. Die pH-Werte in den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren sind sehr ähnlich und zeigen einen fast identischen Verlauf mit Werten zwischen 6,6 und 5,8. Der pH-Wert bleibt konstant über den gesamten Versuchszeitraum. In den 38 °C-Reaktoren lag der pH-Wert bis Tag 100 im Durchschnitt höher, bei 7,5 bis 6,5. In diesem Zeitraum waren noch acetogene Bakterien und methanogene *Archaea* aktiv. Letztere verbrauchen Wasserstoff, wodurch der Wasserstoffpartialdruck niedrig blieb und der pH-Wert nicht abgesunken ist. Als diese schließlich aus den Reaktoren ausgewaschen wurden, fiel auch der pH-Wert deutlich ab, bis auf 4,0.

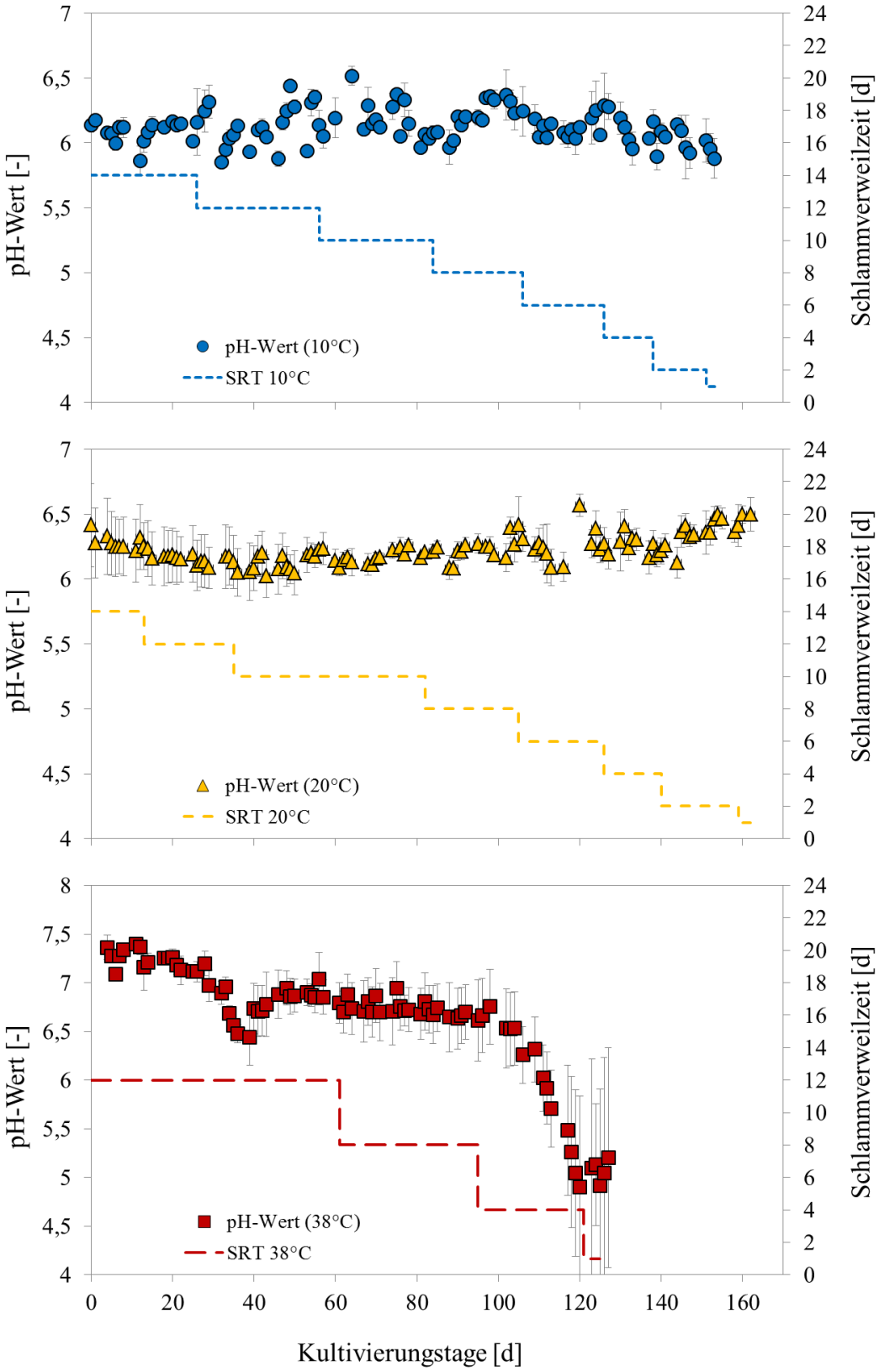

Abbildung 5-3: Verlauf der pH-Werte sowie der Schlammverweilzeiten (SRT) für die Reaktoren mit 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

5.3 Spektrum der organischen Säuren

Es wurde zweimal wöchentlich die Konzentration der organischen Säuren (C1 - C8) im Filtrat der Reaktoren R1 - R9 gemessen. Die Gesamtkonzentration der organischen Säuren in den Reaktoren vom Beginn der zweiten Versuchsphase bis zum Ende der Versuche ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Die Konzentrationen der 10 °C- und 20 °C-Reaktoren lagen fast über den gesamten Versuchszeitraum im Bereich von 1.800 - 2.400 mg/l. Erst gegen Versuchsende, bei SRT = 4 d und 1 d, sanken die Konzentrationen etwas ab, auf 1.600 - 2.000 mg/l. Die eingestellte hydraulische Verweilzeit (HRT = 2,5 d) blieb während des gesamten Versuchs gleich. Die Ursache für die sinkenden Konzentrationen lag somit in der niedrigen Schlammverweilzeit von 1 d. Diese war kürzer, als die Generationszeiten einiger acidogener Bakterien, so dass diese aus den Reaktoren verschwanden und keine organischen Säuren mehr bilden konnten.

Der Verlauf für die 38 °C-Reaktoren ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit methanogener *Archaea*, die Acetat verwerten. Daher ist bis Tag 30 die Konzentration der organischen Säuren noch gering. Zwischen Tag 30 und 70 lag diese bei 1600 mg/l und stieg bei den Schlammverweilzeiten von 8 d und 4 d jeweils an. Die Konzentration erreichte dann vergleichbare Werte wie für die 10 °C- und 20 °C-Reaktoren.

Da Essigsäure und Propionsäure die zwei meistgebildeten Säuren darstellen, wurden diese nochmals separat betrachtet (siehe Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6). Dabei wurden, trotz gleicher Gesamtkonzentrationen der organischen Säuren in allen Reaktoren, deutliche Unterschiede zwischen den Reaktoren der verschiedenen Temperaturen sichtbar. Die Ursache dafür kann in temperaturbedingten Unterschieden der Mikroorganismenaktivität oder der unterschiedlichen Zusammensetzung der Biozönosen liegen. Diese haben sich aufgrund der verschiedenen Temperaturen unterschiedlich entwickelt.

Die Acetatkonzentration lag in den 10 °C-Reaktoren mit 700 - 1.000 mg/l während des gesamten Versuchszeitraums deutlich höher als in den 20 °C-Reaktoren, in denen diese nur 450 - 650 mg/l betrug. In den 38 °C-Reaktoren war zu Beginn kein Acetat im Filtrat nachweisbar, da dieses durch die methanogenen *Archaea* sofort zu Methan abgebaut wurde. Als diese dann nach und nach „ausgewaschen“ wurden, erhöhte sich die Acetatkonzentration stetig bis auf 800 mg/l am Tag 40. Danach fiel diese wieder auf 250 - 500 mg/l. In diesem Zeitraum, zwischen Tag 40 und 100, hat sich die Gasproduktion bei 200 - 300 Nml/d stabilisiert (siehe Abbildung 4-3). R7 und R9 haben etwas weniger Gas gebildet als R8. Während dieser Zeit traten weder Temperaturschwankungen noch Veränderungen im Substrat auf. Die Ursache kann also nur in der Populationszusammensetzung liegen. Erst bei einer Schlammverweilzeit von 4 d zeigte sich wieder ein deutlicher Anstieg auf 700 - 800 mg/l. Ab diesem Zeitpunkt gab es nur noch wenige bis keine methanogenen *Archaea* mehr in den Reaktoren.

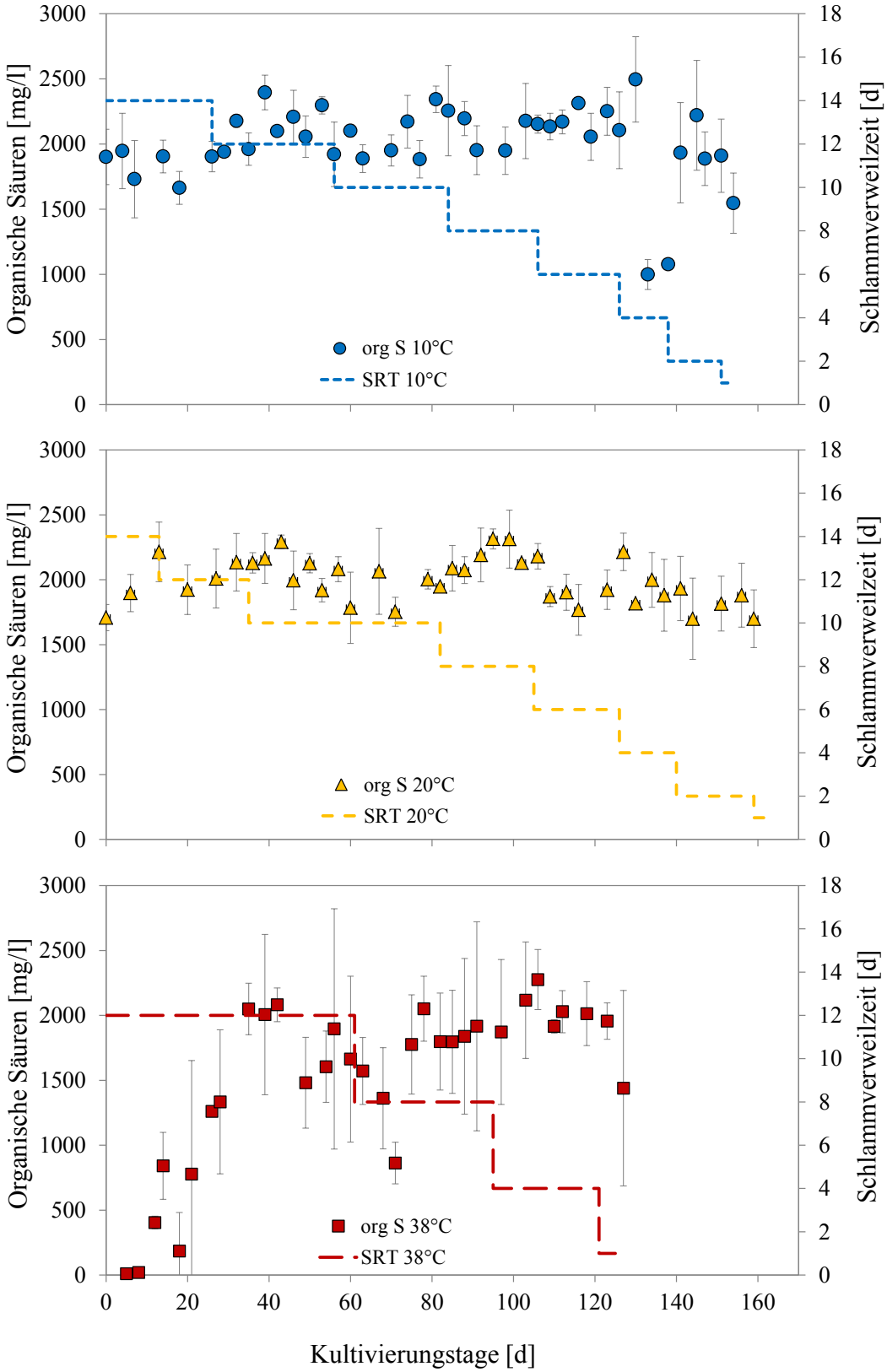

Abbildung 5-4: Mittlere Konzentrationen der organischen Säuren sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

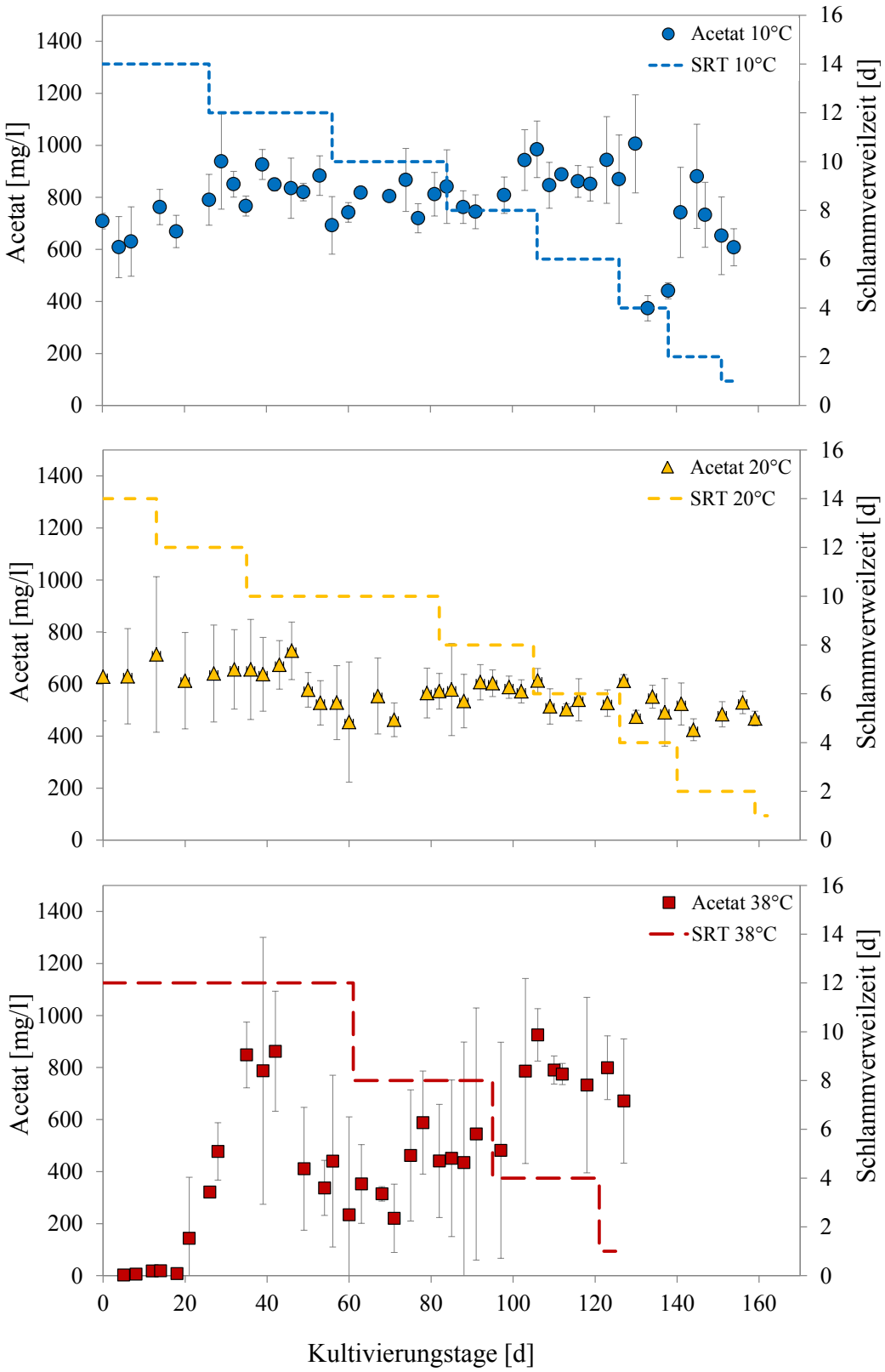

Abbildung 5-5: Mittlere Acetatkonzentrationen sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

Im Gegensatz zur Acetatkonzentration war die Propionatkonzentration in den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren während des gesamten Versuchszeitraums nahezu identisch. Nur zu Beginn lag diese in den 20 °C-Reaktoren mit 800 mg/l etwas höher als in den 10 °C-Reaktoren (600 - 700 mg/l). In den 38 °C-Reaktoren verhielt es sich deutlich anders. Innerhalb der ersten 60 Tage kam es zu einem deutlichen Anstieg der Propionatkonzentration, die etwa bis Tag 100 konstant bei 800 - 900 mg/l verblieb (während einer SRT von 8 d). In dieser Zeit konnte auch eine konstante Biogasbildung gemessen werden. Dieses Phänomen hat zwei Ursachen. Die langsam wachsenden acetogenen Bakterien wurden, wie die methanogenen *Archaea*, langsam aus den Reaktoren „ausgewaschen“. So waren sie nicht mehr in der Lage das gebildete Propionat abzubauen. Dies stabilisierte sich zwischen Tag 60 und 100. In dieser Zeit waren noch einige acetogene Bakterien und methanogene *Archaea* aktiv. Das die Propionatkonzentration in diesem Zeitraum aber sogar höher war, als bei den Reaktoren mit 10 °C und 20 °C Betriebstemperatur, kann nur in der Zusammensetzung der Bakterienpopulation gelegen haben. In den 38 °C-Reaktoren müssen mehr Propionat-bildende Bakterien, wie beispielsweise bestimmte Clostridien und Propionibakterien, aktiv gewesen sein. Auch Maspolim et al (2015) fanden in ihrem mesophilen, acidogenen Reaktor höhere Propionatkonzentrationen als Acetatkonzentrationen. Bei 4 d Schlammverweilzeit sank die Propionatkonzentration auf 650 - 750 mg/l und schließlich bis auf 400 mg/l bei der Schlammverweilzeit von 1 d.

Die mittleren Konzentrationen der anderen gemessenen organischen Säuren, iso-Buttersäure, Buttersäure, iso-Valeriansäure, Valeriansäure und Capronsäure, sind in Abbildung 5-7 dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden keine Konfidenzintervalle dargestellt, sondern ausschließlich im Text angegeben. Die Verläufe für die Reaktoren unterschiedlicher Temperatur sind vergleichbar. Sie lagen bei allen neun Reaktoren durchschnittlich im Bereich von 1 - 290 mg/l, je nach organischer Säure.

Insgesamt waren die Konzentrationen bei 10 °C und 20 °C jedoch etwas höher als bei 38 °C. Die Iso-Buttersäure war mit 80 ± 2 mg/l (Konfidenz ± 8 - 21 mg/l) bei allen Temperaturen gleich. Butyrat wies mit 278 mg/l (Konfidenz ± 68 mg/l) in den 20 °C-Reaktoren die höchsten und in den 38 °C-Reaktoren, mit 127 mg/l (Konfidenz ± 55 mg/l) die niedrigsten Konzentrationen auf. Ebenso verhielt es sich für die Konzentrationen an Valeriansäure und Capronsäure. Die iso-Valeriansäure wies bei 38 °C die höchste Konzentration (232 mg/l, Konfidenz ± 62 mg/l) auf, während es bei den anderen zwei Temperaturen die Buttersäure und Valeriansäure waren. In den 10 °C-Reaktoren lagen diese bei durchschnittlich 239 mg/l (Konfidenz ± 33 mg/l) und 244 mg/l (Konfidenz ± 47 mg/l), in den 20 °C-Reaktoren bei 296 mg/l (Konfidenz ± 68 mg/l) und 326 mg/l (Konfidenz ± 86 mg/l).

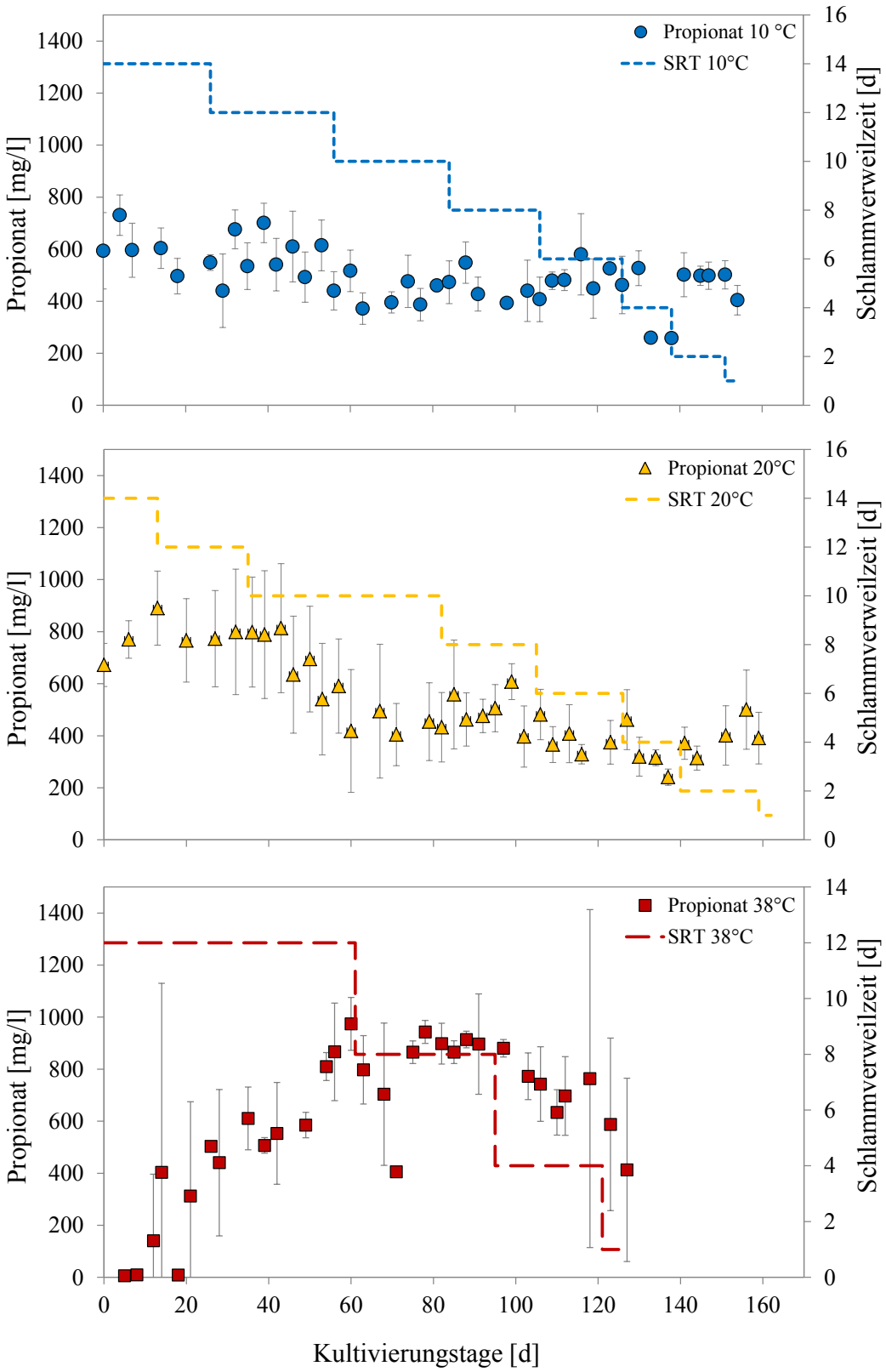

Abbildung 5-6: Mittlere Propionatkonzentrationen sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

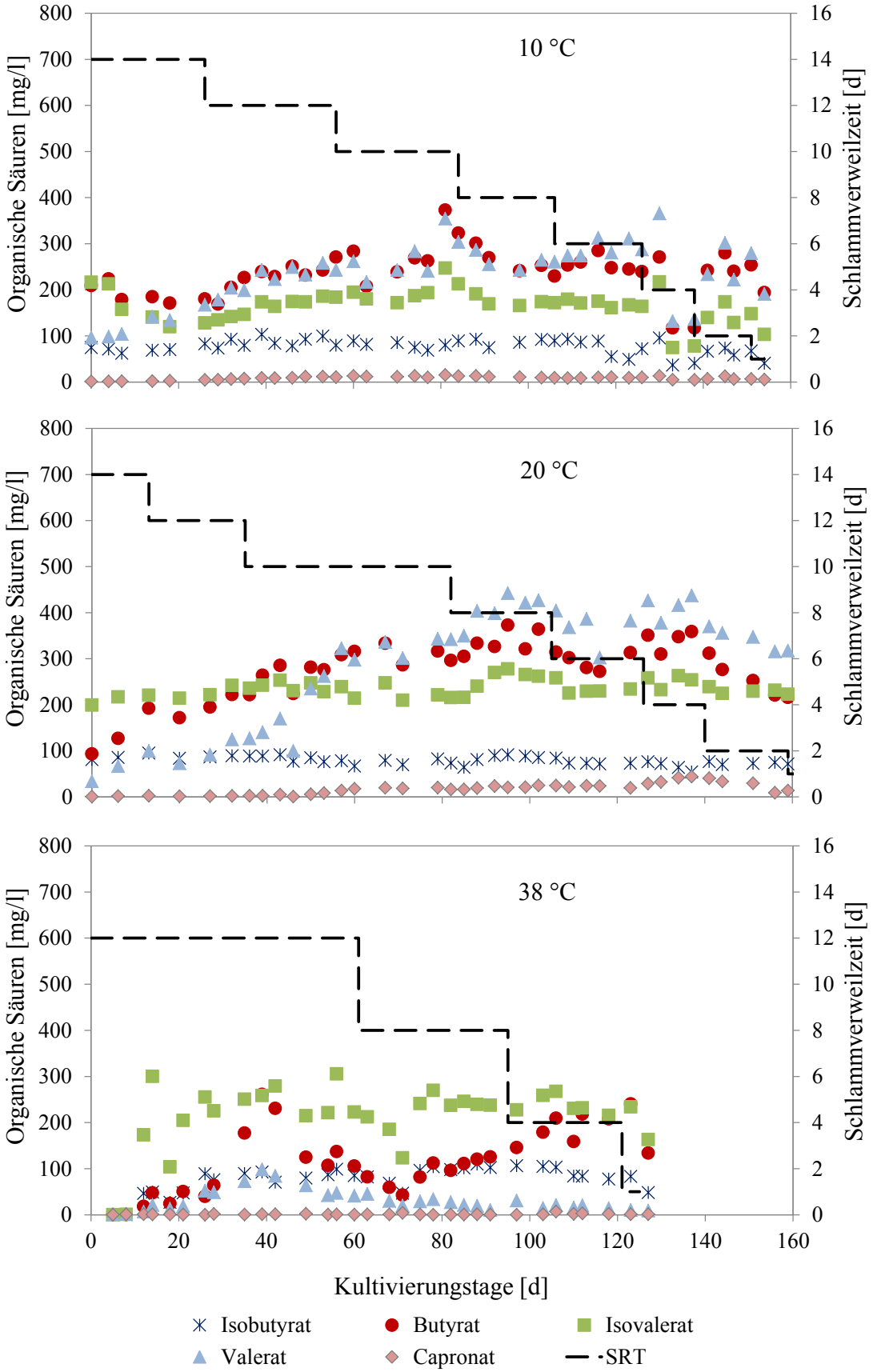

Abbildung 5-7: Mittlere Konzentrationen weiterer organischer Säuren sowie die Schlammverweilzeiten (SRT) der anaeroben Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur

5.4 Alkoholische Gärprodukte

Neben den organischen Säuren produzieren die acidogenen Bakterien auch verschiedene Alkohole aus Glucose und anderen Kohlenstoffverbindungen.

Für die Schlammverweilzeiten von 8 d, 4 d und 1 d wurden die Konzentrationen der verschiedenen Alkohole im Filtrat der Reaktoren R1 - R9 mittels HPLC gemessen. In den Abbildungen 5-8 bis 5-10 sind die mittleren Konzentrationen mit den zugehörigen Konfidenzintervallen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C Betriebstemperatur dargestellt.

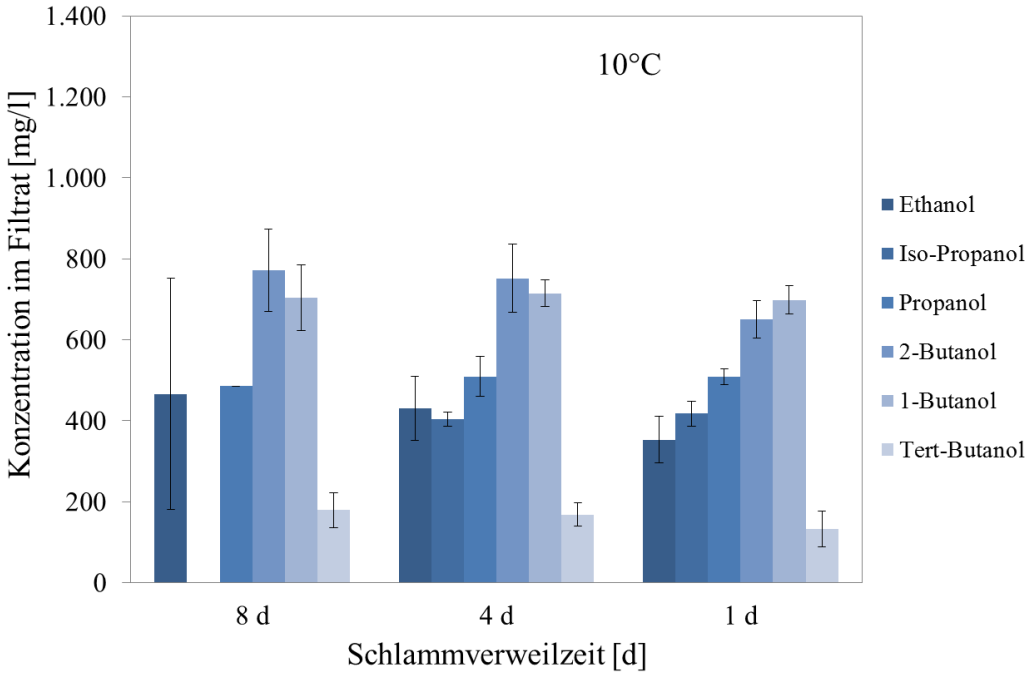

Abbildung 5-8: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 10 °C-Reaktoren (R4 - R6) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen

Die Reaktoren bei 10 °C und 20 °C zeigten ein vergleichbares Spektrum der verschiedenen Alkohole mit vergleichbaren Konzentrationen im Bereich von 200 - 900 mg/l. Dabei wiesen 1-Butanol und 2-Butanol die höchsten Konzentrationen im Filtrat auf. Kein Iso-Propanol war bei 10 °C mit 8 d Schlammverweilzeit nachweisbar, das ebenfalls bei 20 °C mit 4 d und 1 d Schlammverweilzeit fehlte.

Bei den 38 °C-Reaktoren konnten insgesamt nur sehr geringe Konzentrationen an Alkoholen nachgewiesen werden. Ethanol wies mit 350 - 400 mg/l bei 8 d und 4 d Schlammverweilzeit die höchsten Konzentrationen auf. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den drei Reaktoren sehr groß, wie die sehr großen Konfidenzintervalle zeigen. Der Wert schwankte zwischen 0 mg/l und 1.000 mg/l je nach Reaktor. Bei 1 d Schlammverweilzeit lag die Konzentration zwischen 0 mg/l (R8) und 146 mg/l (R7). Die Konzentrationen der anderen Alkohole lagen bei allen drei Schlammverweilzeiten zwischen 0 mg/l und 180 mg/l.

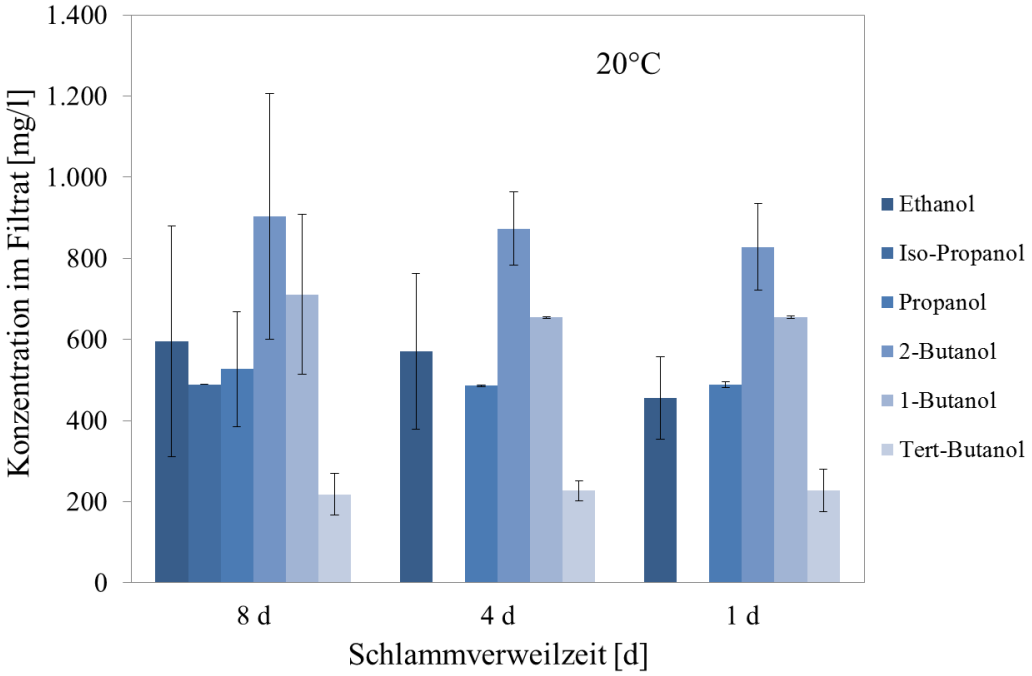

Abbildung 5-9: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 20 °C-Reaktoren (R1 - R3) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen

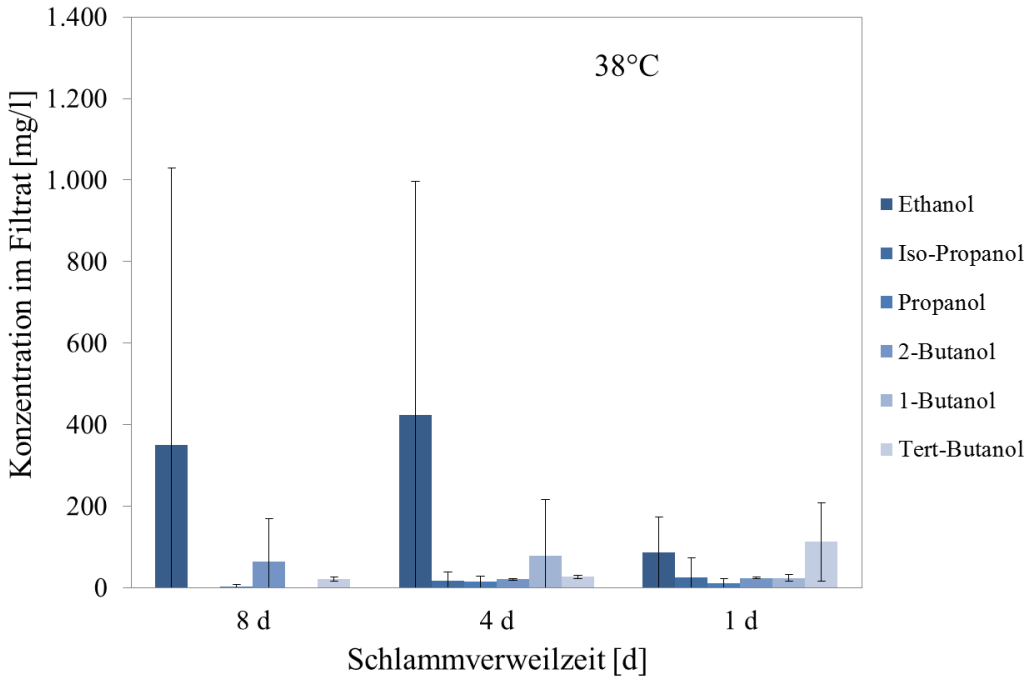

Abbildung 5-10: Mittlere Konzentrationen verschiedener, gebildeter Alkohole im Filtrat der 38 °C-Reaktoren (R7 - R9) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen

5.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen ermöglichten eine direkte Beobachtung der Mikroorganismen sowie der Veränderungen in der Populationszusammensetzung der Reaktoren im Verlauf der Versuche. Dabei konnten Unterschiede zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen beobachtet werden, aber auch innerhalb der Reaktoren gleicher Temperatur. Abbildung 5-11 zeigt Aufnahmen aller neun Reaktoren bei einer Schlammverweilzeit von 1 d. Vergleicht man die Aufnahmen der Reaktoren gleicher Temperatur, so zeigten sich innerhalb der 10 °C-Reaktoren (R4 - R6) keine sichtbaren Unterschiede in der Zellmorphologie. In allen drei Reaktoren fanden sich vorwiegend kleine Kokken und einige kleine Stäbchen.

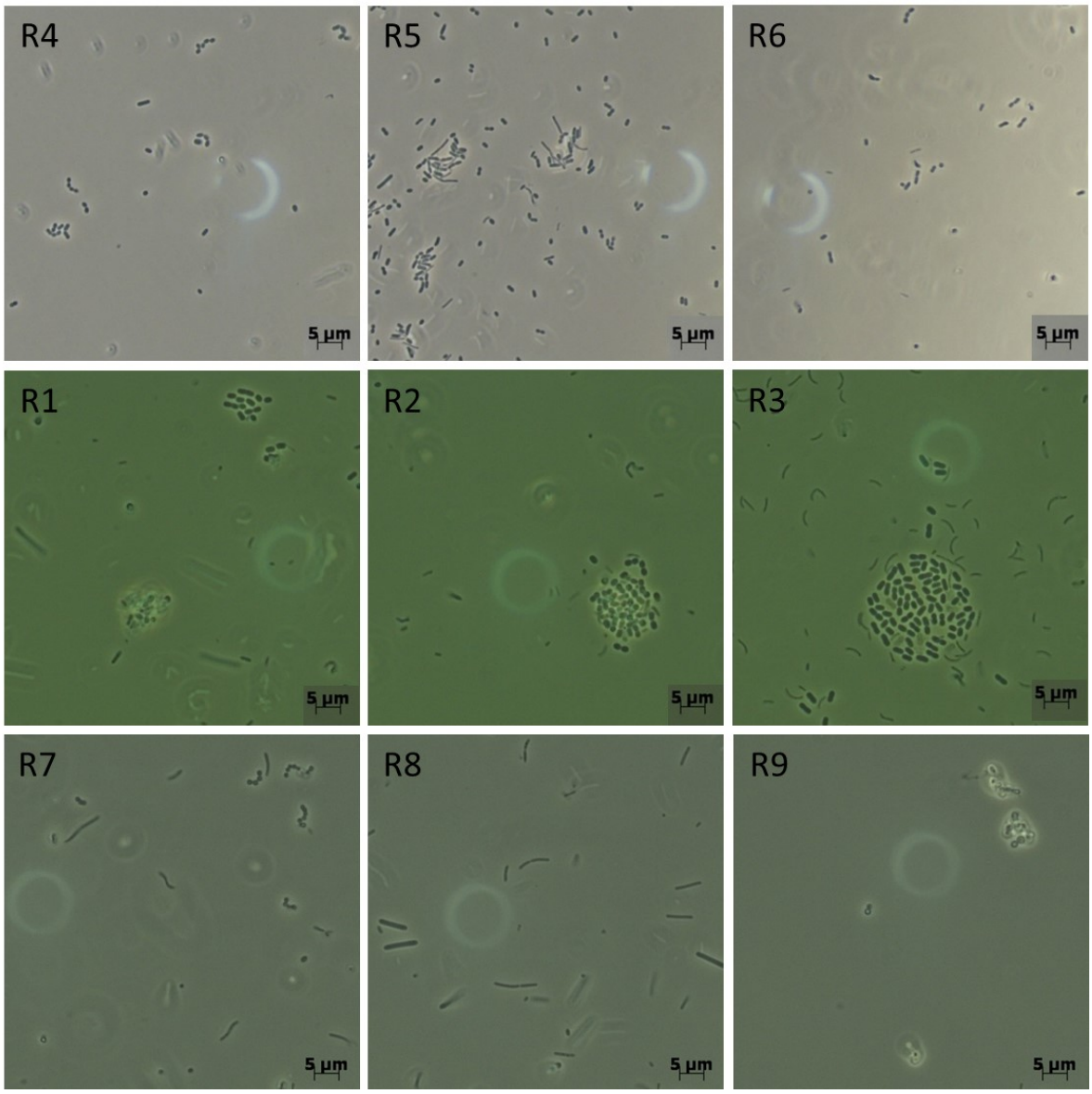

Abbildung 5-11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mikroorganismenpopulationen der Reaktoren bei 10 °C (R4 - R6), bei 20 °C (R1 - R3) und bei 38 °C (R7 - R9) mit einer SRT = 1 d. Es werden die Unterschiede sowohl zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen als auch innerhalb gleicher Temperatur (vor allem bei 38 °C) deutlich.

Bei allen drei 20 °C-Reaktoren (R1 - R3) gab es markante Zusammenlagerungen von ovalen, dicken Zellen. R1 und R3 unterschieden sich durch mittlere, gerade Stäbchen in R1 und kleine sichelförmige Zellen in R3.

Die Unterschiede zwischen den 38 °C-Reaktoren (R7 - R9) waren sehr deutlich. So fanden sich in R9 beispielsweise viel weniger Zellen als in R7 und R8. Die Zellmorphologien in R8 unterschieden sich von denen in R7. In diesem konnten mehr kleine Stäbchen in gerader und gebogener Form, aber auch kleine, zusammengelagerte Kokken gefunden werden. R8 hingegen enthielt neben einigen kleinen Stäbchen auch mittlere, dickere Stäbchen und nur einzelne Kokken.

Der Vergleich zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen zeigte noch deutlichere Unterschiede. Während bei 38 °C vorwiegend Stäbchen verschiedener Größen zu finden waren, dominierten bei den 10 °C-Reaktoren Kokken. Bei den 20 °C-Reaktoren konnten auffällige Zusammenlagerungen von ovalen, dicken Zellen beobachtet werden, die bei den anderen Temperaturen nicht beobachtet werden konnten.

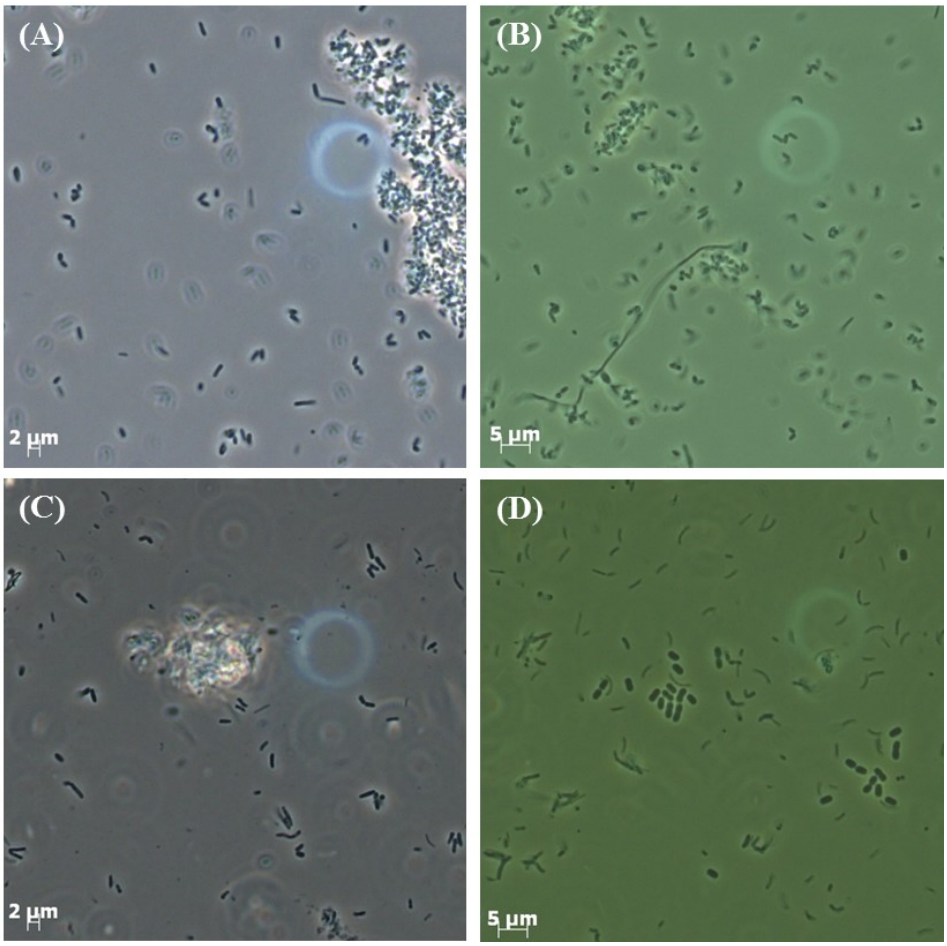

Abbildung 5-12: Mikroorganismenpopulation des Reaktors R3 (20 °C) bei einer Schlammverweilzeit von 12 d (A), 8 d (B), 4 d (C) und 1 d (D). Es ist eine deutliche Änderung der Zusammensetzung anhand der Morphologie der Zellen erkennbar.

Neben den Unterschieden innerhalb der Reaktoren gleicher Temperatur und zwischen denen verschiedener Temperaturen wurden auch Veränderungen innerhalb der einzelnen Reaktoren im Verlauf des Versuchs beobachtet. In Abbildung 5-12 ist beispielhaft die Veränderung der Reaktorpopulation in R3 (20 °C) bei verschiedenen Schlammverweilzeiten dargestellt. Bei SRT = 12 d, 8 d und 4 d waren kaum sichtbare Unterschiede zu erkennen. Es überwogen kleine Kokken und ovale Zellen sowie kleine Stäbchen. Ein paar fädige Bakterien konnten bei 8 d Schlammverweilzeit beobachtet werden. Deutliche Veränderungen wurden schließlich bei einer Schlammverweilzeit von 1 d sichtbar. Kleine sichelförmige Zellen und ovale, dicke Zellen, häufig zusammengelagert, dominierten die Population.

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen verdeutlichen den großen Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung der acidogenen Populationen, und nicht nur auf die der langsam wachsenden acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea*. Erstaunlich sind die zum Teil großen Unterschiede zwischen den Reaktoren gleicher Temperatur, wie sie bei den 20 °C- und 38 °C-Reaktoren mit SRT = 1 d erkennbar sind. Dies könnte mit der höheren Artenvielfalt bei mesophilen Temperaturen sowie deren unterschiedliche Reaktionen auf veränderte Bedingungen zusammenhängen. Je höher die Temperatur, desto sensibler reagiert die Population auf veränderte Bedingungen bzw. Störungen. (Bischofsberger, 2005) Die Reaktoren wurden nicht vollautomatisch betrieben, so dass geringste Schwankungen bei der Substratmenge oder Probenahme zu der Veränderung in der Populationszusammensetzung geführt haben können.

5.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde eingesetzt, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Populationszusammensetzungen der neun Reaktoren erkennen zu können. Die Methode wurde aus verschiedenen Literaturquellen (Nielsen et al., 2009, Kobabe et al., 2004, Weber, 2000) entnommen. Da sich die Angaben zur Probenvorbereitung und der Hybridisierungsdauer unterschieden, wurden Versuche zur Hybridisierungsdauer und der Hybridisierbarkeit der Bakterienzellen an Reinkulturen durchgeführt. Eine Charakterisierung der Reaktorproben (R1 - R9) erfolgte mit den spezifischen Phyla- und Ordnungs-Sonden für die Schlammverweilzeiten von 8 d, 4 d und 1 d.

5.6.1 Hybridisierungsdauer und allgemeine Hybridisierbarkeit

Für die Versuche zur Hybridisierungsdauer und zur allgemeinen Hybridisierbarkeit wurden Reinkulturen von *Lactococcus sp*., *Bacillus subtilis* und *Clostridium sticklandii* mit der Cy3-markierten EUB338Mix unterschiedlich lang hybridisiert. Die Zellen wurden vor dem Mikroskopieren mit DAPI (DNS-bindend) gegengefärbt. Abbildung 5-13 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche mit den Reinkulturen für Hybridisierungszeiten von 1,5 h, 5 h, 24 h

und 48 h. Es ist der Anteil an EUB338Mix-markierten Zellen bezogen auf alle DAPI-markierten Zellen dargestellt.

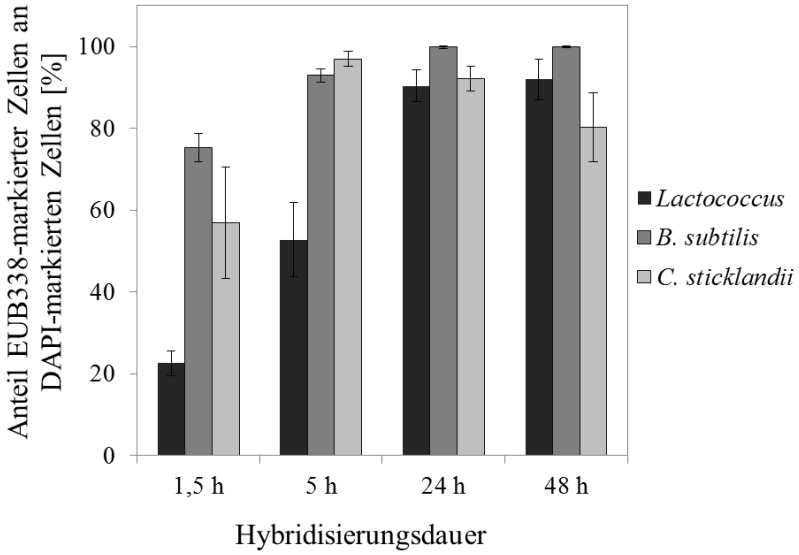

Abbildung 5-13: Anteile der mit der EUB338-Sonde markierten Zellen für verschiedene Bakterien-Reinkulturen bei unterschiedlichen Hybridisierungszeiten

Nach 1,5 h Hybridisierung waren erst 75 % der *B. subtilis*-Zellen erfolgreich mit der EUB338Mix-Oligosonde hybridisiert. Für *Lactococcus sp.* waren es sogar nur 20 % der Zellen. Nach 5 h war eine deutliche Steigerung der erfolgreich hybridisierten Zellen für *B. subtilis* und *C. sticklandii* zu sehen. Bei *Lactococcus sp.* waren um die 50 % markiert. Die Ergebnisse der 24 h und der 48 h Hybridisierungsdauer unterscheiden sich kaum. Für beide Zeiten liegen die Anteile der EUB338Mix-markierten Zellen der Reinkulturen zwischen 90 % und 100 %. Die 24 h wurden dann für die weiteren Hybridisierungen mit den spezifischen Sonden ausgewählt.

Bei den Hybridisierungen der Reaktorproben wurde neben den spezifischen Sonden immer auch die EUB338Mix-Sonde (entweder Cy3 oder 6-FAM-markiert) eingesetzt. Sowohl für Cy3 (rot) als auch 6-FAM (grün) konnten dabei sehr gute Hybridisierungsergebnisse von 95 - 98 % erreicht werden.

5.6.2 Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den Mikroorganismenpopulationen der Reaktoren

Für die Schlammverweilzeiten von 8 d, 4 d und 1 d wurden Hybridisierungen mit verschiedenen Phyla-, Klassen- und Familien-spezifischen Sonden für alle neun Reaktoren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind in Abbildung 5-14 dargestellt und zeigen die Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen

als Mittelwerte mit den Konfidenzintervallen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C. Eine Tabelle mit den ermittelten Werten für alle neun Reaktoren und den dazugehörigen Konfidenzintervallen findet sich im Anhang (Tabelle 9-8).

In allen Reaktoren konnten Vertreter von *Clostridia* (ClostI), *Actinobacteria* (HGC69a), *Bacteroidetes* (CFB719), *Syntrophomonadaceae* (Synm700) und γ-*Proteobacteria* (Gam42a) nachgewiesen werden (Abbildung 5-15). Die Anteile an den jeweiligen Reaktorpopulationen waren dabei sehr unterschiedlich. Insgesamt bildeten die mit den spezifischen Sonden markierten Zellen einen Anteil von 30 % bis 55 % der DAPI-gefärbten Zellen. Eine Ausnahme bildeten die 20 °C-Reaktoren bei SRT = 8 d, bei denen der Anteil der hybridisierten Zellen nur 17 % betrug. Im Gegensatz dazu konnte bei den 38 °C-Reaktoren mit SRT = 1 d ein Anteil von 76 % an den DAPI-gefärbten Zellen bestimmt werden. Für die Bakterienzellen, die nicht markiert werden konnten, wurden entweder keine Sonden eingesetzt oder es gibt noch keine Oligosonden, da viele Bakterien auf DNS-Ebene noch nicht sequenziert wurden.

Die Sonde LGC354Mix (Phylum: *Firmicutes*) wurde sowohl an Reinkulturen als auch in Reaktorproben getest, lieferte aber keine reproduzierbaren Ergebnisse und wurde daher nicht für die Charakterisierung eingesetzt.

Clostridien

Vertreter der Klasse *Clostridia, cluster I + II* (ClostI) nahmen in den 10 °C-Reaktoren einen Anteil von 7 - 15 % ein, wobei der Anteil mit sinkender SRT abnahm. In den 20 °C-Reaktoren fanden diese sich mit 2 - 5,5 % wieder. Hier stieg der Anteil mit sinkender Schlammverweilzeit. Den größten Anteil nahmen die Clostridien (ClostI, Synm700) in den 38 °C-Reaktoren ein. Dabei stieg der Anteil ClostI-markierter Zellen mit sinkender SRT von 5,7 % ± 1,7 bei 8 d, über 19,8 % ± 7,9 bei 4 d bis auf 35,3 % ± 4,8 bei 1 d.

Die Sonde Synm700 markiert Vertreter der Familie *Syntrophomonadaceae* (Ordnung: *Clostridiales*). Bei den 38 °C-Reaktoren mit 1 d Schlammverweilzeit bildeten sie mit 37,9 % ± 3,5 den größten Anteil an den hybridisierten Zellen. Bei 4 d und 8 d Schlammverweilzeit lag der Anteil etwa konstant bei 14 - 16 %. In den 20 °C-Reaktoren waren sie bei allen drei Schlammverweilzeiten mit einem Anteil von 12 % - 14,5 % vertreten. In den 10 °C-Reaktoren bei 8 d und 4 d Schlammverweilzeit lag der Anteil bei 9,6 % ± 1,3, sowie 5,8 % ± 0,8 für die Schlammverweilzeit von 1 d.

Bakterien mit hohem G+C-Gehalt (*Actinobacteria*)

Bakterien des Phylums *Actinobacteria* (HGC69a) fanden sich vorwiegend bei den 10 °C-Reaktoren mit einem Anteil von 10 - 15 % bei allen drei Schlammverweilzeiten. In den 20 °C-Reaktoren zeigten sie den größten Anteil bei 4 d SRT, mit 19,1 ± 4,2 %. Für eine Schlammverweilzeit von 1 d lag dieser bei 4,6 ± 1,3 % und für 8 d Schlammverweilzeit nur bei 0,5 ± 0,2 %. In den 38 °C-Reaktoren konnten für eine Schlammverweilzeit von 8 d 5,6 ± 1,8 % hybridisiert werden. Für die anderen zwei Schlammverweilzeiten waren es unter 1 %.

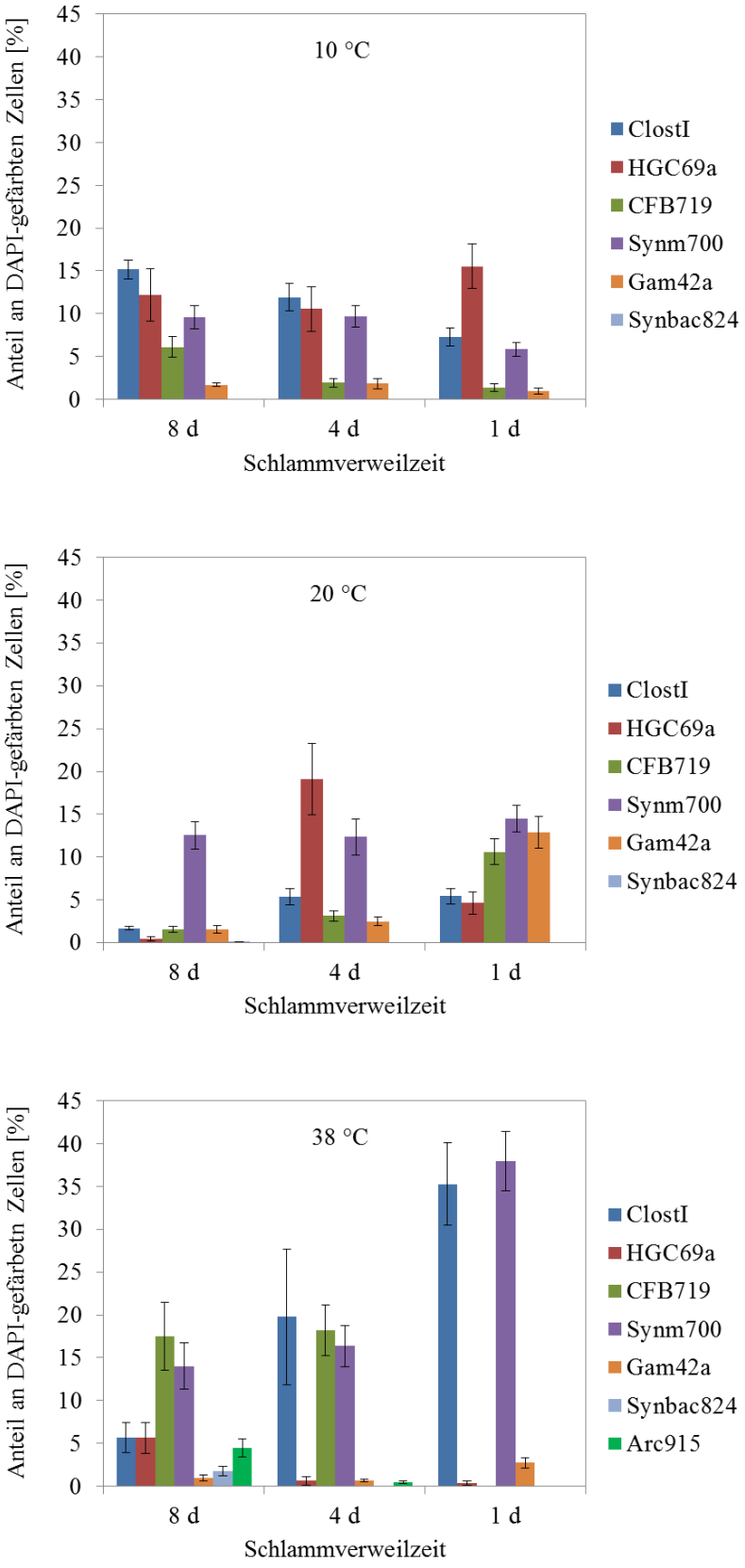

Abbildung 5-14: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen der 10 °C, 20 °C und 38 °C-Reaktoren (SRT = 8 d, 4 d und 1 d)

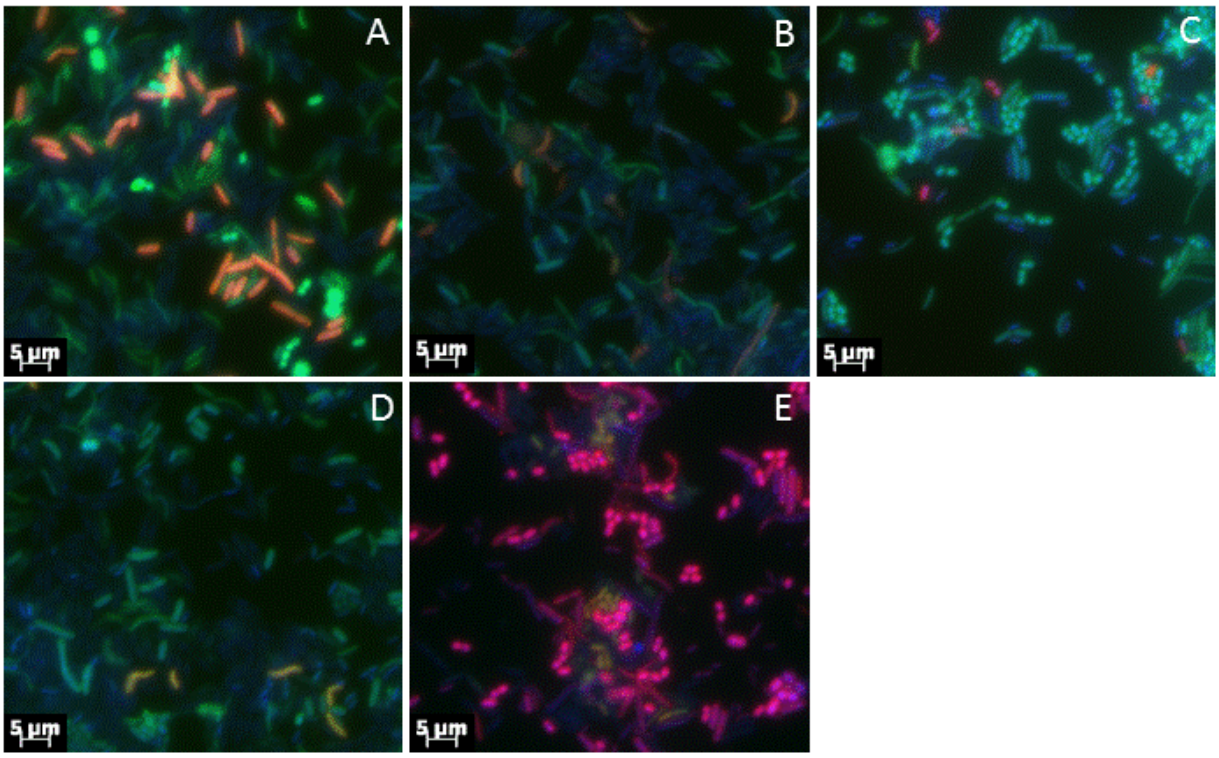

Abbildung 5-15: Hybridisierungen für die Reaktoren bei 10 °C und SRT = 8 d mit der allgemeinen Bakteriensonde EUB338Mix (A-D grün, E rot) und den Cy3-markierten (rot) Sonden ClostI (A), Synm700 (B), CFB719 (C), GAM42a (D) und der 6-FAM-markierten Sonde HGC69a (E). Die Zellen wurden für die Quantifizierung mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Bacteroidetes

Die Sonde CFB719 bindet selektiv an die RNA von Bakterienzellen des Phylums *Bacteroidetes*. In den 10 °C-Reaktoren nahm der Anteil der CFB719-markierten Zellen mit sinkender Schlammverweilzeit von 6,1 ± 1,2 % (SRT = 8 d) auf 1,3 ± 0,4 % (SRT = 1 d) ab. Bei den 20 °C-Reaktoren verhielt es sich genau anders herum. Hier stieg der Anteil von 1,6 ± 0,3 % bei 8 d Schlammverweilzeit bis auf 10,6 ± 1,5 % bei 1 d Schlammverweilzeit. In den 38 °C-Reaktoren wurden bei 8 d und 4 d Schlammverweilzeit etwa 18 ± 3,5 % markierte Zellen gefunden, für eine Schlammverweilzeit von 1 d dann gar keine mehr.

Proteobacteria

Der Anteil Gam42a-markierter Zellen (Klasse: *γ-Proteobacteria*) lag in allen Reaktoren nur zwischen 0,5 % und 2,7 %. Nur bei den 20 °C mit einer Schlammverweilzeit von 1 d war der Anteil mit 12,9 ± 1,8 % recht hoch.

Die Sonde Synbac824 wurde eingesetzt, um Vertreter der Gattung *Syntrophobacter* (Klasse: *δ-Proteobacteria*) nachzuweisen. Markierte Zellen fanden sich vereinzelt (<0,1 %) in den 20 °C-Reaktoren und mit einem höheren Anteil (1,8 ± 0,5 %) in den 38 °C-Reaktoren bei 8 d Schlammverweilzeit.

Methanogene Archeen

Für den Nachweis von methanogenen *Archaea* bei den 38 °C-Reaktoren kam die Sonde Arc915 zum Einsatz. Dabei wurde für die Schlammverweilzeit von 8 d ein Anteil von 4,4 ± 1,1 % und für 4 d Schlammverweilzeit von 0,4 ± 0,2 % an DAPI-markierten Zellen bestimmt.

Anhand der teils großen Konfidenzintervalle (in Abbildung 5-14) werden die Unterschiede zwischen den Reaktoren gleicher Temperatur und Schlammverweilzeit deutlich. Jeder Reaktor wurde daher noch einmal separat bezüglich der Populationszusammensetzung betrachtet. Die jeweiligen Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den einzelnen Reaktorenpopultionen sind in den Abbildungen 5-16 bis 5-18 dargestellt.

Bei den 10 °C-Reaktoren ist die Zusammensetzung für alle drei Schlammverweilzeiten fast identisch. Eine etwas größere Abweichung fand sich nur bei 8 d Schlammverweilzeit für die HGC69a-markierten Zellen (*Actinobacteria*). Der Anteil in R4 war mit 23,5 ± 3,3 % fast fünfmal so hoch wie in R6 mit 4,8 ± 0,9 %. Kleine Unterschiede gab es für die *Bacteroidetes*-Gruppe (CFB719). R5 wies hier nur 3,1 ± 1,3 % auf, während in den anderen zwei Reaktoren knapp 8 % der DAPI-gefärbten Zellen mit der CFB719-Sonde markiert wurden. Die CFB719-gefärbten Zellen nahmen mit sinkender Schlammverweilzeit ab.

Im Vergleich dazu wiesen die 20 °C-Reaktoren untereinander etwas größere Abweichungen in der Populationszusammensetzung auf. Bei 8 d Schlammverweilzeit war der Anteil der *γ-Proteobacteria* in R2 mit 3,3 % ± 0,4 etwa 4,5-mal größer als in den Reaktoren R4 (0,7 % ± 0,2) und R6 (0,8 % ± 0,1).

Deutliche Unterschiede waren auch für mehrere Bakterien-Gruppen sowohl bei 4 d als auch 1 d Schlammverweilzeit erkennbar. Für die *Actinobacteria*-Gruppe (HGC69a) lagen die Anteile bei 4 d Schlammverweilzeit zwischen 7,2 ± 1,7 % (R1) und 30,3 ± 5,7 % (R3). Für 1 d Schlammverweilzeit waren in R1 mit 8,8 ± 1,8 % fast 3,5-mal soviele Zellen markiert wie in den zwei anderen Reaktoren.

Die größten Unterschiede für die *Syntrophomonadaceae*-Gruppe konnten bei der Schlammverweilzeit von 4 d gefunden werden. Reaktor R2 wies mit 19,9 ± 2,7 % die meisten markierten Zellen auf. Der Anteil der markierten Zellen war damit doppelt so groß wie in R1 (10,4 ± 1,5 %) und fast dreimal so groß wie in R3 (7,0 ± 1,2 %). Auch für die *Bacteroidetes*-Gruppe konnten kleinere Unterschiede festgestellt werden. Während bei 4 d Schlammverweilzeit in R2 der größte Anteil (4,3 ± 1,2 %) an CFB719-markierten Zellen nachgewiesen wurde, stieg der Anteil bei R1 (13,4 ± 2,4 %) und R3 (11,8 ± 1,7 %) bei 1 d Schlammverweilzeit an und lag dort doppelt so hoch wie in R2 (5,9 ± 0,6 %).

Der Anteil der *Clostridien cluster I + II*-Gruppe (ClostI) war innerhalb einer Schlammverweilzeit für alle drei Reaktoren fast identisch, wie auch schon bei den 10 °C-Reaktoren.

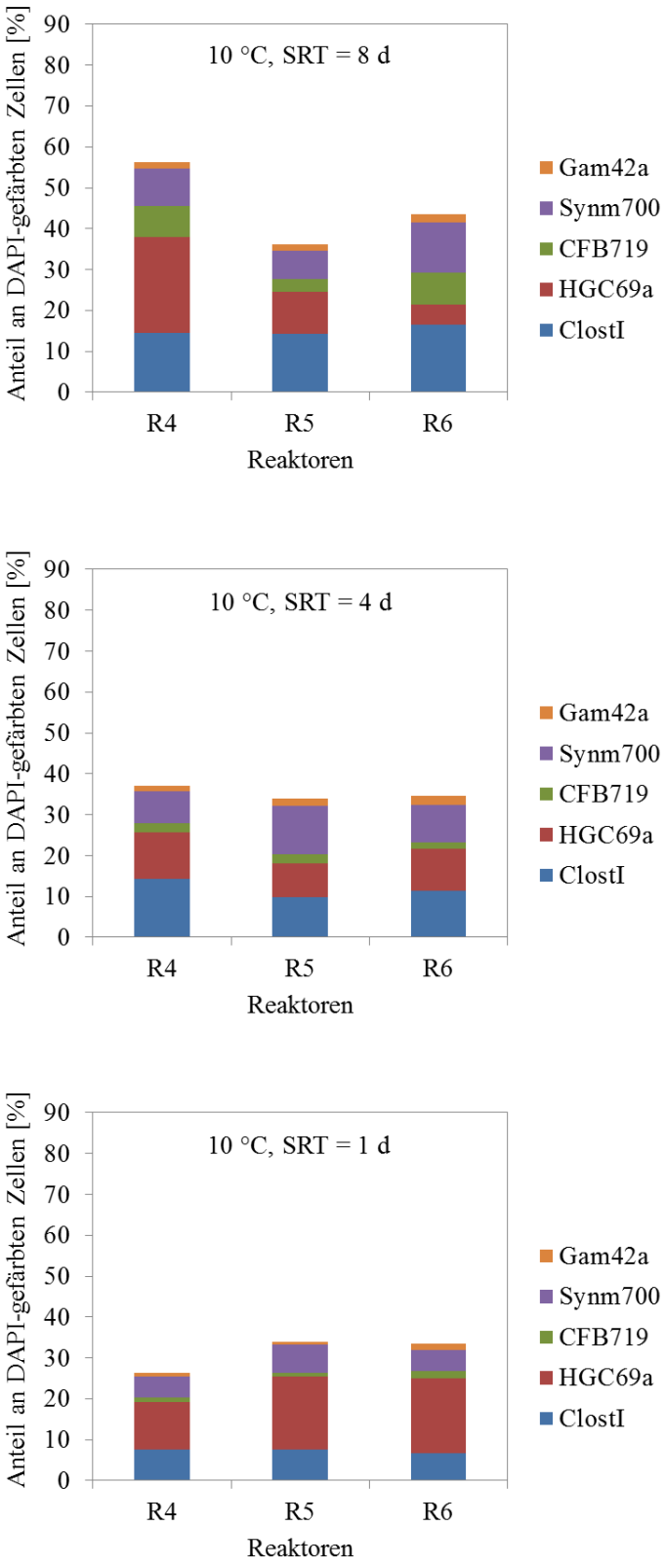

Abbildung 5-16: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 10 °C-Reaktoren R4, R5 und R6 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d)

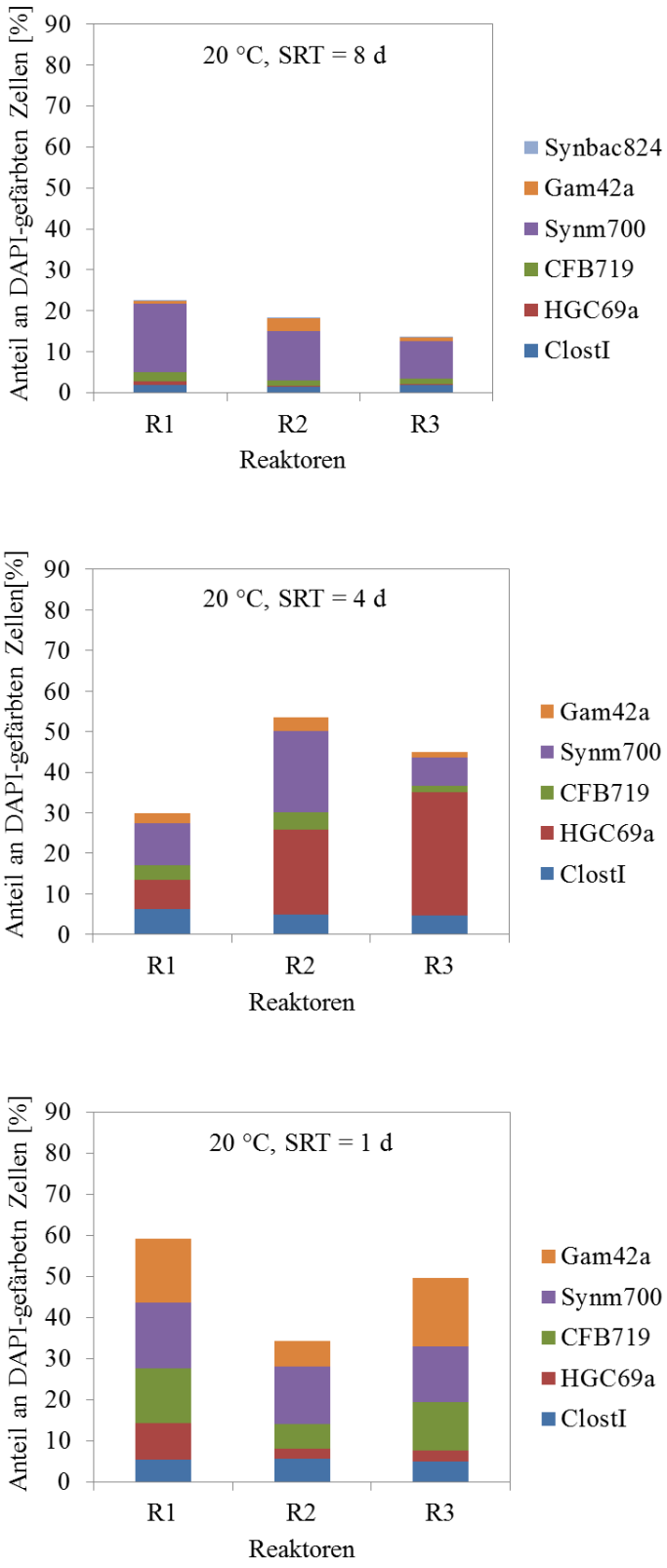

Abbildung 5-17: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 20 °C-Reaktoren R1, R2 und R3 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d)

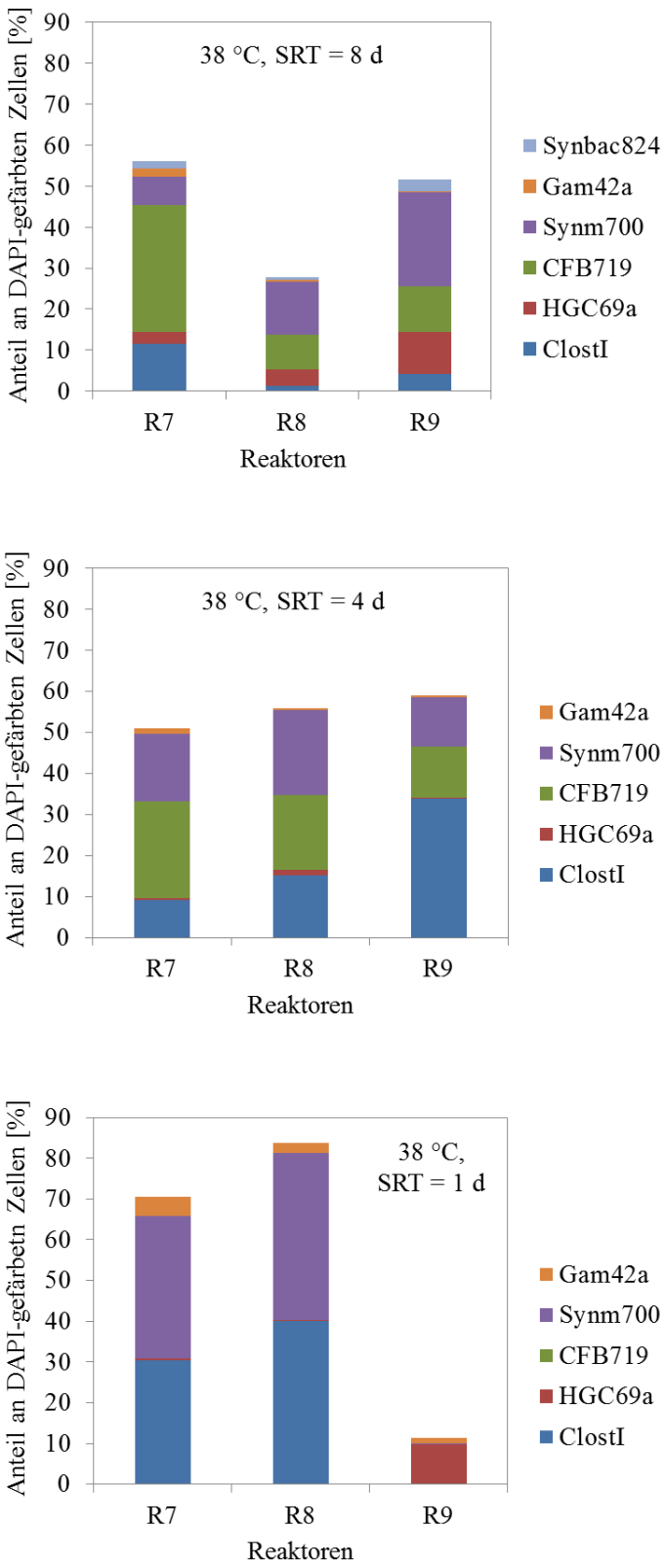

Abbildung 5-18: Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an den DAPI-gefärbten Zellen in den 38 °C-Reaktoren R7, R8 und R9 (SRT = 8 d, 4 d und 1 d)

Die deutlichsten Unterschiede in der Populationszusammensetzung wurden für die 38 °C-Reaktoren ermittelt. Bei 8 d Schlammverweilzeit stellten die CFB719-markierten Zellen den größten Anteil in R7 (31,0 % ± 1,9) und waren damit mehr als 3,5-mal so viele wie in R8 (8,4 % ± 2,8). Der ClostI-Anteil mit 11,5 % ± 2,3 war sogar neunmal so groß. In R9 hingegen war der HGC69a-Anteil (10,4 %) etwa 3,5-mal größer als in R7 (2,9 %) und der Anteil Synm700-markierter Zellen auch mehr als dreimal so groß. Methanogene *Archaea* fanden sich in R7 (5,2 % ± 0,9) und R8 (3,1 % ± 2,1), aber nicht in R9.

Bei 4 d Schlammverweilzeit dominierten ClostI-markierte Zellen in R9 33,9 % ± 5,0, in R7 lag der Anteil nur bei 9,2 % ± 3,0. Dafür war in diesem Reaktor der Anteil CFB719-markierter Zellen fast doppelt so groß.

Schließlich wich R9 bei 1 d Schlammverweilzeit in seiner Populationszusammensetzung völlig von den zwei anderen Reaktoren ab. Es konnten fast keine Vertreter mehr der Ordnung *Clostridiales* (ClostI, Synm700) nachgewiesen werden. Dafür lag aber in R9 der Anteil HGC69a-markierter Zellen wieder bei knapp 10 %. Insgesamt konnten nur 11 % aller DAPI-markierten Zellen in R9 mit spezifischen Sonden gebunden werden. Zudem waren am Ende (SRT = 1 d) nur noch sehr wenige Zellen vorhanden, was eine Auswertung der FISH-Ergebnisse erschwerte.

Im Gegensatz zu R9 gab es eine deutliche Zunahme der *Clostridiales*-Gruppe in R7 und R8, in denen Vertreter dieser Ordnung mit mehr als 65 % - 80 % die Population dominierten. Es konnten insgesamt 70 % - 85 % aller DAPI-markierten Zellen zugeordnet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung und die Stabilität der Reaktorpopulation hat. Während bei den 10 °C-Reaktoren kaum Unterschiede, sowohl zwischen den Reaktoren gleicher SRT als auch unterschiedlicher SRT, festzustellen war, zeigten sich zum Teil sehr große Unterschiede bei den 38 °C-Reaktoren zwischen den einzelnen Reaktoren und SRT's. Die Populationen reagieren bei höheren Temperaturen empfindlicher auf äußere Einflüsse als bei niedrigeren Temperaturen. So können sich eigentlich gleich betriebene Reaktoren bei mesophilen Temperaturen (30 - 40 °C) in ihrer Populationszusammensetzung unterschiedlich entwickeln.

5.7 Metaproteomanalyse

Die Metaproteomanalyse diente dazu, die Stoffwechselaktivitäten über die Identifikation der Proteine und die daran beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren.

Die Zellaufschluss- und Extraktionsmethode (Abschnitt 3.6.2) wurde zunächst an vier verschiedenen Reaktorproben verifiziert. Für die eigentlichen Analysen und Vergleiche der 1 Liter-Reaktoren (10 °C, 20 °C und 38 °C) wurden Proben bei SRT = 8 d, 4 d und 1 d gezogen. Die Proteine wurden extrahiert und ausgefällt, um anschließend über 2D-PAGE aufgetrennt zu werden. Ausgewählte Spots wurden tryptisch verdaut und mittels MALDI-

TOF/TOF gemessen. So sollten Unterschiede zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen und Schlammverweilzeiten identifiziert werden.

Um einen Überblick über das gesamte Proteom der einzelnen Reaktoren zu erhalten, wurden die Proben der Schlammverweilzeit von 8 d mit einem zweiten Verfahren analysiert. Dabei wurden aus den erstellten SDS-Gelen jeweils die kompletten Gelspuren ausgeschnitten und über nanoHPLC mit ESI-Ionenfalle gemessen.

5.7.1 Ergebnisse zu Zellaufschluss und Proteinextraktion

Die Verifizierung der Zellaufschluss- und Extraktionsmethode erfolgte an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik. Dabei wurden für vier Proben je drei unabhängige Zellaufschlüsse mit Phenolextraktion und Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Für den Zellaufschluss wurde eine Kugelmühle eingesetzt. Bei der SDS-PAGE wurden je 25 µg Protein und für die 2D-PAGE mit 7 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) je 400 µg Protein eingesetzt. Abbildung 5-19 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für den ersten Zellaufschluss. Probe K und M stammten aus Technikumsreaktoren mit der gleichen Schlammmischung und synthetischem Abwasser als Substrat. Die Schlammprobe M wurde aus dem 40 Liter-Reaktor entnommen, dessen Schlamm später als Inokulum für die 1 Liter-Reaktoren diente. Die Proben Kn und Kn37 wurden aus einer Pilotkläranlage mit unbeheiztem und beheiztem (37 °C) Reaktor entnommen, die mit realem, häuslichem Abwasser betrieben wird.

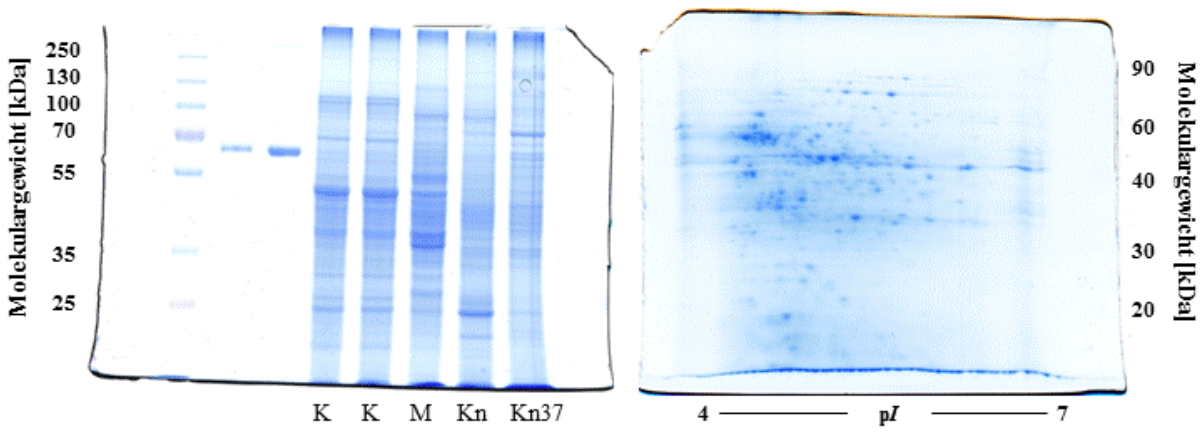

Abbildung 5-19: links: SDS-Gel von verschiedenen Schlammproben (K, M: OECD-Medium; Kn, Kn37: reales Abwasser) nach Aufschluss mit Kugelmühle, Phenolextraktion und Ammoniumacetat-Fällung; rechts: 2D-PAGE der Probe M (klein, für 7 cm IPG-Streifen)

Bei dem SDS-Gel ist eine klare Bandentrennung für alle vier Reaktorproben erkennbar. Die zwei Streifen für Probe K stammten aus zwei verschiedenen Zellaufschlüssen und zeigen eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Probennahme und der Proteinextraktionsmethode.

Die Auftrennung der Proteine von Probe M mittels 2D-PAGE (Gel rechts) erfolgte mit kleinen IPG-Streifen (7 cm, pH 4 - 7) und kleinem Gel. Das Gel weist ebenfalls eine gute Proteintrennung mit klaren Spots auf.

Für die gleiche Probe wurde auch eine 2D-PAGE mit 18 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) und großem Gel durchgeführt. Dabei wurden 800 µg Protein verwendet. Auch hier erfolgte eine sehr gute Spottrennung (siehe Abbildung 5-20).

Für die anderen Proben konnten ähnlich gute Ergebnisse erreicht werden, unabhängig davon ob sie aus den Reaktoren mit realem Abwasser oder synthetischem Abwasser stammten.

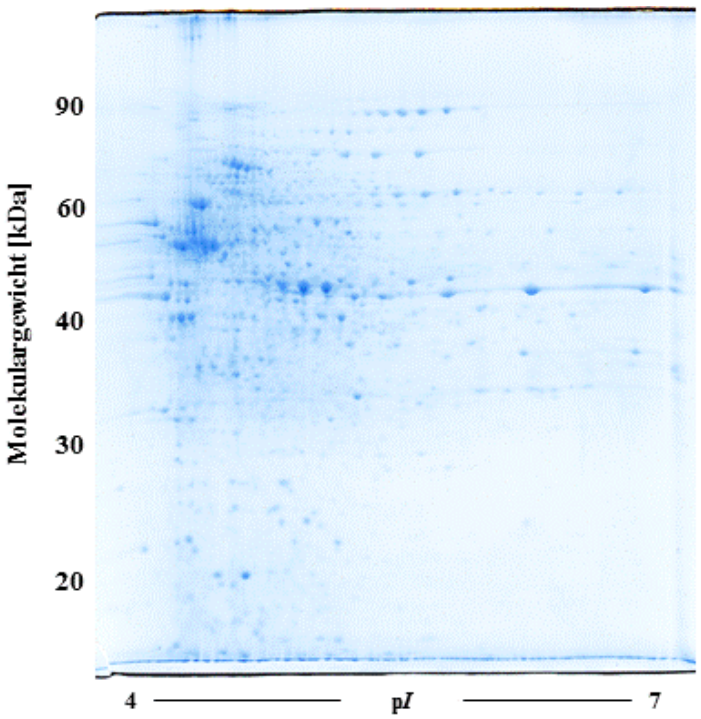

Abbildung 5-20: Großes 2D-PAGE-Gel (18 cm IPG-Streifen) der Probe M

Die Zellaufschlüsse für die 1 Liter-Reaktoren wurden am Fraunhofer IGB mittels eines Homogenisators durchgeführt. Dafür wurden anhand von Schlamm einer Reaktorprobe Aufschlusszeiten zwischen 4 min und 20 min getestet. Nach der Fällung und Reinigung der Proteine erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mit Amido Schwarz.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 5-21 dargestellt und zeigen, dass die Proteinkonzentrationen mit 0,293 - 0,309 mg/ml für die Aufschlusszeiten von 4 min bis 16 min fast identisch waren.

Bei 20 min lag die Proteinkonzentration mit 0,265 mg/ml etwas niedriger. Aufgrund der starken Wärmeentwicklung in der Probe durch das Schütteln wurde für die weiteren Zellaufschlüsse eine Zeit von 4 min gewählt.

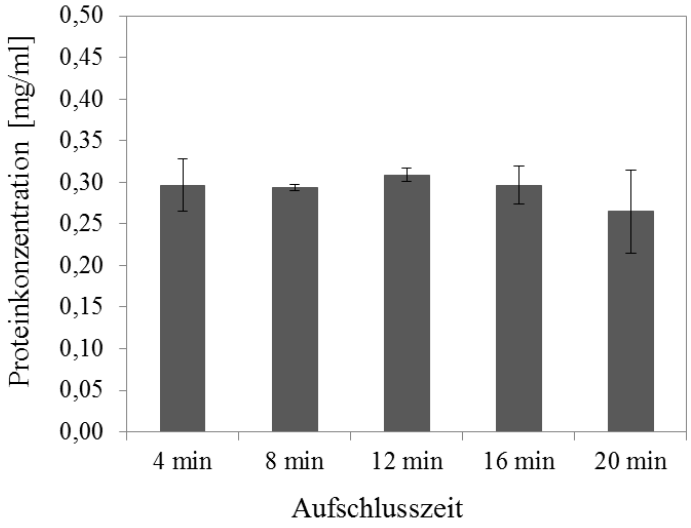

Abbildung 5-21: Proteinkonzentration in der Reaktorprobe nach verschiedenen Aufschlusszeiten mit dem MiniLys-Homogenisator

5.7.2 SDS-Gelelektrophorese und ESI-Ionenfalle

Um möglichst das ganze Proteom der verschiedenen Reaktoren mittels Massenspektrometrie analysieren zu können, erfolgte zunächst eine Auftrennung der Proteine über SDS-Gelelektrophorese. Diese Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 5-22, geben einen ersten Aufschluss über die Unterschiede der Reaktoren untereinander. Für die Schlammverweilzeit von 8 d wurden Proteinproben aller neun Reaktoren (R1 - R9) aufgetragen. Bei 4 d Schlammverweilzeit fehlen die Proteinproben der Reaktoren R5 und R6 mit SRT = 4 d sowie bei 1 d Schlammverweilzeit die Probe R9, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Dieses wurde für die 2D-PAGE verwendet.

Die Bandenmuster der 10 °C-Reaktoren weisen innerhalb gleicher Schlammverweilzeit keine sichtbaren Unterschiede auf. Die identischen Bandenmuster zwischen den biologischen Replikaten (R4 - R6) deuten darauf hin, dass die parallel gelaufenen Reaktoren ähnliche Populationen und Enzymaktivitäten aufwiesen. Auch für die 20 °C-Reaktoren können bei den dominierenden Banden keine Unterschiede innerhalb einer Schlammverweilzeit festgestellt werden. Für 1 d Schlammverweilzeit ist eine Bewertung schwierig, da für R1 und R2 die Streifen sehr schwach sind. Deutliche Unterschiede sind in den Bandenmustern der 38 °C-Reaktoren für alle drei Schlammverweilzeiten zu erkennen. Für 8 d Schlammverweilzeit erscheinen die Bandenmuster für R8 und R9 identisch und nur R7 weist ein anderes Bandenmuster auf. Deutlich unterscheiden sich die Bandenmuster aller drei Reaktoren bei 4 d und 1 d Schlammverweilzeit. Dies deutet auf unterschiedliche Populationszusammensetzungen und Enzymaktivitäten in den einzelnen Reaktoren hin.

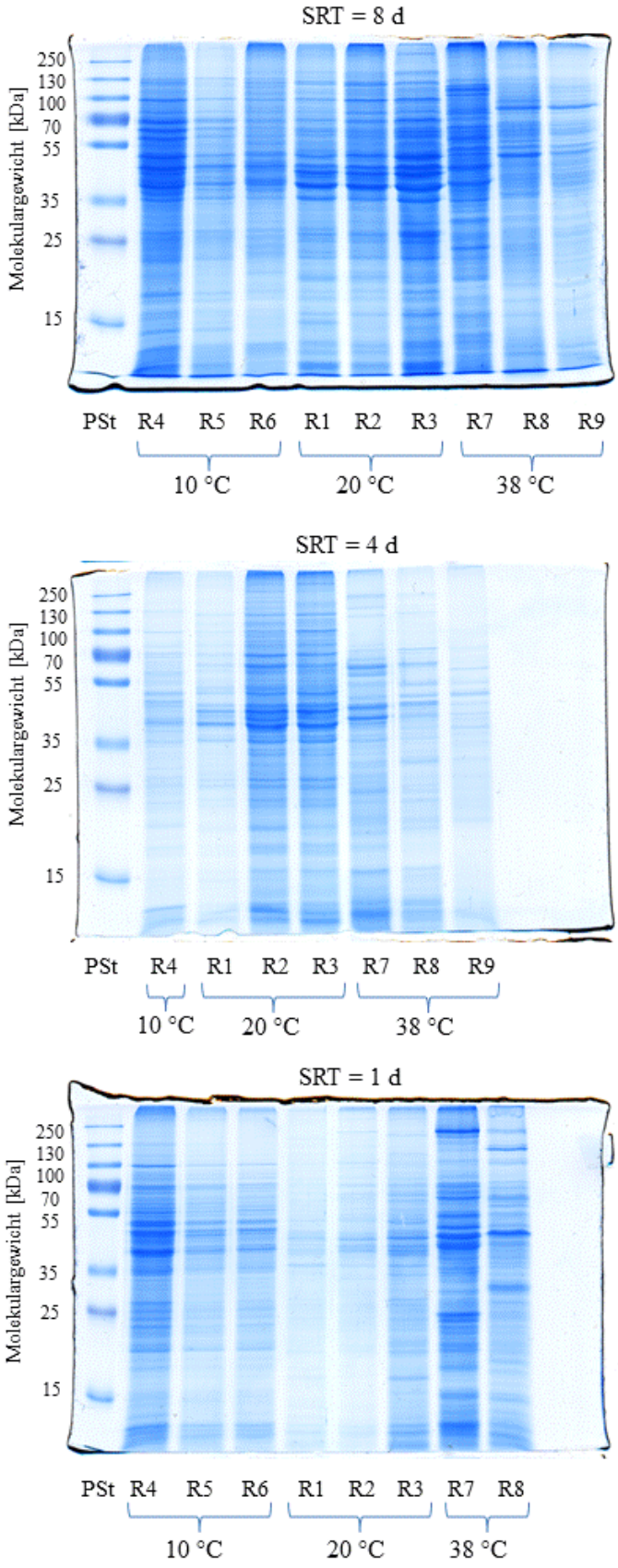

Abbildung 5-22: Coomassie gefärbte SDS-Gele von Proteinextrakten (100 µg) der Reaktoren R4 - R6 (10 °C), R1 - R3 (20 °C) und R7 - R9 (38 °C) für die Schlammverweilzeiten von 1 d, 4 d und 8 d.

Die Bandenmuster der Proben aus Reaktoren gleicher Temperatur weisen für die verschiedenen Schlammverweilzeiten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Dabei scheinen bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren die gemeinsamen Banden vor allem im oberen und mittleren Bereich der Streifen zu überwiegen. Die Bandenmuster zwischen den 38 °C-Reaktoren verschiedener Schlammverweilzeiten unterscheiden sich dagegen deutlicher voneinander. Gleiche Banden könnten Funktionen darstellen, die in allen Reaktoren und bei jeder untersuchten Schlammverweilzeit essentiell sind.

Für eine Identifizierung der Proteine wurden die Streifen der Proben mit der Schlammverweilzeit von 8 d in je 10 gleichgroße Stücke zerteilt, tryptisch verdaut und über nano-HPLC mit ESI-Ionenfalle gemessen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Messungen für drei der neun Reaktoren – einer für jede Temperatur – dargestellt. Die MASCOT^{TM}-Suche (Parameter siehe Anhang Tabelle 9-7) gegen die Datenbanken NCBInr und UniProt ergab mehr als 1300 Proteinhits für alle drei Reaktorproben. Die meisten davon fanden sich für den 10 °C-Reaktor, die wenigsten für den 38 °C-Reaktor. Neben den Proteinhits für Bakterien und einzelne methanogene *Archaea* wurden auch einige für Pflanzen, Fungi und Tiere sowie Keratin vom Mensch identifiziert.

Diese wurden für die weitere Auswertung nicht beachtet. Die Proteinhits der Bakterien und *Archaea* wurden nur berücksichtigt, wenn diese durch mindestens zwei Peptide und mit einem MOWSE-Score für das Protein von mindestens 50 identifiziert werden konnten. Hits, die ein identisches Protein aufwiesen, wurden zusammengefasst, um die Redundanz zu verringern. Am Ende blieben 769 Proteine übrig, die in die nachfolgenden Auswertungen einflossen. Dabei wurden die identifizierten Proteine zum einen phylogenetischen Klassen zugeordnet und zum anderen nach verschiedenen Proteinfunktionen zusammengefasst.

10 °C-Reaktor (R4)

Für den 10 °C-Reaktor (R4, SRT = 8 d) wurden 369 Proteine identifiziert, von denen die meisten Vertreter der Klasse *Actinobacteria* (41 %) und *Clostridia* (25 %) zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 5-23).

Innerhalb der Klasse *Actinobacteria* gehörten, bis auf eines, alle Proteine Vertretern der Ordnung *Actinomycetales* an und dabei vorwiegend der Gattungen *Actinomyces sp.* und *Propionibacterium sp.* Die *Actinomyces sp.* bilden verschiedene organische Säuren (u.a. Essigsäure, Milchsäure), aber keine Propionsäure. Diese wird wiederum von *Propionibacterium sp.* gebildet. Für die Klasse *Clostridia* konnten zwei verschiedene Ordnungen identifiziert werden, wovon der Großteil Vertretern der *Clostridiales* und nur wenige zur Ordnung der *Thermoanaerobacterales* gehörten. Innerhalb der Ordnung *Clostridiales* dominierten Vertreter der zwei Gattungen *Clostridium sp.* und *Oscillibacter sp.* Beide enthalten viele Spezies, die für die Bildung organischer Säuren und anderer Produkte (Alkohole, H_2, CO_2) verantwortlich sind.

Ebenfalls häufig vorhanden im Reaktor waren Vertreter der Klasse *Bacilli* (13 %), die zu einem Viertel der Ordnung *Bacillales* und drei Viertel den *Lactobacillales* angehörten. Bei den *Lactobacillales* dominierten *Lactococcus sp.* und *Streptococcus sp.*, aber es konnten auch Proteine der Gattungen *Enterococcus sp.* und *Lactobacillus sp.* identifiziert werden.

Schließlich fanden sich auch Vertreter der Klassen *Bacteroidetes* (8 %), *Gammaproteobacteria* (3 %), *Deltaproteobacteria* (2 %) und *Alphaproteobacteria* (2 %). Die Vertreter der *Bacteroidetes* fermentieren verschiedene Zucker zu Essigsäure und Bernsteinsäure und sind daher typische Vertreter der hydrolysierenden/acidogenen Stufe. Bei den *Deltaproteobacteria* konnten die meisten Proteine der Ordnung *Desulfovibrionales* zugeordnet werden. Diese reduzieren Sulfat zu Sulfid und nutzen dabei zusätzlich Lactat, Ethanol, Malat und andere organische Säuren als Substrat (Gottschalk, 1986). Vertreter der Ordnung *Enterobacteriales* dominierten in der Klasse *Gammaproteobacteria.* Diese produzieren verschiedene Säuren (Essigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure) oder auch Butandiol.

Ein einziger Proteinhit, eine Glutamat-Dehydrogenase, wurde für das methanogene *Archaea Methanobrevibacter ruminantium* identifiziert.

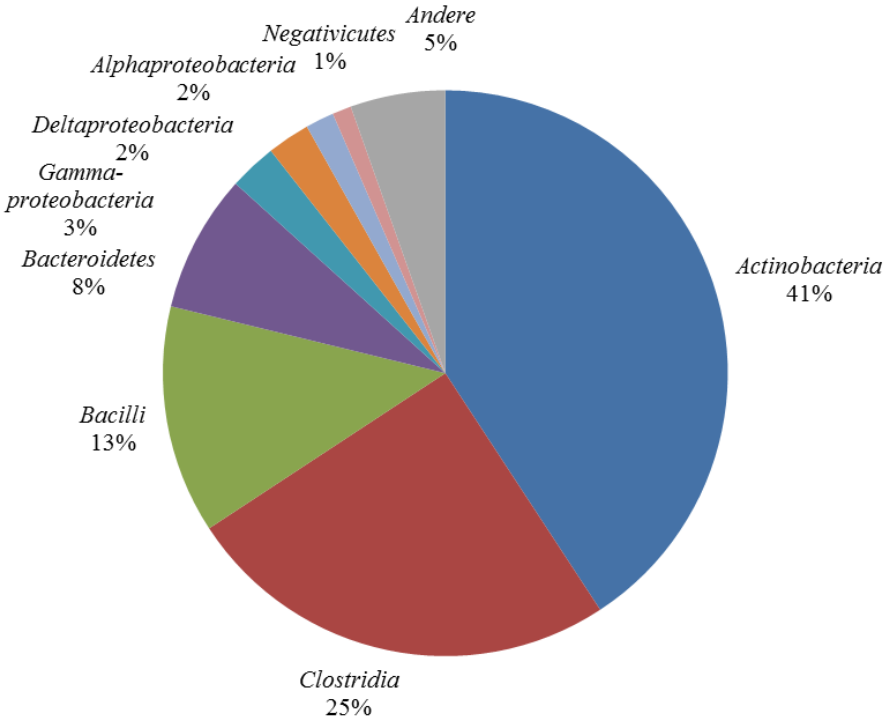

Abbildung 5-23: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R4 (10 °C, SRT = 8 d)

Die Unterteilung der identifizierten Proteine nach Funktionen und biologischen Prozessen (Abbildung 5-24) ergaben, dass 40 % ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren ent-

sprachen, die an der Translation und Proteinbiosynthese beteiligt sind. Ebenfalls vorherrschend waren Enzyme verschiedener metabolischer Prozesse (27 %), wovon die meisten in der Glykolyse aktiv waren oder in nahem Bezug dazu standen. So konnten für verschiedene Bakterien-Ordnungen die Enzyme Enolase, Fruktosebisphosphat-Aldolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydroge-nase, Lactat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase, Phosphopyruvat-Hydratase und Pyruvatkinase identifiziert werden.

Andere metabolische Enzyme ließen sich dem Aminosäurestoffwechsel (Glutamat-Dehydrogenase, Dihydrodipicolinat-Reduktase) und dem Fettsäurestoffwechsel (Acyl-CoA-Dehydrogenase, Formiat-Acetyltransferase, Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase) zuordnen. Acyl-CoA-Dehydrogenase ist ein Enzym der ß-Oxidation von längerkettigen Fettsäuren. In dieser Probe wurde sie Vertretern der Ordnung *Clostridiales* zugeordnet. Das Enzym Formiat-Acetyltransferase katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Enzyme mit nur einem oder zwei Hits konnten mit dem Polysaccharid-, Fruktose-, Malat- und Purinmetabolismus in Verbindung gebracht werden.

Die drittgrößte Fraktion bildeten Stressproteine (13 %), die auf veränderte Temperatur-, pH-Wert- oder Sauerstoffbedingungen reagieren. Zu diesen zählten vor allem Chaperone (DnaK, GroEL).

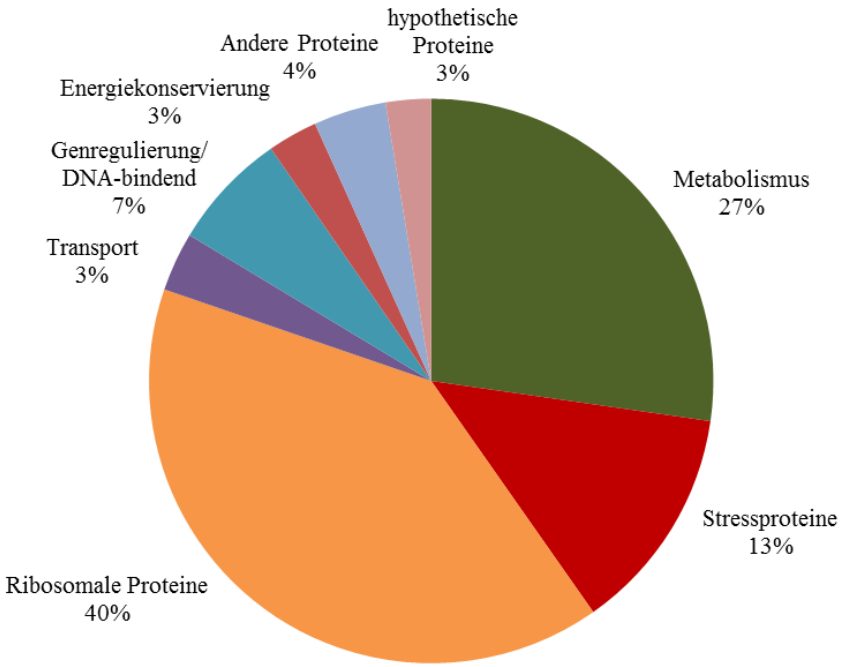

Abbildung 5-24: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R4 (10 °C, SRT = 8 d)

In geringeren Anteilen fanden sich Proteine, die an Transportvorgängen (3 %) beteiligt waren, wie dem Elektronentransport (Pyruvate-Flavodoxin-Oxidoreduktase, Rubrerythrin) oder dem transmembranen Transport von Zuckern (PTS-Fructose-Transporter, Zucker-ABC-Transporter-ATP-bindendes Protein). Diese konnten verschiedenen taxonomischen Ordnungen zugeordnet werden, ebenso wie die Proteine zur Genregulierung (7 %). Proteine der ATP-Synthese und des ATP-Abbaus dienen der Energiekonservierung (3 %). Dazu gehören beispielsweise die ATP-Synthase und ABC-Transporter-ATP-bindende Proteine. Ebenfalls in diese Gruppe gehören Proteine, die an Oxidations-Reduktions-Prozessen beteiligt sind, wie das Elektron-Transfer-Flavoprotein. Diese Form der Energiespeicherung ist typisch für Gärungen, da ein externer Elektronenakzeptor für die Oxidation fehlt.

Unter die Gruppe „Andere Proteine“ (4 %) fallen beispielsweise solche, die an der Proteolyse, Pathogenese oder Flagellenbeweglichkeit, d.h. der aktiven Bakterienbewegung beteiligt sind, oder deren Funktion nicht genau bekannt ist.

20 °C-Reaktor (R1)

Die Auswertung der 240 Proteinhits für den 20 °C-Reaktor (R1, SRT = 8 d) ergab ein ähnliches Bild bezüglich der beteiligten Bakterien-Klassen wie für den 10 °C-Reaktor (siehe Abbildung 5-25). Die Klassen *Actinobacteria* (51 %) und *Clostridia* (13 %) bildeten die größten Gruppen im Reaktor. Innerhalb dieser Klassen dominierten Vertreter der Gattungen *Actinomyces sp.* sowie *Clostridium sp.* und *Oscillibacter sp.*.

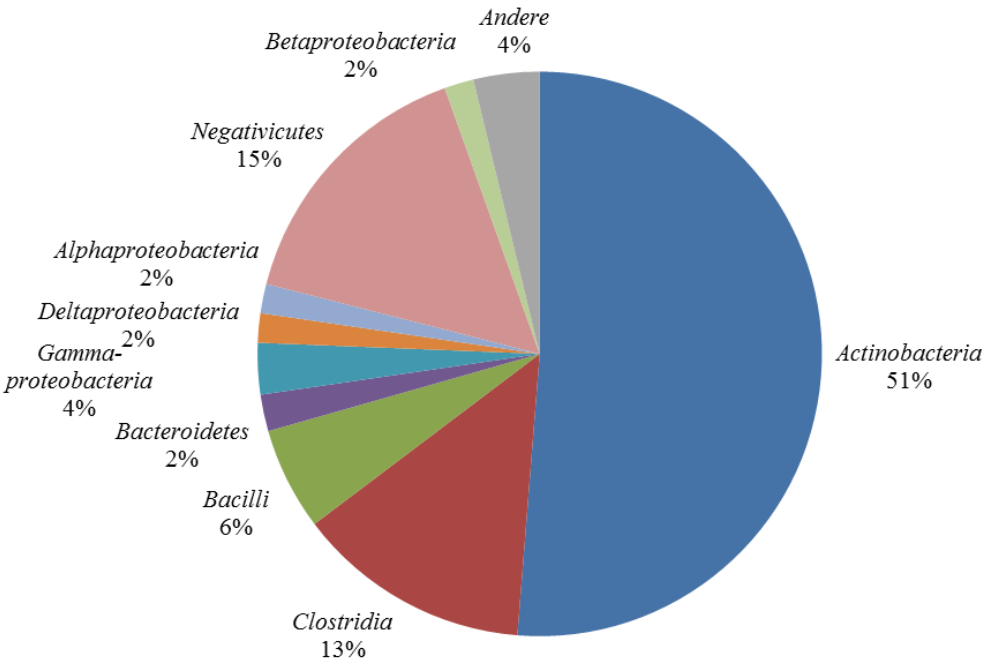

Abbildung 5-25: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe aus Reaktor R1 (20 °C, SRT = 8 d)

Anders als bei dem 10 °C-Reaktor fanden sich aber auch viele Vertreter der Klasse *Negativicutes* (15 %), die ausschließlich der Ordnung *Selenomonadales* zugeordnet werden konnten. Hier waren vor allem Vertreter der Gattungen *Megasphaera sp.* und *Acidaminococcus sp.* zu finden. Die meisten Vertreter dieser zwei Gattungen nutzen Aminosäuren als Energiequelle, andere bilden aus Lactat Propionat, Acetat und CO_2 (Gottschalk, 1986).

In geringerem Anteil wurden Proteine für die taxonomischen Klassen *Bacilli* (6 %), *Bacteroidetes* (2 %) und verschiedener *Proteobacteria* (*Gamma-* (4 %), *Delta-* (2 %), *Beta-* (2 %) und *Alpha-* (2 %)) identifiziert. Bei den *Deltaproteobacteria* dominierten wieder Spezies der Ordnung *Desulfovibrionales.*

Die Unterteilung der analysierten Proteinhits nach ihren Funktionen (Abbildung 5-26) ergab, dass fast 40 % der Proteine metabolischen Prozessen (39 %) zugeordnet werden konnten. Der größte Anteil fiel dabei auf Enzyme der Glykolyse oder solche, die in Bezug dazu stehen (Enolase, Fruktosebisphosphat-Aldolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Phosphoglycerat-Kinase, Phosphoglyceromutase, Phosphopyruvat-Hydratase, Pyruvatkinase und Pyrophosphatfruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase). Die meisten dieser Enzyme konnten fast ausschließlich der Ordnung *Actinomycetales* zugeordnet werden, einige aber auch der Ordnungen *Bacteroidetes*, *Clostridiales* und den *Gammaproteobacteria*.

Daneben fanden sich mehrere Enzyme des Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsels. Acht Proteinhits wurden für das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GDH) gefunden, welches die oxidative Desaminierung von L-Glutamat zu 2-Oxoglutarat und auch die Rückreaktion katalysiert. Diese Reaktion ist der weitverbreitetste Typ des Aminosäuremetabolismus. (Schlegel, 1992) Mehr als die Hälfte dieser Hits wurden Vertretern der Ordnung *Clostridiales* zugordnet. Für das Enzym 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, aktiv im Butyratmetabolis-mus, wurden fünf Proteinhits identifiziert, die fast ausschließlich zu Vertretern der Gattung *Megasphaera sp.* gehörten. Auch einer der zwei Hits für Acyl-CoA-Dehydrogenase sowie der eine Hit für die Aldehyd-Dehydrogenase wurden für Vertreter dieser Gattung identifiziert. Andere Enzyme wurden für den Polysaccharid-, Fruktose- und Purin-Metabolismus gefunden. Enzyme des Carnitin-, Glyzerin-, Nukleotidzucker- und Malat-Metabolimus konnten nur mit je einem Hit identifiziert werden.

Die zweitgrößte Gruppe stellten die Stressproteine dar. Mit einem ähnlichen Anteil (18 %) wie in der 10 °C-Reaktorprobe wurden sie ebenfalls fast ausschließlich als Chaperone identifiziert. Der Anteil der Elongationsfaktoren und ribosomalen Proteinen (15 %) war im 20 °C-Reaktor allerdings wesentlich geringer.

An vierter Stelle kamen Proteine die an Transportvorgängen (8 %) bei verschiedenen taxonomischen Ordnungen beteiligt waren. Es wurden die gleichen Enzyme wie schon beim 10 °C-Reaktor gefunden.

Weitere Proteine konnten den Fraktionen Genregulierung (6 %), Energiekonservierung (5 %), Andere Proteine (5 %) und hypothetische Proteine (4 %) zugeordnet werden.

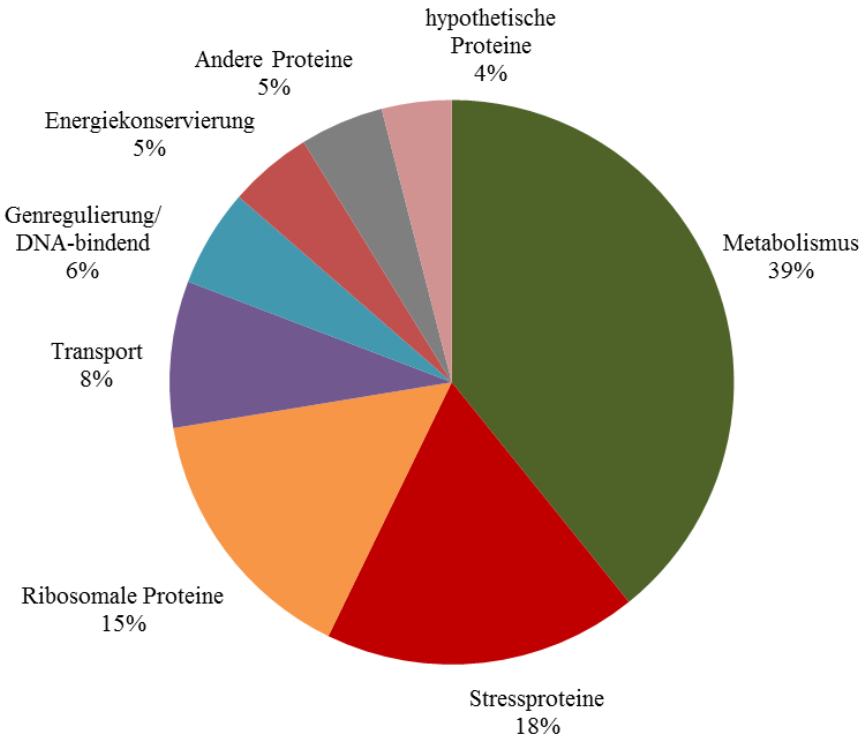

Abbildung 5-26: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R1 (20 °C, SRT = 8 d)

Die Fraktion „Andere Proteine“ setzte sich aus Proteinen mit unbekannter Funktion sowie Proteinen der Zellteilung (Zellteilungsprotein DivIVA), Pathogenese (S-Layer Protein) und Zellentgiftung (Glutathiontransferase) zusammen.

38 °C-Reaktor (R9)

Die Zusammensetzung des 38 °C-Reaktors (R9, SRT = 8 d) nach taxonomischen Klassen (siehe Abbildung 5-27) unterschied sich deutlich von den anderen zwei Reaktoren (10 °C, 20 °C). Von den 294 identifizierten Proteinhits konnten 10 % Vertretern der methanogenen *Archaea*, 4 % der Klasse *Synergistetes* und 2 % der Klasse *Spirochaetes* zugeordnet werden, die weder bei 10 °C noch bei 20 °C vorkamen. Bei den *Synergistetes* fanden sich mehrere Hits für *Aminobacterium colombiense,* welches u.a. Hefeextrakt und Aminosäuren fermentiert (Baena et al., 1998), und *Anerobaculum mobile*. Dieses Bakterium fermentiert Glucose, verschiedene organische Säuren und ebenfalls Hefeextrakt (Menes & Muxi, 2002). Unter den methanogenen *Archaea* dominierten *Methanosarcina sp.*, gefolgt von *Methanobacterium sp.*. Drei Hits fanden sich für *Methanosaeta sp.* und einer für *Methanothermobacter sp.*.

Den größten Anteil nahmen aber auch hier Proteine von Vertretern der Klassen *Actinobacteria* (27 %) und *Clostridia* (18 %) ein. Während bei den *Actinobacteria* sehr viele verschiedene Spezies identifiziert wurden, bestand die Klasse der *Clostridia* vorwiegend aus Vertretern der Gattung *Clostridium sp.* sowie wenigen der Ordnung *Thermoanaerobacterales*. Mehrere Proteine wurden beispielsweise für *C. ultunense* identifiziert. Schnürer et al. (1996) fanden bei

ihren Untersuchungen eine syntrophe Beziehung zwischen diesem Clostridium und hydrogenotrophen *Archaea*.

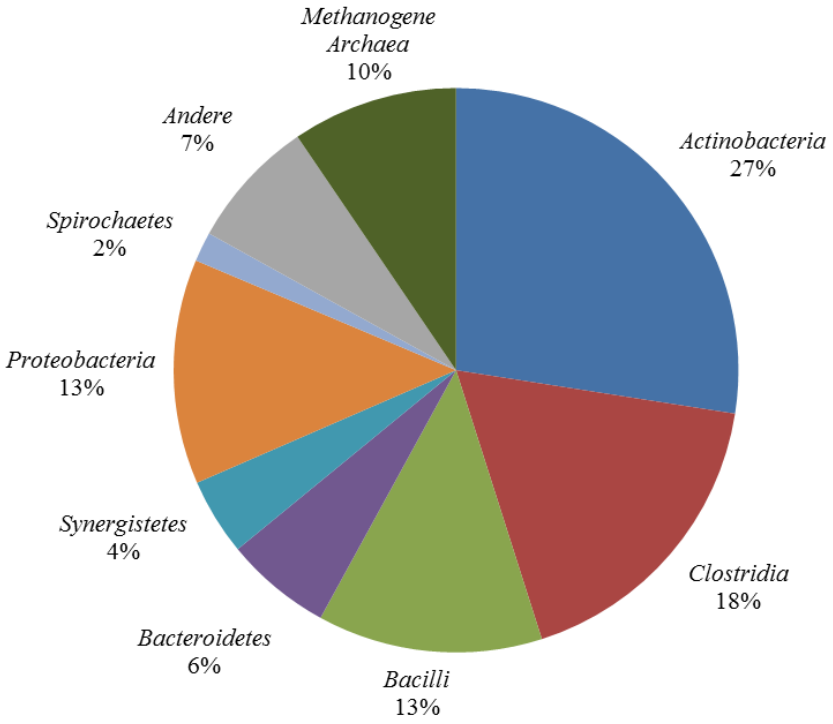

Abbildung 5-27: Populationszusammensetzung basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R9 (38 °C, SRT = 8 d)

Die drittgrößte Gruppe stellten Proteine der *Bacilli* (13 %) dar, die zu einem großen Anteil den *Bacillales* zugeordnet werden konnten. Nur ein kleiner Anteil entsprach Vertretern der Ordnung *Lactobacillales*.

Ebenfalls identifizert wurden Proteine von Mitgliedern der *Proteobacteria* (*Alpha-* (5 %), *Beta-* (1 %), *Gamma-* (3 %), und *Delta-* (3 %)) und der Klasse *Bacteroidetes* (6 %).

Die Einteilung nach den Funktionen der Proteine und biologischen Prozessen ergab, dass ein großer Teil der Proteine Stressproteine (34 %) in Form von Chaperonen waren (Abbildung 5-28). Damit nahmen sie hier einen zwei- bis dreifach so großen Anteil wie bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren ein.

Die zweitgrößte Gruppe stellten metabolische Proteine (22 %), wobei zwei Drittel davon Teil der Glykolyse sind (Enolase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglyceratmutase u.a.). Die anderen Enzyme sind vor allem am Aminosäuremetabolimus (2-Ketoisovalerat-Ferredoxin-Reduktase, Glutamat-Dehydrogenase, Alanin-Dehydrogenase, u.a.) und Fettsäurenmetabolismus (Acyl-CoA-Dehydrogenase, Phosphatacetyltransferase, u.a.) beteiligt. Während die Enzyme des Aminosäureabbaus ausschließlich Vertretern der Ordnung *Clos-*

tridiales zugeordnet werden konnten, wurde die Acyl-CoA-Dehydrogenase für verschiedene taxonomische Ordnungen gefunden.

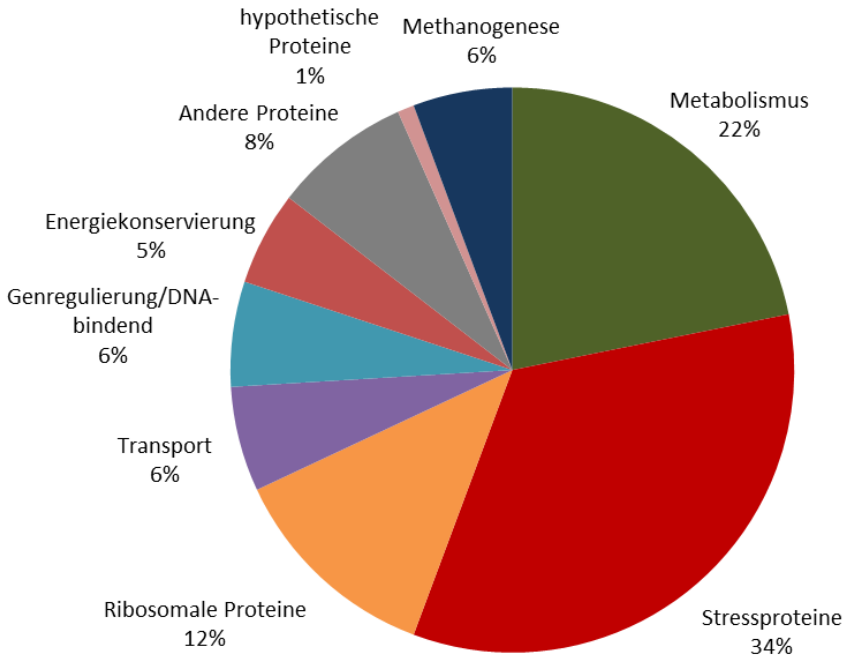

Abbildung 5-28: Proteinfunktionen basierend auf den identifizierten Proteinen mittels ESI-Ionenfalle für die Probe R9 (38 °C, SRT = 8 d)

Daneben fanden sich auch das Enzym Superoxiddismutase (für *P. freudenreichii*), welche die Zellen vor Sauerstoff schützt oder die Aconitat-Hydratase, welche im TCA-Zyklus aktiv ist.

Bei den ribosomalen Proteinen (12 %) konnte der größte Teil als Elongationsfaktoren und 50 S-Ribosomuntereinheiten identifiziert werden.

In der Gruppe „Andere Proteine“ (8 %) fanden sich Proteine der Zellteilung (Stage V Sporulationsprotein), der Proteolyse (ATP-abhängige Protease) und dem Zellschutz (S-Layer Protein). Die Enzyme Peroxiredoxin und Lipidhydroperoxid-Peroxidase wirken als Antioxidantien bei oxidativen Stress.

Weitere Proteinhits fanden sich für den Transport (6 %) (ATP-Synthase, Ryberythrin), die Genregulierung (6 %) (Crp/Fnr Family Transcriptionsregulator, u.a. Transkriptionsregulatoren) und die Energiekonservierung (5 %) (F0F1- und V-Typ-ATP-Synthase). Der Anteil hypothetischer Enzyme (1 %) war etwas geringer als bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren.

Anders als bei den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren konnten auch mehrere Enzyme der Methanogenese (6 %) identifiziert werden. Die meisten Hits wurden dabei für Methyl-CoenzymM-Reduktase bestimmt. Der ebenfalls in mehreren Proteinhits identifizierte Acetyl-CoA decar-

bonylase/synthase-Komplex ist bei der Methanbildung aus Acetat aktiv und konnte *Methanosarcina sp.* zugeordnet werden. Diese haben das größte Substratspektrum und bilden zusammen mit *Methanosaeta sp.* die Gruppe der acetoklastischen Methanogenen. Diese können neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid auch Acetat zur Methanbildung nutzen.

Wie schon die FISH-Ergebnisse, zeigen auch die Ergebnisse der Metaproteomanalyse mit ESI-Ionenfalle den großen Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung der Reaktorpopulationen. Bei 10 °C und 20 °C (mit SRT = 8 d) konnten Proteine der gleichen Bakterienklassen identifiziert werden, allerdings mit unterschiedlichen Anteilen am Gesamtproteom. Bei 38 °C (SRT = 8 d) wurden auch Proteine von *Spirochaetes*, *Synergistetes* und methanogenen *Archaea* nachgewiesen, die bei 10 °C und 20 °C nicht vorkamen. Diese können sich, aufgrund ihrer vergleichsweise langen Generationszeiten gegenüber den versäuernden Bakterien, nur bei 38 °C im Reaktor halten. Bei den anderen Temperaturen ist ihre Aktivität geringer und damit ihre Generationszeit zu lang um in den Reaktoren zu wachsen.

5.7.3 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF

Für Proben aller neun Reaktoren (R1 - R9) mit den drei Schlammverweilzeiten 8 d, 4 d und 1d wurde je ein Zellaufschluss mit einer Phenolextraktion und Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Bei der 2D-PAGE mit 7 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) wurde 400 µg Protein und bei den 18 cm IPG-Streifen (pH 4 - 7) 800 µg Proteinmenge eingesetzt. Für alle Proben erfolgten die 2D-PAGEs als Duplikate.

Für die kleinen 2D-Gele (7 cm Streifen) konnten sehr gute Trennergebnisse der Proteine erreicht werden. Die Auftrennung der Proteine auf den großen 2D-Gelen (18 cm Streifen) hingegen war nicht zufriedenstellend. Bei einem Großteil der 2D-Gele waren nur wenige oder gar keine Proteinspots sichtbar. Der Vergleich der Gele und die Analyse ausgewählter Proteinspots für die Reaktoren mit verschiedener Temperatur und Schlammverweilzeit fanden daher nur anhand der kleinen Gele statt.

Aus den kleinen 2D-Gelen für die Reaktoren R1 - R6 (10 °C und 20 °C, SRT = 1 d, 4 d und 8 d) wurden insgesamt 288 Spots ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Nach Abzug unspezifischer Proteine, wie zum Beispiel Keratine, konnten 163 Proteine mittels MASCOT^{TM}-Suche gegen NCBInr und UniProt über mindestens ein Peptid identifiziert werden.

Die 2D-Gele der 38 °C-Reaktoren wurden für eine Auswertung und einen Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Temperaturen nicht berücksichtigt, da eine sinnvolle Software-Auswertung nicht möglich war. Die 2D-Gele der 38 °C-Reaktoren unterschieden sich zu stark von denen der anderen zwei Temperaturen und konnten mittels der Delta2D-Software mit diesen nicht zufriedenstellend übereinandergelegt und verglichen werden.

Die ausgewählten und ausgeschnittenen Spots unterschieden sich zu den Spots im zu vergleichenden Gel einmal durch die Änderung in ihrem Volumen. Dieses sollte maximal halb oder

aber mindestens doppelt so groß wie im Vergleichsgel sein. Außerdem mussten sie beim t-Test zwischen Gelen derselben Gruppe, d.h. Gele von Reaktorproben gleicher Temperatur und gleicher SRT, über 95 % aufweisen. Auf diese Weise wurden nur signifikante Unterschiede in den Proteinmustern zwischen verschiedenen Reaktoren identifiziert.

Die Vergleiche der Gele erfolgten zum einen zwischen den Reaktoren gleicher Temperatur mit verschiedenen Schlammverweilzeiten und zum anderen zwischen den Reaktoren verschiedener Temperatur mit gleicher Schlammverweilzeit. Dabei wurden immer die besten Gele jeder Gruppe (d.h. Reaktoren gleicher Temperatur und gleicher SRT) miteinander verglichen.

Vergleich 1: 10 °C-Reaktoren mit unterschiedlicher Schlammverweilzeit

Abbildung 5-29 zeigt den Vergleich zwischen dem gruppenbesten 2D-Gel für 10 °C mit 8 d Schlammverweilzeit (R4, 10 °C, Gel A) und dem gruppenbesten 2D-Gel für 4 d Schlammverweilzeit (R5, 10 °C, Gel B). Dargestellt sind außerdem die ausgewählten und identifizierten Spots des jeweiligen Gels. Von insgesamt 25 ausgewählten Spots konnten in acht Spots Proteine identifiziert werden. Die Liste mit den identifizierten Proteinen ist in Tabelle 9-9 im Anhang zusammengestellt.

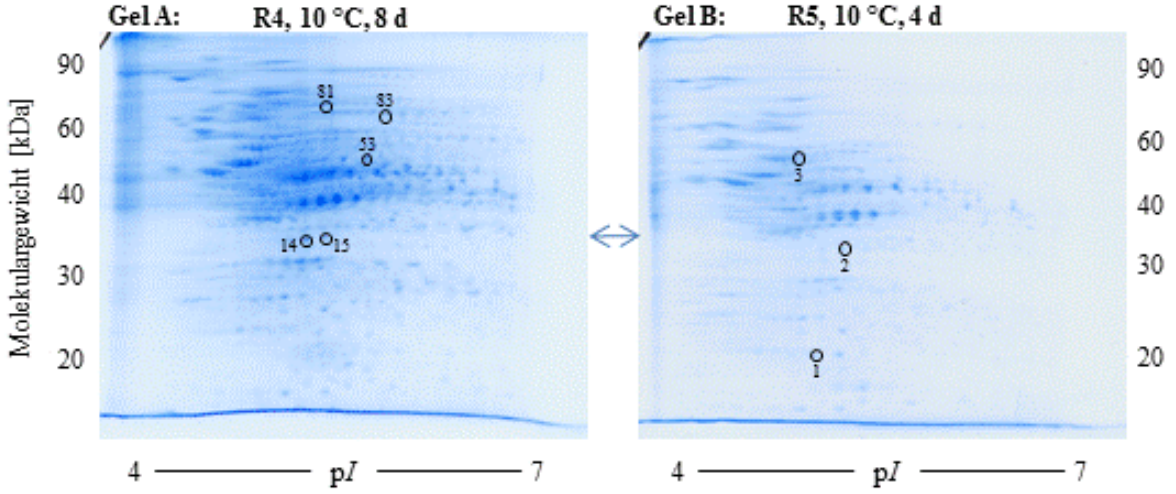

Abbildung 5-29: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d) mit Gel B (R5, 10 °C, SRT = 4 d).

Die Spots 14, 15 und 53 konnten in Gel A mit drei bis fünffach größerem Volumen gefunden werden als in Gel B. Die Proteine in Spot 14 und 15 wurden als 30 S ribosomale Proteine S2 der Gattung *Lactococcus sp.* identifiziert. Diese spielen bei der Translation eine wichtige Rolle, die ein zentraler Bestandteil der Proteinbiosynthese ist. Spot 53 wurde als Flagellin von *Clostridium sp.* erkannt. Des Weiteren wurden Methylmalonyl-CoA-Mutase (Spot 81, *Propionibacterium freudenreichii*), ein wichtiges Enzym der Propionsäuregärung, und Acyl-CoA-Dehydrogenase (Spot 83), beteiligt an der ß-Oxidation von Fettsäuren, gefunden. Spot 83 war

in Gel A sechsmal größer als in Gel B. Dies weist darauf hin, dass bei 8 d Schlammverweilzeit eine größere Menge von diesem Enzym vorhanden gewesen war als bei 4 d Schlammverweilzeit. In Gel B wurden Proteine der Aminosäurebiosynthese (Spot 2 und 3) und der Glykolyse (Pyruvatkinase, Spot 3) identifiziert. Spot 1 wurde dem Protein Superoxiddismutase zugeordnet, welches Sauerstoffradikale entfernt. Dieser Spot war in Gel B (SRT = 4 d) dreimal und in Gel C (SRT = 1 d, siehe Abbildung 5-30) vier bis fünfmal größer als in Gel A (SRT = 8 d). Die Belastung mit Sauerstoff durch die tägliche Substratzufuhr wurde mit abnehmender Schlammverweilzeit stärker, so dass mehr Superoxiddismutase gebildet wurde.

Bei dem Vergleich der Gele A (SRT = 8 d) und C (SRT = 1 d) wurden 43 Spots analysiert. 22 der Spots konnten bekannten Proteinen zugeordnet werden (Abbildung 5-30). In Gel A wurden wieder die Spots 14, 15 und 53 in drei- bis fünffach größerem Volumen gefunden. Daneben konnten auch noch einige Enzyme der Glykolyse (Pyruvatkinase, Phospho-glyceromutase und Phosphopyruvat-Hydratase) von verschiedenen taxonomischen Ordnungen identifiziert werden. In Spot 104 verbargen sich neben der Glutamat-Dehydrogenase, beteiligt am Aminosäuremetabolismus, noch Phosphopyruvat-Hydratase und ein Protein, welches an DNA-Abbau, -Reparatur und -Rekombination beteiligt ist.

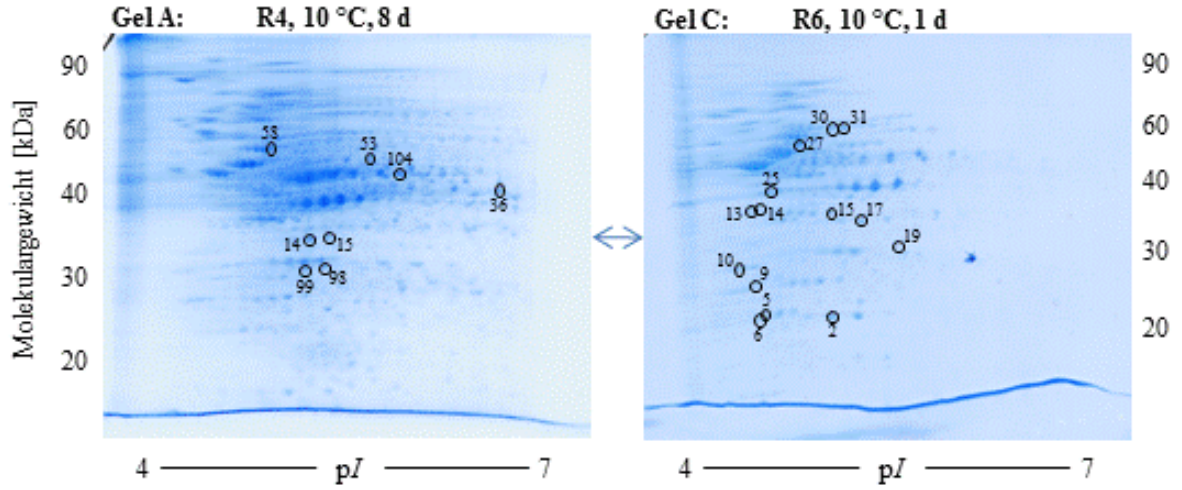

Abbildung 5-30: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d) mit Gel C (R6, 10 °C, SRT = 1 d).

Die Spots 2 (Superoxiddismutase) und 17 (Cysteinsynthase) in Gel C sind identisch mit den Spots 1 und 2 in Gel B. Andere Enzyme sind der Glykolyse (Spot 30: Glucose-6-phosphate-Isomerase) und dem Tricarbonsäurezyklus (Spot 31: Dihydrolipoamid-Acetyltransferase) zuzuordnen, welche Schritte des Glucoseabbaus darstellen. Daneben konnten L-Lactat-Dehydrogenase (Spots 15, 25), ein wichtiges Enzym der Milchsäuregärung, und das Enzym Acetolactat-Synthase (Spots 30, 31), welches an der Aminosäurebiosynthese beteiligt ist, identifiziert werden. ATP-bindende und am Transport (Spots 9, 27) beteiligte Proteine konnten für Organismen der Ordnung *Bacillales* gefunden werden.

Beim Vergleich der 10 °C-Reaktoren konnten für die Schlammverweilzeiten von 4 d und 1 d vorwiegend Proteine der taxonomischen Ordnungen *Lactobacillales* und *Actinomycetales* gefunden werden. Die dominierenden Spezies waren dabei *Lactococcus raffinolactis* und *Propionibacterium freudenreichii*. Für die 8 d Schlammverweilzeit wurden Proteine für verschiedene *Lactococcus sp.* und Vertreter der Ordnungen *Clostridiales, Bacteroidales* und anderer identifiziert.

Vergleich 2: 20 °C-Reaktoren mit unterschiedlicher Schlammverweilzeit

Die Gele der 20 °C-Reaktoren wurden auf die gleiche Weise untereinander verglichen wie die der 10 °C-Reaktoren. Dabei wurden wieder die Spots mit den größten Unterschieden ausgeschnitten und analysiert. In den Abbildungen 5-31 und 5-32 sind die zwei Vergleiche von R3, 20 °C, SRT = 8 d (Gel D) mit R2, 20 °C, SRT = 4 d (Gel E) und mit R2, 20 °C, SRT = 1 d (Gel F) dargestellt. In diesen zwei Vergleichen wurden 98 Spots ausgeschnitten, von denen 48 identifiziert werden konnten. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 9-10 im Anhang aufgelistet.

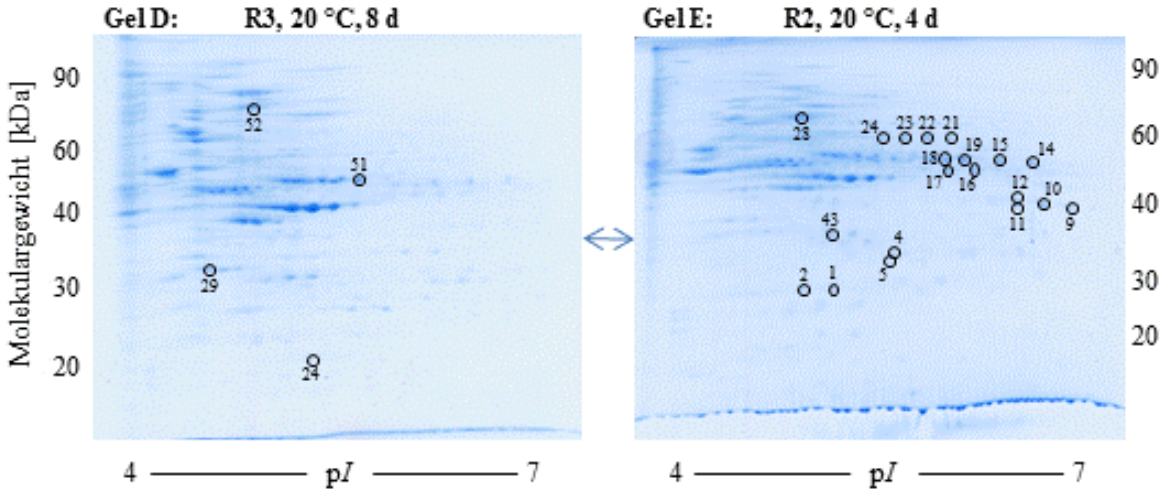

Abbildung 5-31: Identifizierte Proteinpots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel E (R2, 20 °C, SRT = 4 d).

Für den Vergleich 8 d mit 4 d Schlammverweilzeit wurden für erstere vier Spots identifiziert, die den biologischen Prozessen Glykolyse und Pentosephosphatweg (Spot 29), ATP-Katabolismus und Zuckertransport (Spot 51), DNA-Replikation (Spot 24) sowie der Glykogensynthese (Spot 52) zugeordnet werden konnten, alle für die Gattung *Actinomyces sp*. Bei Gel E verbargen sich hinter vier der 20 Spots Proteine, die in der Glykolyse aktiv sind. Eines davon, Triosephosphat-Isomerase, wurde in mehreren Spots (19, 22, 23 und 24) für verschiedene phylogenetische Ordnungen gefunden. Vor allem die letzten drei Spots, für ein Deltaproteobakterium, waren 10 bis 250mal größer als in Gel D. Ebenfalls in mehreren Spots (2, 21 und 22) identifiziert wurde das Enzym 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, welches bei der Buttersäure-Butanol-Gärung durch Clostridien aktiv ist. Die 6 bis 50mal größeren Spots spre-

chen für eine verstärkte Buttersäure-Butanol-Gärung bei 4 d Schlammverweilzeit gegenüber 8 d Schlammverweilzeit. Weitere Enzyme der organischen Säurebildung sind die Malat-Dehydrogenase (Spot 4 und 5), beteiligt an der Propionsäuregärung, sowie Lactat-Dehydrogenase (Spot 14), ein wichtiges Enzym der Milchsäuregärung. Ein Enzym des Aminosäurestoffwechsels ist (NADP-spezif.) Glutamat-Dehydrogenase (Spot 9 und 12). Spot 10 konnte dem Enzym Isocitrat-Lyase, aktiv im Glyoxylsäurezyklus, zugeordnet werden und wies ein 79mal größeres Volumen gegenüber dem gleichen Spot in Gel D auf.

Die identifizierten Proteine konnten Vertretern der Ordnungen *Selenomonadales* (*Megasphaera sp.*), *Clostridiales*, *Pseudomonadales* (*Gammaproteobacteria*), *Desulfuromo-nadales* (*Deltaproteobacteria*), *Actinomycetales* sowie *Bacteroidetes* und *Lactobacillales*, mit je einem Proteinhit, zugeordnet werden.

Bei dem Vergleich 8 d (Gel D) mit 1 d Schlammverweilzeit (Gel F) sind in Gel D wieder die Spots 24 und 29 zu finden gewesen (Abbildung 5-32). Beim Vergleich mit den 4 d Schlammverweilzeit waren diese drei bis viermal größer für die 8 d Schlammverweilzeit. Gegenüber den gleichen Spots bei 1 d Schlammverweilzeit waren diese dann sogar vier- bis fünfmal so groß. Die Konzentration dieser Proteine hat mit kürzer werdender Schlammverweilzeit abgenommen. Diese hat entweder abgenommen, weil die Aktivität der Proteine gesunken ist oder weil weniger der Bakterien im Reaktor vorkamen, die diese Proteine exprimiert haben. Neben der Triosephosphat-Isomerase (Spot 29) konnten noch weitere Enzyme der Glykolyse identifiziert werden, die zum Teil in mehreren Spots vorkamen. So zum Beispiel Fruktosebisphosphat-Aldolase (Spots 17, 40 und 41) sowie Glygeraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Spots 42 - 44 und 46). Ebenfalls in den Spots 42 - 44 gefunden wurde Lactat-Dehydrogenase. Schließlich fand sich in Spot 45 noch ein Enzym der Proteinbiosynthese, der Elongationsfaktor Tu.

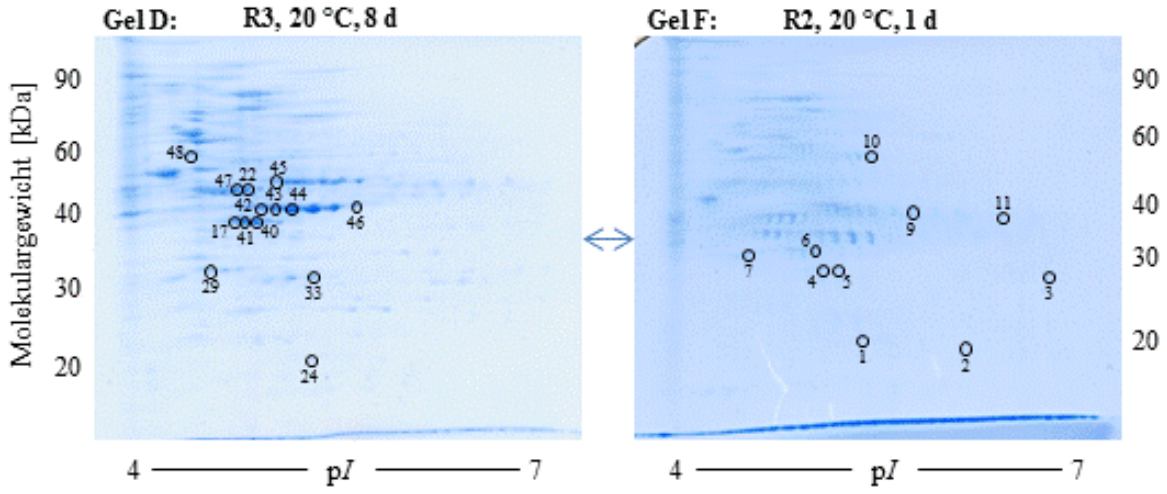

Abbildung 5-32: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel F (R2, 20 °C, SRT = 1 d).

Für die Schlammverweilzeit von 1 d wurden Proteine sehr verschiedener metabolischer Prozesse klassifiziert. Phosphoglyceromutase (Spot 3) und Fruktosebisphosphat-Aldolase (Spots 9 - 11) sind an der Glykolyse beteiligt. Wie schon für SRT = 4 d konnte auch hier das beim Butyratmetabolismus aktive Enzym 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in zwei Spots (4, 7) gefunden werden, die sehr viel größer waren als bei SRT = 8 d. Spot 5 und 6 wurden einem transkriptionalen Faktor der Crp/Fnr-Familie zugeordnet. Diese DNA-bindenden Proteine zeigen vorwiegend einen positiven Einfluss auf die Transkription. Schließlich konnte in Spot 1 und 2 Methioninsulfoxid-Reduktase A identifiziert werden. Dieses Enzym besitzt eine wichtige Funktion bei der Reparatur von Proteinen, die durch Sauerstoff inaktiviert wurden. Es katalysiert die reversible Oxidation-Reduktion von Methioninsulfoxid in Proteinen zu Methionin. Die Belastung durch Sauerstoff hat, wie schon bei den 10 °C-Reaktoren, mit kürzer werdender Schlammverweilzeit zugenommen, so dass mehr Enzyme zur Inaktivierung von Sauerstoff exprimiert wurden.

Die identifizierten Proteine für 8 d Schlammverweilzeit konnten fast ausschließlich der Gattung *Actinomyces sp.* zugeordnet werden. Mit nur einem Hit wurde ein Protein (Outer membrane insertion signal) für *Megasphaera sp.* gefunden. Für 1 d Schlammverweilzeit konnten neben Zuordnungen zu *Actinomyces sp.* auch einige Proteine der Gattung *Clostridium sp.* sowie einem nicht-kultivierten Bakterium zugeordnet werden.

Vergleich 3: 10 °C- und 20 °C-Reaktoren bei verschiedenen Schlammverweilzeiten

Nach den Vergleichen der Reaktoren gleicher Temperatur und unterschiedlicher Schlammverweilzeit untereinander, wurden als letztes die Reaktoren unterschiedlicher Temperatur bei den verschiedenen Schlammverweilzeiten verglichen. Dabei konnten in 134 von 267 ausgewählten Spots Proteine identifiziert werden (siehe Tabelle 9-11 im Anhang).

Für den Vergleich der Reaktoren bei 20 °C (Gel D) und 10 °C (Gel A) mit einer Schlammverweilzeit von 8 d konnten von 124 ausgeschnittenen Spots 39 identifiziert werden (Abbildung 5-33). Im Gel D fanden sich davon fünf Spots, wovon drei Spots (17, 40 und 41) als Fruktosebisphosphat-Aldolase (Glykolyse) der Gattung *Actinomyces sp.* identifiziert wurden. Die anderen zwei Spots (22 und 47) waren Proteine unbekannter Funktion (Outer membrane insertion signal), der Gattung *Megasphaera sp.* zugehörig.

Im Gel A fanden sich neun Spots mit Enzymen der Glykolyse, deren Volumen zwischen drei und sechsmal größer waren als in Gel D, Spot 91 sogar 35mal größer. Pyruvatkinase (Spots 58-61) und Enolase (Spots 65, 66) wurden in mehreren Spots identifiziert und konnten den Gattungen *Lactococcus sp.* und *Streptococcus sp.* zugeordnet werden. Die 6-Phosphofuktokinase (Spots 20, 91) fand sich auch in zwei Spots für die Ordnungen *Bacillales* und *Lactobacillales*. Andere metabolische Enzyme konnten dem Aminosäurestoffwechsel (Cystein-Synthase (Spot 16), Glutamat-Dehydrogenase (Spots 44, 45)) und der Propionsäuregärung (Transcarboxylase 5S Untereinheit, Methylmalonyl-CoA Carboxyl-transferase 5S Untereinheit, Methylmalonyl-CoA-Mutase) zugeordnet werden. Die Glutamat-Dehydrogenase wurde für Vertreter der Gattungen *Clostridium sp.* und *Bacteroides sp.* gefunden. Die Cys-

tein-Synthase gehörte zu *P. freudenreichii* ebenso wie die Enzyme der Propionsäuregärung. Sogar ein Enzym (Acyl-CoA Dehydrogenase, Spot 83) der ß-Oxidation von Fettsäuren wurde gefunden.

Als ribosomale Proteine wurden das 30S ribosomale Protein S2 (Spots 13 - 15) und 50S ribosomale Protein L10 (Spot 273), beide aktiv bei der Translation, sowie der Elongationsfaktor Tu (Spots 62 - 64 und 82), aktiv bei der Proteinbiosynthese, identifiziert. Bis auf einen Hit konnten alle anderen der Ordnung *Lactobacillales* zugeordnet werden.

In Spot 51 fand sich für Vertreter verschiedener Ordnungen (*Pseudomonadale*s, *Bacillales, Actinomycetales*) ein Zucker-Transport-Protein und in Spot 55 neben Enzymen der Propionsäuregärung auch ein Stressprotein (Chaperon GroEL) der Ordnung *Desulfovibrionales* (*Deltaproteobacteria*). Schließlich fand sich Flagellin, ein globuläres Protein der bakteriellen Geißeln, in den Spots 52 - 54 für *Clostridium sp.*

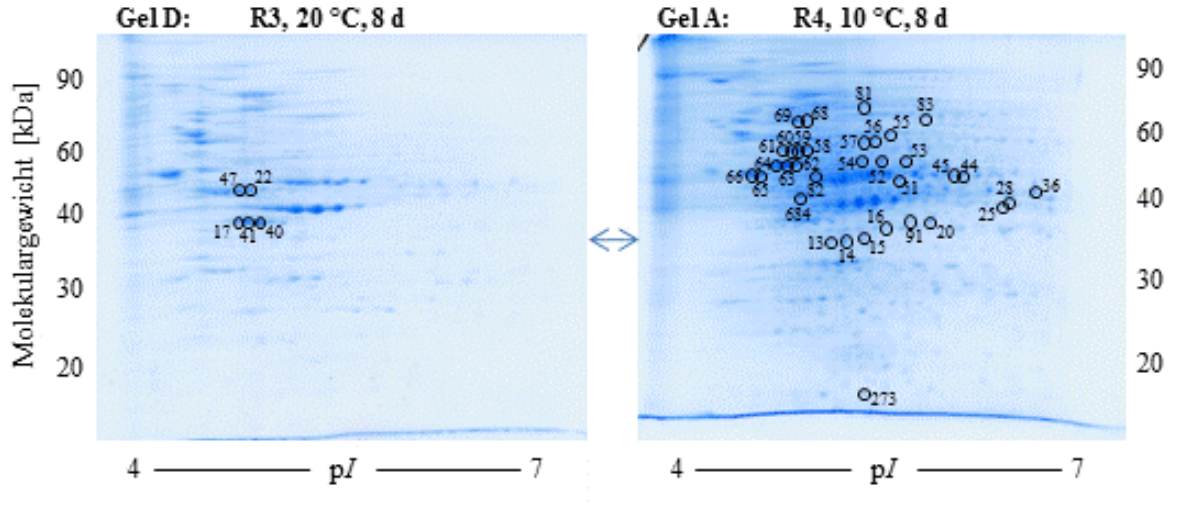

Abbildung 5-33: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel D (R3, 20 °C, SRT = 8 d) mit Gel A (R4, 10 °C, SRT = 8 d).

Der Vergleich 10 °C, SRT von 4 d (Gel B) mit 20 °C, SRT von 4 d (Gel E) ergab 43 identifizierte von 55 ausgeschnittenen und analysierten Proteinspots (Abbildung 5-34). Für Gel E fand sich neben einem Protein („outer membrane insertion signal“) unbekannter Funktion nur ein Membranprotein (Spot 7), beteiligt am Transport von Stoffen durch die äußere Bakterienmembran. Alle anderen Proteine, wurden als Enzyme verschiedener metabolischer Prozesse identifiziert. In fünf der Spots (13, 19, 22 - 24) verbargen sich Enzyme der Glykolyse (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase). Die Triosephosphat-Isomerase wurde dabei in 4 Spots für Vertreter verschiedener Ordnungen nachgewiesen. Als Enzym des Butyratmetabolismus konnte 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in drei Spots (2, 21, 22) für *Clostridium sp.* identifiziert werden. Malat-Dehydrogenase (Spots 4, 5) und Isocitrat-Lyase (Spot 10) sind Enzyme der Propionsäuregärung und des Glyoxylsäure-Zyklus und wurden für Vertreter von *Pseudomonadales* gefunden. Schließlich fand sich auch ein En-

zym des Aminosäure-stoffwechsels, die (NADP-spezif.) Glutamat-Dehydrogenase (Spots 9, 12) für *Clostridium sp.* und *Bacteroides sp*.

Auch in Gel B konnten die meisten Spots verschiedenen metabolischen Enzymen zugeordnet werden. Ein Großteil dieser sind Enzyme der Glykolyse (Pyruvatkinase, Phosphoglycerat-Mutase, Enolase, 6-Phosphofructokinase, Aldose 1-Epimerase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase). Diese fanden sich fast ausschließlich für Vertreter der Ordnungen *Actinomycetales* (*P. freudenreichii*) und *Lactobacillales* (*Lactococcus sp*., *Streptococcus sp.*). Die Enzyme Phosphoglycerat-Mutase, 6-Phospho-fructokinase und Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase konnten zudem in mehreren Spots identifiziert werden. Neben den zahlreichen Enzymen der Glykolyse fanden sich Enzyme der Aminosäurebiosynthese (Cystein-Synthase (Spot 2, 13), Arginin-Synthase (Spot 3)) und des Aminosäureabbaus (Glutamat-Dehydrogenase (Spot 19)). Cystein-Synthase und Arginin-Synthase konnten dem Bakterien *P. freudenreichii* zugeordnet werden, die Glutamat-Dehydrogenase Vertretern von *Clostridium sp.* und *Streptococcus sp*.. Ebenfalls für *P. freudenreichii* fanden sich in den Spots 28 - 31 und 38 verschiedene Enzyme des Propion-säuremetabolismus (Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase, Transcarboxylase, Methyl-malonyl-CoA-Mutase). Einzelne Proteinhits konnten für Enzyme des Butyrat- (Spot 12) und Acetyl-CoA-Metabolismus (Spot 47) sowie für die Porphyrin- und Purinbiosynthese (Spots 45 und 47) identifiziert werden.

Während für 20 °C mit 4 d Schlammverweilzeit die meisten Proteinhits den Ordnungen *Pseudomonadales* (*Gammaproteobacteria*) und *Clostridiales* zugeordnet werden konnten, waren es für 10 °C mit 4 d Schlammverweilzeit Proteine der Ordnungen *Actinomycetales* (*P. freudenreichii*) und *Lactobacillales* (*Lactococcus sp*., *Streptococcus sp.*).

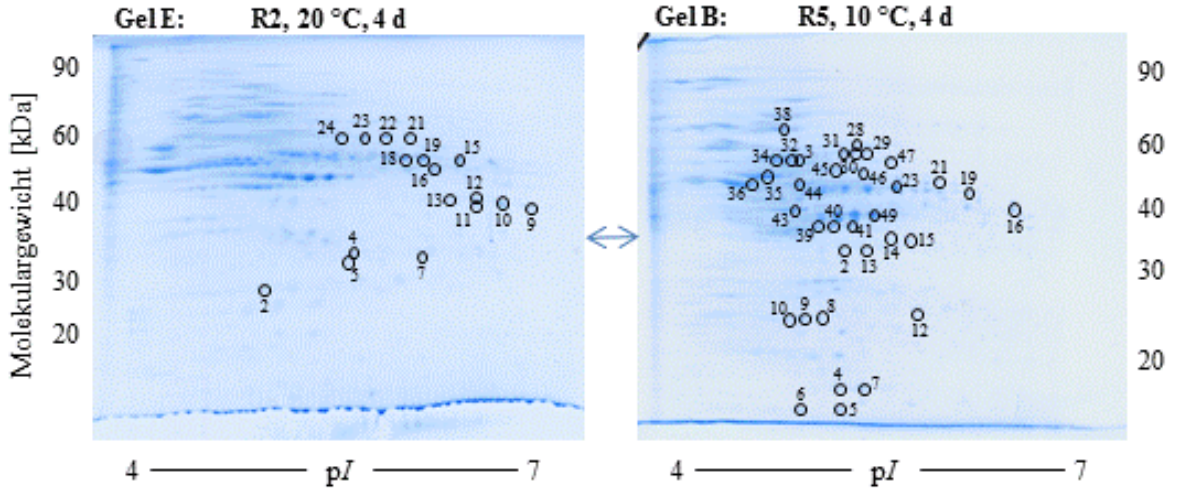

Abbildung 5-34: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel E (R2, 20 °C, SRT = 4 d) mit Gel B (R5, 10 °C, SRT = 4 d).

Der letzte Vergleich fand zwischen 10 °C mit 1 d SRT (Gel C) und 20 °C mit1 d SRT (Gel F) statt (Abbildung 5-35). Von den 88 ausgeschnittenen Spots konnten 52 Spots Proteinen zugeordnet werden, nur fünf davon für Gel F. Drei Spots entfielen dabei auf Enzyme der Glykolyse (Phosphoglyceromutase (Spot 3), Fruktosebisphosphat-Aldolase (Spots 9, 12) und die anderen beiden auf ein Enzym des Butyratmetabolismus (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Spot 4)) und einen Transkriptionsregulator (Crp/Fnr-Familie). Die zugehörigen taxonomischen Ordnungen waren *Actinomycetales*, *Clostridiales* und ein „*Nicht-kultiviertes Termiten Gruppe 1 Bakterium*“.

In Gel C konnten viele Enzyme der Glykolyse identifiziert werden, die meisten davon für Vertreter der Ordnung *Lactobacillales* (*Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.*), ähnlich wie schon für 10 °C mit 4 d Schlammverweilzeit. Dabei wurden Phosphoglycerat-Mutase, Phosphoglyceromutase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphofructokinase und Enolase in mehreren Spots gefunden, auch das ähnlich wie bei Gel B (10 °C, SRT = 4 d).

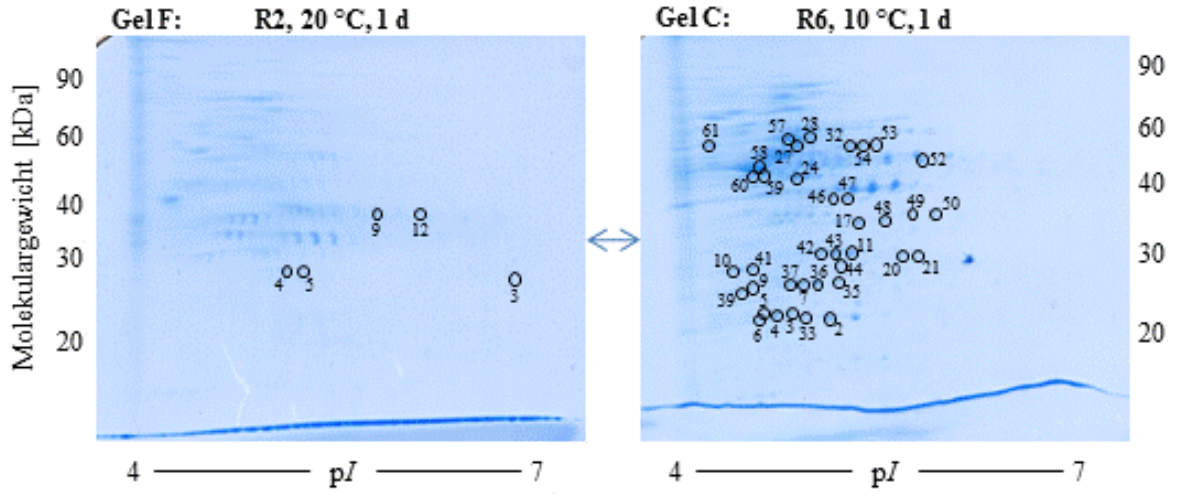

Abbildung 5-35: Identifizierte Proteinspots aus dem 2D-Gele-Vergleich Gel F (R2, 20 °C, SRT = 1 d) mit Gel C (R6, 10 °C, SRT = 1 d).

Enzyme der Aminosäurebiosynthese (Cystein-Synthase (Spot 17, 48), Arspartat-Ammonium-Lyase (Spot 28)) konnten *P. freudenreichii* zugeordnet werden. Weitere metabolische Enzyme fanden sich für die Polysaccharidbiosynthese (Glucose-1-phosphat- thymidylyltransferase, Spot 10), den Fumaratmetabolismus (Fumarat-Hydratase, Klasse II (Spots 32 und 53, 54)) und N-Glycanbiosynthese (Dolichyl-phosphat-beta-D-mannosyl-transferase (Spot 42)). Das Enzym der Polysaccharidbiosynthese gehörte zu Vertretern der Gattungen *Lactococcus sp.* und *Streptococcus sp*. Die anderen zwei Enzyme wurden der Gattung *Propionibacterium sp.* zugeordnet. Die Superoxiddismutase wurde bisher nur bei aerotoleranten Mikroorganismen nachgewiesen und scheint essentiell für die Toleranz gegenüber Sauerstoff zu sein. Das Enzym katalysiert die Reaktion von den Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff (Schlegel, 1992). Vier Proteinhits konnten dem Transport (Eisen ABC Transporter, ABC Transpor-

ter (Spots 9, 11, 27, 43)) zugeordnet werden. Schließlich fanden sich mit je einem Hit ein Zellteilungsprotein (FtsZ (Spot 61)), das Enzym Amidotransferase (Spot 32), aktiv bei Proteinbiosynthese, ein an der Proteinfaltung beteiligtes Enzym (Allophanat-Hydrolase (Spot 20)) sowie je ein Enzym der Energiekonservierung (ATP-Synthase (Spot 27)).

Die Proteinhits für Gel C (10 °C, SRT = 1 d) konnten vorwiegend Vertretern der Ordnungen *Lactobacillales* und *Actinomycetales* zugeordnet werden.

Von allen 288 ausgeschnitten Proteinspots konnten nur etwa 57 % identifiziert werden. Erst wenn mehr Genom- und Proteomdaten in den Datenbanken vorhanden sind, wird es möglich sein umfangreichere Identifizierungen durchzuführen.

Die identifizierten Proteinspots auf allen sechs Gelen (für alle Vergleiche) entsprachen, bezogen auf das Volumen der Proteinspots, nur zwischen 11 % und 20 % aller vorhandenen Proteinspots auf den Gelen. Dabei entfiel der größte Anteil auf verschiedene Enzyme der Glykolyse (außer bei Vergleich 10 °C, 4 d SRT mit 10 °C, 8 d SRT).

Bei den Gelen der 10 °C-Reaktoren wurden vor allem Proteine der Gattungen *Lactococcus* und *Propionibacterium* identifiziert. Dabei traten die zwei Spezies *Lactococcus raffinolactis* und *Propionibacterium freudenreichii* besonders oft auf. Bei 8 d Schlammverweilzeit fanden sich auch Spots für *Bacteroides* und *Clostridium*. Die meisten Spots auf den Gelen der 20 °C-Reaktoren entfielen auf die Gattung *Actinomyces*.

Auffällig war, dass für 10 °C und 20 °C mit 1 d Schlammverweilzeit sowie 10 °C mit 4 d Schlammverweilzeit Proteine identifiziert wurden, die dem Schutz der Zellen vor Sauerstoff dienen. Der Einfluss auf die Mikroorganismen hat aufgrund der täglichen Substratzufuhr und der geringen Biomassekonzentration bei diesen kurzen Schlammverweilzeiten zugenommen.

In allen Gelen fanden sich Proteine, die in mehreren Spots identifiziert wurden. Dieses Phänomen bei 2D-Gelen ist bekannt, aber bisher noch nicht geklärt. Als mögliche Ursachen kommen Stamm-Variationen, posttranslationale Modifikationen oder Isoenzyme aus verschiedenen Genen in Frage. (Benndorf et al., 2007, Abram et al., 2011)

6 Diskussion

6.1 Zusammenhang zwischen Spektrum der Metabolite und Populationszusammensetzung

Das Produktspektrum hängt neben dem eingesetzten Substrat und den Fermentationsbedingungen von der Zusammensetzung der Reaktorbiozönose und deren Aktivität ab. Die molekularbiologische Untersuchung mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Metaproteomanalyse der Biozönosen bei verschiedenen Bedingungen (T, SRT) ermöglicht ein besseres Verständnis für die Abbauvorgänge in dem System. Es wird nachfolgend das ermittelte Produktspektrum mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Methoden verglichen und diskutiert.

6.1.1 Zusammenhang zwischen dem Produktspektrum und den Ergebnissen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Konzentrationen der gebildeten organischen Säuren und Alkohole unterschieden sich zum Teil deutlich, sowohl zwischen den Reaktoren verschiedener Temperatur als auch zwischen den Reaktoren gleicher Temperatur mit unterschiedlichen Schlammverweilzeiten. Die Abbildungen 6-1 bis 6-3 zeigen die organischen Säuren (Acetat, Propionat) und Alkohole (Ethanol, 2-Butanol) mit den höchsten Konzentrationen in den Reaktoren sowie die Populationszusammensetzung (Ergebnisse der FISH-Analyse) über der Schlammverweilzeit für die Reaktoren verschiedener Temperatur.

Die FISH-Ergebnisse für die 10 °C-Reaktoren zeigen eine fast gleichbleibende Zusammensetzung der Population für die drei untersuchten Schlammverweilzeiten von 8 d, 4 d und 1 d. Die dominantesten Gruppen stellten dabei die Clostridien (ClostI, Synm700) und die Actinobakterien (HGC69a) dar. Auch Vertreter des Phylums *Bacteroidetes* (CFB719) und Gammaproteobakterien (Gam42a) wurden nachgewiesen. Mit sinkender Schlammverweilzeit nahm der Anteil an ClostI-markierten und CFB719-markierten Zellen leicht ab. Auch der Anteil an Zellen, die insgesamt mit den eingesetzten Sonden markiert wurden, nahm mit sinkender Schlammverweilzeit ab, von 45 % auf 31 %.

Die Konzentrationen von Ethanol und 2-Butanol lagen bei 8 d und 4 d Schlammverweilzeit konstant bei durchschnittlich 450 mg/l und 760 mg/l. Nur bei der Schlammverweilzeit von 1 d lagen die Werte mit 350 mg/l und 460 mg/l etwas niedriger. Im Zusammenhang mit der niedrigeren Hybridisierungsrate liegt die Ursache dafür sehr wahrscheinlich im Auswaschen bestimmter Bakterien bei dieser kurzen Schlammverweilzeit. Die Acetatkonzentration nahm mit sinkender Schlammverweilzeit von 1.000 mg/l auf 600 mg/l ab. Dies weist darauf hin, dass Acetat-bildende Bakterien weniger geworden sind. Einige dieser Bakterien fallen unter die ClostI-markierten Zellen, die mit sinkender Schlammverweilzeit leicht abgenommen haben. Die Propionatkonzentration hingegen blieb nahezu konstant bei 400 - 500 mg/l.

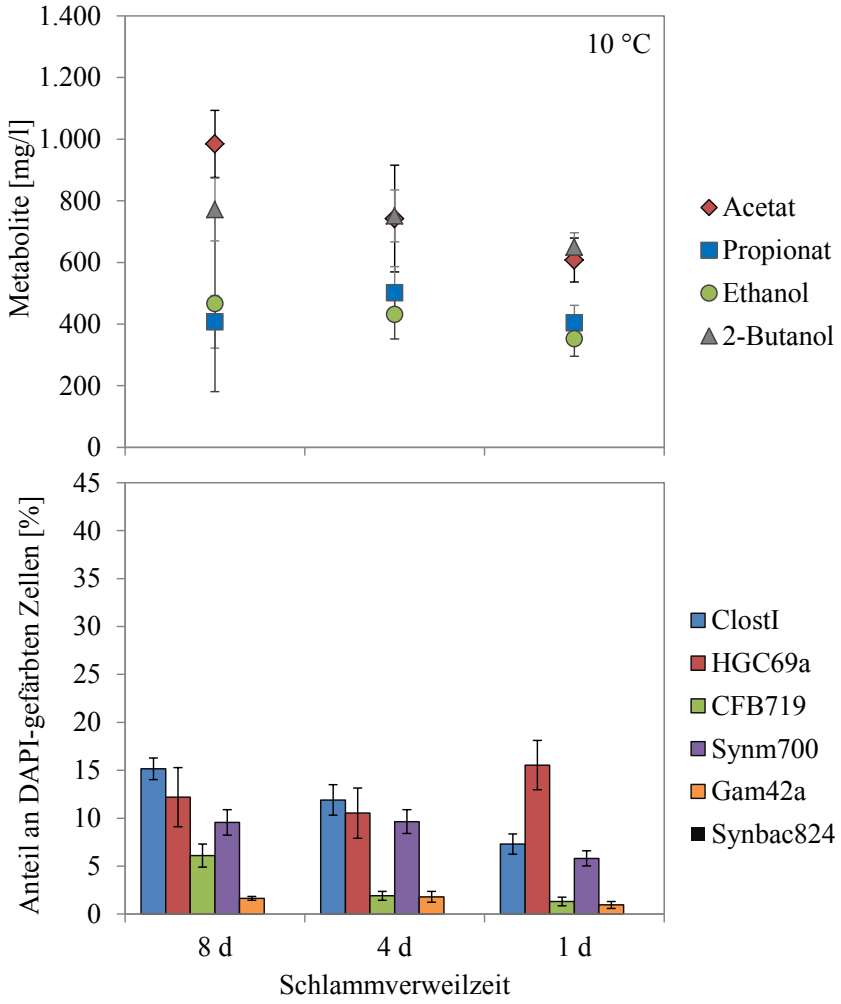

Abbildung 6-1: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 10 °C-Reaktoren

Stärkere Veränderungen in der Populationszusammensetzung konnten für die 20 °C-Reaktoren festgestellt werden. Hier stieg mit sinkender Schlammverweilzeit vor allem der Anteil an *Bacteroidetes* (CFB719) und *Gammaproteobacteria* (Gam42a). Die größte Gruppe bei allen drei Schlammverweilzeiten bildeten Vertreter der Familie *Syntrophomondaceae* (Synm700). Bei 4 d Schlammverweilzeit dominierten die Actinobakterien (HGC69a). Anders als bei den 10 °C-Reaktoren stieg hier der Anteil der mit den Sonden hybridisierten Zellen mit sinkender Schlammverweilzeit von 18 % auf 48 %.

Die Acetatkonzentration lag mit Werten von durchschnittlich 470 mg/l bis 570 mg/l generell niedriger als bei den 10 °C- und 38 °C-Reaktoren und war nahezu konstant über alle drei Schlammverweilzeiten. Ähnlich verhielt es sich mit der Propionatkonzentration. Allerdings zeigte diese den niedrigsten Wert bei 4 d Schlammverweilzeit, wo sie mit 280 mg/l deutlich unter den Werten für 8 d (500 mg/l) und 1 d (390 mg/l) Schlammverweilzeit lag. Der Grund dafür könnte der recht hohe Anteil an Actinobakterien (HGC69a) sein. Diese Bakterien bilden

verschiedene organische Säuren, aber kein Propionat. Die Ethanolkonzentration lag mit 460 - 600 mg/l etwas höher als in den 10 °C-Reaktoren und deutlich höher als in den 38 °C-Reaktoren. 2-Butanol zeigte mit 830 - 900 mg/l die höchsten Werte.

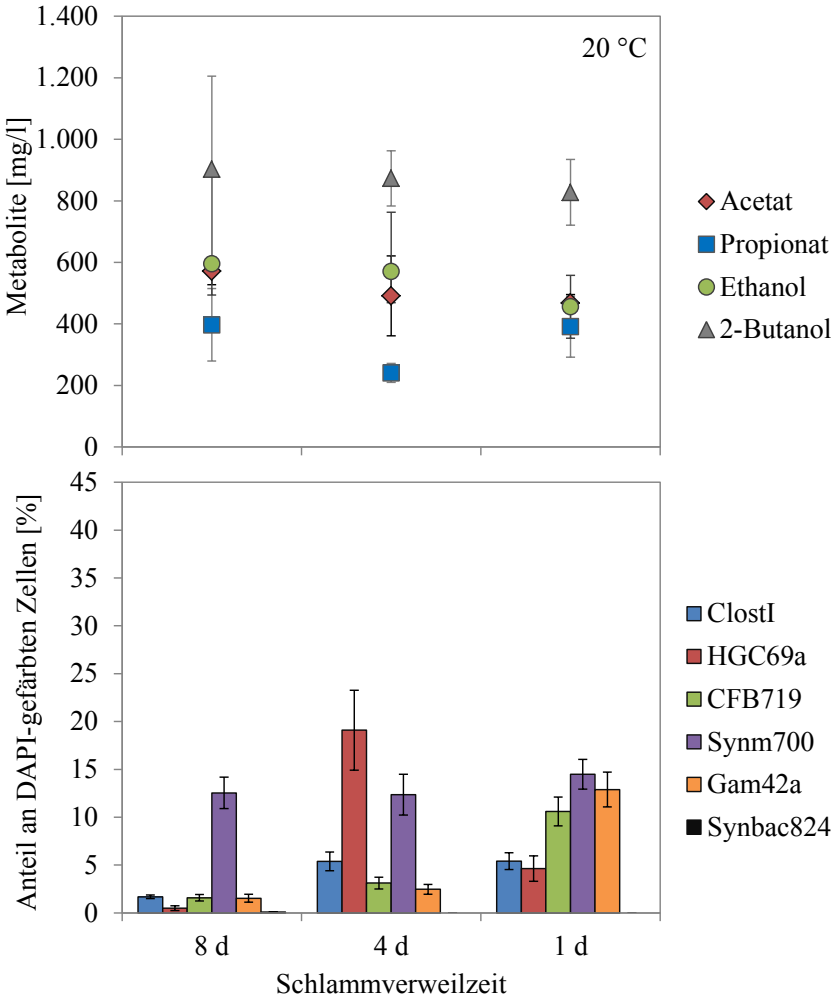

Abbildung 6-2: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 20 °C-Reaktoren

Die Reaktorpopulationen in den 38 °C-Reaktoren unterschieden sich sehr zu denen in den anderen Reaktoren. Bei 8 d Schlammverweilzeit dominierten bei den markierten Zellen Vertreter des Phylums *Bacteroidetes* und der Familie *Syntrophomondaceae*. Zudem konnten bei 8 d Schlammverweilzeit noch etwa 4 - 5 % methanogene *Archaea* in den Reaktoren nachgewiesen werden. Dies beschrieben auch Miron et al. (1999) bei der Vergärung von Primärschlamm in einem volldurchmischten Rührkesselreaktor (CSTR) bei 25 °C. Sie sprachen von methanogenen Bedingungen im Reaktor bei SRT > 8 d und von acidogenen Bedingungen bei SRT ≤ 8 d.

Bei 4 d Schlammverweilzeit stieg zusätzlich der Anteil an ClostI-markierten Zellen. Schließlich bildeten bei 1 d Schlammverweilzeit Vertreter der Ordnung *Clostridiales* (ClostI,

Synm700) um die 70 % der Reaktorpopulation. Ähnlich hohe Anteile an Clostridien konnten auch in anderen acidogenen, mesophilen Reaktoren beim Abbau verschiedener Abwässer (synthetisch mit Glucose, Molkerei, Klärschlamm) identifiziert werden (Liu et al, 2001, Cheng et al, 2008, Kim et al, 2011).

Von den verschiedenen Alkoholen konnte nur Ethanol in nennenswerter Konzentration gemessen werden. Für die Schlammverweilzeiten von 8 d und 4 d lag diese im Mittel bei 350 - 420 mg/l, bei 1 d Schlammverweilzeit waren es nur noch 90 mg/l. Die niedrigen Konzentrationen der anderen, gemessenen Alkohole (2-Butanol, iso-Propanol, tert-Butanol und Propanol, siehe Abbildung 5-9) in den 38 °C-Reaktoren hängen vermutlich mit dem hohen Anteil an *Syntrophomonadaceae* sowie den noch vorhandenen methanogenen *Archaea* (bei SRT = 8 d) zusammen. Die Familie der *Syntrophomonadaceae* gehört zur Ordnung *Clostridiales* und die Vertreter dieser Gruppe bauen Butyrat unter Bildung von Wasserstoff zu Acetat ab. Sie müssen daher in einer engen, syntrophen Gemeinschaft mit Wasserstoff-verwertenden Bakterien (z.B. *Ruminococcus hydrogenotrophicus,* verschiedene Eubakterien oder Acetobakterien) oder methanogenen *Archaea* leben. (Talbot et al., 2008; Wenzel, 2002) Bei einem niedrigen Wasserstoffgehalt werden aber kaum Alkohole gebildet.

Für die Bildung der verschiedenen Alkohole in den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren könnten *Clostridium acetibutylicum* und *Clostridium butyricum* verantwortlich sein. Als Gärprodukte aus dem Glucoseabbau treten bei diesen zwei Bakterien Butyrat, Acetat, Butanol, Ethanol, Aceton, 2-Propanol sowie Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff auf. Die Ausbeute an den einzelnen Gärprodukten variiert abhängig von den Bedingungen. (Schlegel, 1992)

Die Acetatkonzentration lag in den 38°C-Reaktoren bei 8 d Schlammverweilzeit nur bei 510 mg/l und stieg bei 4 d bis auf 770 mg/l, um dann bei 1 d Schlammverweilzeit wieder auf 670 mg/l zu sinken. Die Propionatkonzentration sank mit kürzer werdender Schlammverweilzeit von fast 900 mg/l bis auf 410 mg/l. Die hohe Propionatkonzentration bei 8 d Schlammverweilzeit ging einher mit einer niedrigen Acetatkonzentration. Die noch vorhandenen methanogenen *Archaea* haben noch ein Teil des Acetats abgebaut. Daher ist die Konzentration vergleichsweise gering. Durch die jedoch geringe Anzahl sowohl an acetogenen Bakterien (u.a. *Syntrophobacter* (Synbac824)) als auch methanogenen *Archaea* sowie die erhöhte Konzentration an organischen Säuren waren die acetogenen Bakterien nicht mehr in der Lage Propionat abzubauen. Die, gegenüber den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren, doppelt so hohe Propionatkonzentration spricht dafür, dass zudem Propionat-bildende Bakterien, wie beispielsweise *Clostridium propionicum* und *Megasphaera elsdenii* aktiv waren. Diese bauen Lactat zu Propionat ab. Vertreter des Phylums *Bacteroidetes* bilden als Hauptprodukte Acetat und Propionat sowie Succinat, Formiat und Lactat. Als Nebenprodukte entstehen ausserdem Butyrat, Isobutyrat und Isovalerat. (Wenzel, 2002)

Eine mögliche Ursache für die höhere Acetatkonzentration bei den 10 °C- und 38 °C-Reaktoren gegenüber den 20 °C-Reaktoren, könnte der größere Anteil an Clostridien (ClostI) sein. Bei diesen Reaktoren konnten mehr Zellen mit der Sonde ClostI markiert werden als bei den 20 °C-Reaktoren. Vertreter der Gattung *Clostridium* sind anaerobe, Gram-positive Stäb-

chen, die von verschiedenen Kohlenhydraten bis zu Aminosäuren alles umsetzen. Gebildet werden dabei von den meisten Butyrat, Acetat, Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff, aber auch Butanol, Ethanol und 2-Propanol. Mit der Sonde ClostI wurden die Clostridien Cluster I + II abgedeckt. Wichtige Vertreter dieser zwei Cluster sind: *C. acetobutylicum, C. butyricum, C. thermobutyricum, C. perfringens, C. kluyveri,* und *C. proteolyticum*. Bei den 38 °C-Reaktoren spielt eventuell auch der recht große Anteil an *Syntrophomonadaceae* eine Rolle. In den 20 °C-Reaktoren konnten dafür mehr *Gammaproteobacteria* nachgewiesen werden. Die Vertreter dieser Klasse sind vor allem Darmbewohner (*Enterobacteriales*), die Zucker über die 2,3-Butandiolgärung abbauen. Dabei entstehen weniger organische Säuren, aber dafür mehr Kohlenstoffdioxid, 2,3-Butandiol und Ethanol (Schlegel, 1992).

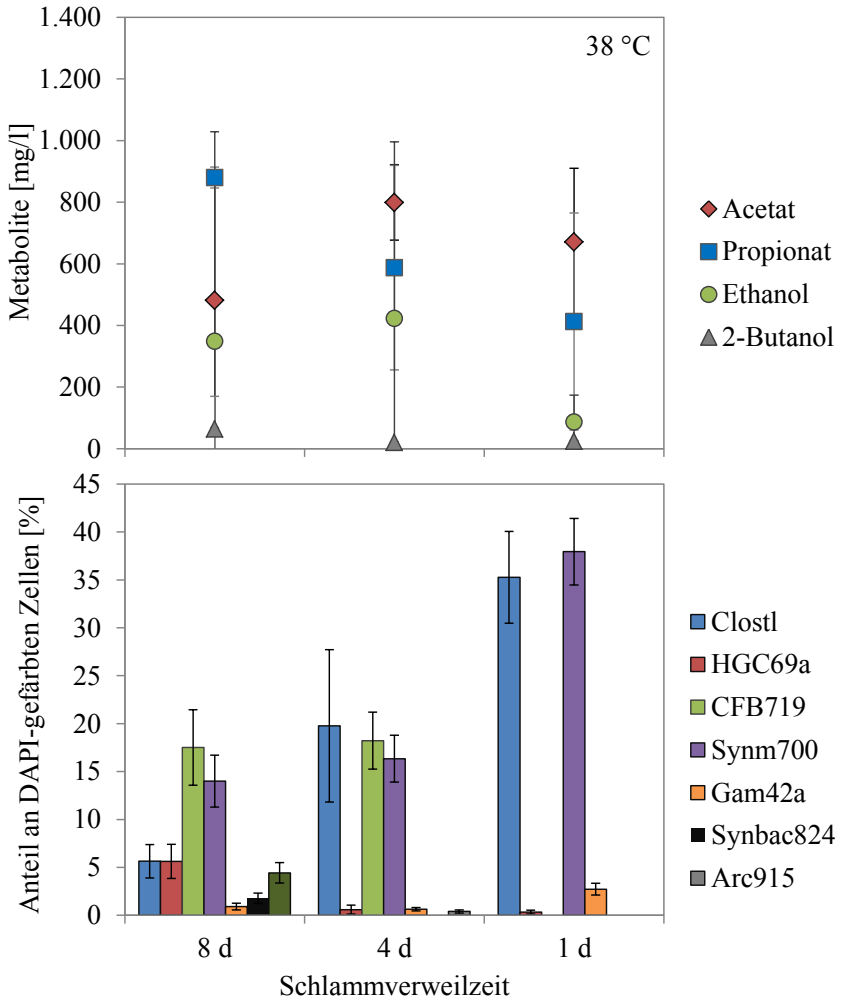

Abbildung 6-3: Zusammenhang zwischen Populationszusammensetzung (FISH-Daten) und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die 38 °C-Reaktoren

Während in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Gesamtkonzentration von organischen Säuren in Abhängigkeit von der Temperatur festgestellt werden konnten, fanden

Maharaj und Elefsiniotis (2001) eine Temperaturabhängigkeit bei ihren Versuchen. Sie untersuchten die Versäuerung von Primärschlamm und stärkereichen Industrieabwasser mit einem CSB_{Zulauf} von 5.000 mg/l und einer Schlammverweilzeit von 10 d für verschiedene hydraulische Verweilzeiten (18 - 60 h) und Temperaturen (8 - 25 °C). Sie fanden die höchste Nettokonzentration an organischen Säuren (ca. 780 mg/l für Primär-/ Industrieschlamm und circa 510 mg/l für Primärschlamm allein) bei einer hydraulischen Verweilzeit von 30 h und einer Temperatur von 25 °C, wobei die Hydrolyse der limitierende Abbauschritt zu sein schien. Sowohl niedrigere als auch höhere Temperaturen führten zu einer niedrigeren Konzentration an organischen Säuren. Es erfolgte aber weder eine detaillierte Betrachtung der einzelnen organischen Säuren noch eine Untersuchung der Reaktorbiozönose.

Fang et al. (2001) haben die Versäuerung von synthetischem Abwasser, mit Lactose als Kohlenstoffquelle, bei unterschiedlichen hydraulischen Verweilzeiten (2 - 24 h), Lactosekonzentrationen (2 - 30 g CSB/l), pH-Werten (4,0 - 6,5) und Temperaturen (20 - 60 °C) in einem UASB-Reaktor untersucht. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass allgemein mehr organische Säuren bei niedrigeren Lactosekonzentrationen und höheren pH-Werten (6,0 - 6,5) gebildet werden, die Bildung aber unabhängig von der hydraulischen Verweilzeit und der Temperatur ist. Die Konzentration einzelner organischer Säuren und Alkohole hingegen ist temperaturabhängig. So zeigte sich die größte Acetatkonzentration bei 20 °C (4 g CSB/l, pH 5,5). Höhere Temperaturen führten zu niedrigeren Konzentrationen. Die Ethanolkonzentration hingegen stieg mit der Temperatur an. Acetat, Propionat und Ethanol waren unter fast allen Bedingungen die dominierenden Produkte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit.

Den Einfluss der Schlammverweilzeit auf die Hydrolyse und Acidogenese von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen untersuchten Miron et al. (2000). Dazu beschickten sie einen CSTR-Reaktor mit Primärschlamm bei einer Temperatur von 25 °C und stellten Schlammverweilzeiten von 15, 10, 8, 5 und 3 d ein. Sie fanden die höchsten Konzentrationen an organischen Säuren bei 8 d, 5 d und 3 d. Bei längeren Schlammverweilzeiten (> 8 d) herrschten statt acidogenen methanogene Bedingungen vor. Eine aussagekräftige Bestimmung zu den organischen Säuren ist unter diesen Voraussetzungen nicht möglich, da diese sofort weiter zu Methan umgesetzt werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Sans und Mata-Alvarez (1993) bei der mesophilen Vergärung (37 °C) von ländlichem, organischem Abfall. Sie fanden bei einer Schlammverweilzeit von 6 d eine höhere Konzentration an organischen Säuren als bei 2 d.

In der vorliegenden Arbeit konnten bis 4 d Schlammverweilzeit relativ konstante Konzentrationen an organischen Säuren gemessen werden. Erst bei 2 d und 1 d Schlammverweilzeit sank die Konzentration bei den 10 °C- und 38 °C-Reaktoren etwas ab.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Populationszusammensetzung sich bei den verschiedenen Schlammverweilzeiten umso stärker ändert, je höher die Betriebstemperatur des Reaktors ist. Bei allen drei Temperaturen sind unterschiedliche Gruppen an Bakterien

dominant. Der Anteil einzelner Gruppen fällt oder steigt nicht generell mit sinkender Schlammverweilzeit, sondern dies ist abhängig von der Betriebstemperatur.

Acetat und Propionat wiesen bei 10 °C und 38 °C die höchsten Konzentrationen auf, bei 20 °C war es 2-Butanol. Auffällig sind zudem die niedrigen Konzentrationen an Ethanol und 2-Butanol bei 38 °C gegenüber 10 °C und 20 °C Betriebstemperatur.

6.1.2 Zusammenhang zwischen dem Produktspektrum und den Ergebnissen der Metaproteomanalyse

Mit der Metaproteomanalyse lassen sich Proteine identifizieren und Mikroorganismen zuordnen. Über die verschiedenen Funktionen der Proteine können Rückschlüsse auf ablaufende (metabolische) Stoffwechselwege gezogen werden. Je besser diese und die daran beteiligten Mikroorganismen bekannt sind, desto besser lässt sich der Gesamtprozess beeinflussen und steuern.

Abbildung 6-4 zeigt die bedeutendsten organischen Säuren und Alkohole sowie die Populationszusammensetzung auf der Grundlage der mit ESI identifizierten Proteine für die Reaktoren unterschiedlicher Temperatur bei 8 d Schlammverweilzeit.

Bei allen drei Temperaturen dominierten Vertreter der Klasse *Actinobacteria*. Der hohe Anteil an *Actinobacteria* bzw. deren hohe Aktivität spiegelt sich in den niedrigen Gaswerten (siehe Abbildung 4-3, 0 - 10 Nml/d) wieder. Zusammen mit den Clostridien sind sie für den hohen Anteil an organischen Säuren und Alkoholen verantwortlich.

Während bei 10 °C und 20 °C alle Proteinhits der Ordnung *Actinomycetales* zugordnet werden konnten, fanden sich bei dem 38 °C-Reaktor auch einige der Ordnung *Bifidobacteriales*, die Glucose zu Acetat und Lactat abbauen. Im 10 °C- und 20 °C-Reaktor konnten viele Proteinhits Vertretern der Gattung *Actinomyces sp*. zugeordnet werden. Diese Bakterien sind überwiegend strikt anaerob und bilden gerade oder gekrümmte Stäbchen. Sie bilden unter anderem Acetat, Formiat, Lactat und Succinat, aber kein Propionat (Sykes und Skinner, 1973). Zudem fanden sich im 10 °C-Reaktor viele Proteinhits für *Propionibacterium sp.*. Diese vergären unter anaeroben Bedingungen Glucose und andere Zucker sowie Lactose, Malat und Glycerin zu Propionat (Schlegel, 1992). Sehr viele verschiedene Spezies für die Klasse der *Actinobacteria* hingegen wurden im 38 °C-Reaktor identifiziert.

Die *Clostridia* bilden bei allen drei Temperaturen die zweitgrößte Gruppe. Viele Vertreter dieser Klasse bilden als ein Hauptprodukt Acetat. Wie in Abbildung 6-4 zu erkennen, findet sich die höchste Acetatkonzentration im 10 °C-Reaktor, wo der Anteil an *Clostridia* am größten ist. Es fanden sich in diesem Reaktor doppelt so viele Proteinhits für Vertreter der *Clostridia* wie im 20 °C-Reaktor. Es dominierten dabei Vertreter der zwei Gattungen *Clostridium sp.* und *Oscillibacter sp.*. Der überwiegende Teil von der *Clostridia* bildet neben Acetat stets Butyrat, einige auch Lactat oder Propionat. (Schlegel, 1992) *Oscillibacter valericigenes* (Ord-

nung: *Clostridiales*) hingegen bildet Valeriat als Hauptprodukt aus dem Abbau von Glucose (Iino et al., 2007).

Neben der hohen Anzahl an Proteinhits von *Clostridia* konnte beim 10 °C-Reaktor auch ein Enzym identifiziert werden, dessen Aktivität die höhere Acetatkonzentration gegenüber dem 20 °C-Reaktor erklären könnte. Das Enzym Acetatkinase ist an der Acetatbildung aus Acetyl-CoA beteiligt und konnte hier Vertretern der *Acinomycetales* zugeordnet werden.

Die niedrigere Acetatkonzentration im 38 °C-Reaktor hängt mit den noch vorkommenden methanogenen *Archaea* (Proteinhits: 10 %) zusammen, die das Acetat sofort zu Methan und Kohlenstoffdioxid umsetzen. Dies deckt sich mit den FISH-Ergebnissen und den lichtmikroskopischen Untersuchungen. Die meisten Proteinhits konnten *Methanosarcina sp.* und der Methanbildung aus Acetat zugeordnet werden.

Die drittgrößte Gruppe bei den 10 °C- und auch 38 °C-Reaktoren bildeten die *Bacilli* (je 13 %). Dabei konnten bei 10 °C dreimal so viele Proteinhits der Ordnung *Lactobacillales* wie der Ordnung *Bacillales* zugeordnet werden. Bei 38 °C war dies genau andersherum. Die *Lactobacillales* sind Milchsäurebakterien und bilden aus Glucose Lactat und Acetat (Schlegel, 1992). Während die *Lactobacillales* ein eher sauren pH-Wert (pH 5 bis 6) bevorzugen, wachsen die *Bacillales* eher im neutralen bis alkalischen Bereich, wie dies in den 38 °C-Reaktoren bei SRT = 8 d der Fall war. Bei den *Bacillales* im 38 °C-Reaktor wurden Proteinhits vieler verschiedener Spezies gefunden. Viele Vertreter bilden organische Säuren und Ethanol (z.B. *Listeria welshimeri*, *B. licheniformis*). (Schlegel, 1992, Gilot und Content, 2002,Yan et al., 2013)

Bei 38 °C wurden 4 % der Proteinhits der Klasse *Synergistetes* zugeordnet, die weder bei 10 °C noch bei 20 °C vorkamen. Sie bilden Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, der in größerer Konzentration inhibierend auf sie wirkt. Die *Synergistetes* leben daher meist in enger Verbindung mit den methanogenen *Archaea* oder Sulfat-reduzierenden Bakterien. Mehrere Hits fanden sich für *Aminobacterium colombiense* und *Anaerobaculum mobile*. Diese bilden beide unter anderem Acetat und Wasserstoff. *A. colombiense* verwertet bevorzugt Aminosäuren während *A. mobile* organische Säuren (z.B. Malat, Pyruvat und Fumarat) und einige Kohlenhydrate (Stärke, Glucose, Fruktose und Gluconat) umsetzt. (Baena et al., 1998, Menes und Muxi, 2002)

Die drittgrößte Gruppe im 20 °C-Reaktor bildeten Proteinhits für Vertreter der Klasse *Negativicutes* (15 %), die wiederum der Ordnung *Selenomonadales* zugeordnet werden konnten. Diese Bakterien sind gram-negativ und obligat anaerob. Die Proteinhits konnten hier vor allem den Gattungen *Megasphaera sp.* und *Acidaminococcus sp.* zugeordnet werden. Diese nutzen Aminosäuren als Energiequelle oder bilden aus Lactat Propionat, Acetat und CO_2 (Gottschalk, 1986).

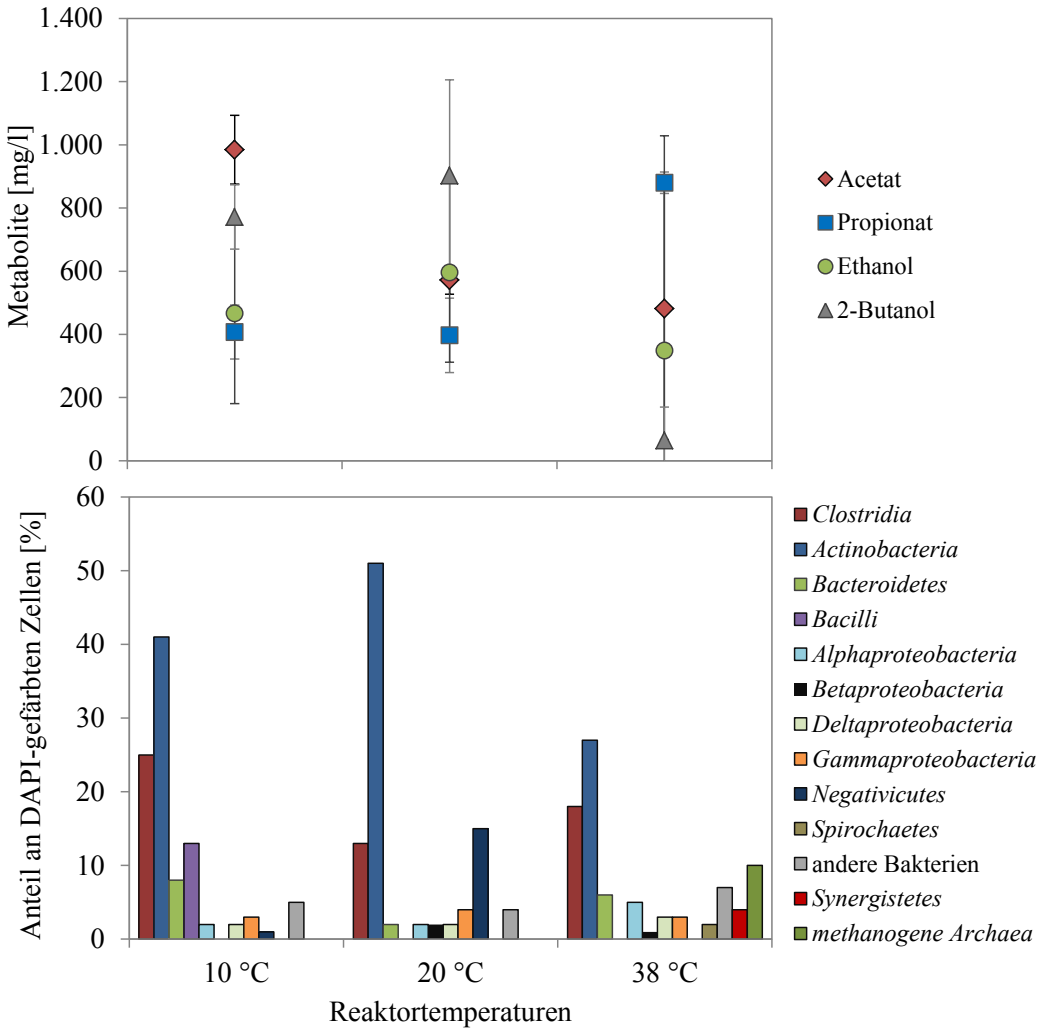

Abbildung 6-4: Zusammenhang zwischen den Metaproteomdaten und verschiedenen Gärprodukten (Acetat, Propionat, Ethanol, 2-Butanol) für die Reaktoren R4 (10 °C), R1 (20 °C) und R9 (38 °C) mit SRT = 8 d

Bei den Metaproteomdaten konnten für die 10 °C- und 20 °C-Reaktoren mehrere Enzyme verschiedener metabolischer Stoffwechselwege identifiziert werden. Neben Enzymen der Glykolyse war dies vor allem die Glutamat-Dehydrogenase, die beim Aminosäureabbau aktiv ist. Am Ende dieses Stoffwechselweges werden Acetat und Butyrat freigesetzt. (Gottschalk, 1986) Ein weiteres Enzym, das bei beiden Temperaturen für verschiedene phylogenetische Gruppen zu finden war, ist die Acyl-CoA-Dehydrogenase. Diese ist am ersten Schritt der ß-Oxidation von längerkettigen, organischen Säuren beteiligt an deren Ende die Acetatbildung steht. (Schlegel, 1992) Es konnten weitere Enzyme identifiziert werden, die am Abbau verschiedener Aminosäuren oder Kohlenhydrate beteiligt sind. Bei diesen Stoffwechselwegen entstehen verschiedene organische Säuren (Essig-, Propion-, iso-Butter-, 2-Methylbuttersäure und Milchsäure) und einige Alkohole (Ethanol, Butanol). So ist die Lactat-Dehydrogenase sowohl bei den *Lactobacillales* als auch *Actinomycetales* an der Lactatbildung beteiligt.

Oxalacetat wird durch das Enzym Malat-Dehydrogenase zu Succinat umgesetzt. Sie ist sowohl im Succinat-Propionat-Weg beim Abbau von Lactat als auch bei der Lactatbildung aus Glucose beteiligt. Neben Lactat entstehen auch andere Produkte wie verschiedene, organische Säuren (Succinat, Formiat, Acetat) sowie Ethanol und 2,3-Butandiol. (Gottschalk, 1986)

Besonders auffällig bei dem 20 °C-Reaktor waren die fünf Proteinhits für die Enzyme 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und -Dehydrogenase. Diese sind bei der Butyrat- und Butanolbildung beteiligt und geben einen Hinweis auf die hohen 2-Butanol-Konzentrationen. Vier der Hits konnten *Megasphaera elsdenii* (Klasse: *Negativicutes*, Ordnung: *Selenomonadales*) und einer *C. acetobutylicum* zugeordnet werden.

Bei der 38 °C-Reaktorprobe konnten, wie schon bei 10 °C und 20 °C, vorwiegend Enzyme der Glykolyse (Enolase und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) sowie das Enzym Acyl-CoA-Dehydrogenase (ß-Oxidation) für verschiedene taxonomische Ordnungen identifiziert werden. Anhand der ESI-Daten konnten keine Enzyme identifiziert werden, die auf eine erhöhte Propionatbildung gegenüber den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren hinwiesen. Auffällig waren aber mehrere Hits für *Desulfovibrio sp.*, die ausschließlich Chaperonen und damit einer Reaktion auf Stress zugeordnet werden konnten. Dies könnte auf eine Störung beim Propionatabbau durch dieses acetogene Bakterium hinweisen und die erhöhte Propionatkonzentration gegenüber den anderen Reaktoren erklären.

Die Arbeitsgruppe um Vincent O'Flaherty (Abram et al, 2011) hat die Gesamtpopulation in einem anaeroben Bioreaktor untersucht, der bei 15 °C mit synthetischem, Glucose-haltigem Abwasser beschickt wurde. Die Ergebnisse der Metaproteomanalyse zeigten, neben verschiedenen Proteinhits für methanogene *Archaea*, ausschließlich Enzyme der Glykolyse. Enolase trat dabei mehrfach auf, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase nur einmal. Nur einer dieser Hits konnte *Propionibacterium freudenreichii* zugeordnet werden. Für dieses Bakterium fanden sich in der vorliegenden Arbeit vor allem in der 10 °C-Reaktorprobe mehrere Proteinhits. Die anderen Bakterienspezies ließen sich hier nicht nachweisen.

Eine ähnliche Zusammensetzung, wie in dem 38 °C-Reaktor, basierend auf Proteomdaten fanden auch Heyer et al. (2013) in landwirtschaftlichen, mesophilen Anlagen. In diesen konnten die meisten Proteinhits bei den methanogenen *Archaea* auch den *Methanosarcina sp.* zugeordnet werden.

Es wurde keine Veröffentlichung zur Metaproteomanalyse gefunden, die ausschließlich die Bakterien in einem Versäuerungsreaktor untersucht.

Die Ergebnisse für die drei Betriebstemperaturen und einer Schlammverweilzeit von 8 d zeigen, dass je nach Betriebstemperatur unterschiedliche Produkte dominieren. Es zeigt sich, dass für den Betrieb der ersten Stufe einer zweistufigen anaeroben Anlage zur Methangewinnung die 10 °C Betriebstemperatur geeignet wären. Hier liegt die Acetatkonzentration am höchsten. Acetat kann direkt von den methanogenen *Archaea* zu Methan umgesetzt werden. Eine vorherige Umwandlung durch andere Bakterien ist nicht notwendig. Dies beschleunigt den Prozess der Methangewinnung.

6.2 Vergleich der FISH-Ergebnisse mit den Metaproteom-Ergebnissen

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und die Metaproteomanalyse sind zwei sehr verschiedene Methoden um Reaktorbiozönosen zu untersuchen. Mit der FISH-Methode werden die Bakterienzellen direkt markiert und visualisiert. Es können dabei einzelne Bakteriengruppen (Phyla, Ordnungen, Klassen) semi-quantitativ, bezogen auf die gesamtgefärbte (DAPI) oder -markierte (EUB338) Population, bestimmt werden. Da die Sonden an die Bakterien-rRNA binden, werden ausschließlich aktive Zellen, d.h. Zellen mit viel rRNA erfasst. Anders als bei den meisten anderen Methoden, wo die Daten über Datenbanken abgeglichen werden, wird bei der FISH-Methode gezielt nach bestimmten Mikroorganismen gesucht und die entsprechenden Oligosonden eingesetzt. Bisher existieren diese aber nur in begrenztem Umfang, so dass für viele Bakterien noch kein Nachweis möglich ist oder gegebenenfalls eine aufwendige Gensondenentwicklung durchgeführt werden muss.

Mit der Metaproteomanalyse werden Proteine identifiziert, wobei diese gleichzeitig einer taxonomischen Klasse oder Spezies zugeordnet werden. Eine Quantifizierung der Mikroorganismen ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Anzahl der Proteinhits einzelner Bakteriengattungen oder -spezies kann aber Aussagen über deren Aktivität und so in gewissen Grenzen auch über deren Anteil an der Gesamtpopulation liefern. Viele der Enzyme und anderen Proteine (ribosomale, Stressproteine) sind meist nur vorhanden, wenn diese auch gebraucht werden und die Bakterienzellen aktiv sind. Beide Methoden erfassen somit die aktiven Mikroorganismen.

Der Vergleich der Ergebnisse für die drei Reaktoren R4 (10 °C), R1 (20 °C) und R8 (38 °C) bei 8 d Schlammverweilzeit hat gezeigt, dass alle mit den Oligosonden markierten Bakterienphyla und -klassen auch bei den identifizierten Proteinen gefundenen wurden (siehe Tabelle 6-1). Umgekehrt konnten aber über die Proteinhits noch andere Bakterien, wie beispielsweise Vertreter von *Bacillales* und *Lactobacillales*, identifiziert werden.

Bei den Ergebnissen der FISH-Analyse bilden Vertreter der Ordnung *Clostridiales* (Klasse *Clostridia* (ClostI), Familie *Syntrophomonadaceae* (Synm700)) die größte Gruppe in allen Reaktoren unabhängig von der Temperatur. Den größten Anteil bilden sie im 10 °C-Reaktor (R4) mit 24,7 ± 1,2 %, gefolgt vom 38 °C-Reaktor (R9) mit 19,7 ± 2,2 %. Dabei dominierten in R4 (10 °C) Vertreter der Klasse *Clostridia* und in den Reaktoren R1 (20 °C) und R9 (38 °C) Vertreter der Familie *Syntrophomonadaceae* (Wasserstoff-produzierende Bakterien) mit 12,5 ± 1,6 % und 14,0 ± 2,7 %. Mit der Gensonde konnte ein großer Anteil an Zellen markiert werden, aber es wurden keine Proteinhits gefunden. Dies könnte für eine sehr geringe Aktivität sprechen, trotz vorhandener RNA in den Zellen, an die die Gensonde gebunden hat. Andere Ursachen könnten eine Fehlbindung der Sonde sein oder fehlende Gensequenzen in den Datenbanken zur Proteinidentifizierung. Ebenfalls ein acetogenes Bakterium ist *Desulfuvibrio sp.* (Klasse: *Deltaproteobacteria*), für das mehrere Proteinhits identifiziert wurden.

Vertreter des Phylums *Actinobacteria* (HGC69a) bilden nur bei 10 °C die zweitgrößte Gruppe mit einem Anteil von 12,2 ± 3,1 %. Bei den 38 °C kommen sie an dritter Stelle (5,6 ± 1,8 %)

nach den Vertretern des Phylums *Bacteroidetes* (CFB719) mit 17,5 ± 3,9 %. Im 20 °C-Reaktor (R1) liegt der Anteil bei < 1 %.

Tabelle 6-1: Vergleich der FISH-Daten mit den Ergebnissen der Metaproteomanalyse für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C mit einer SRT = 8 d

		10 °C, 8 d (R4)		20 °C, 8 d (R1)		38 °C, 8 d (R9)	
		FISH	Meta-proteom	FISH	Meta-proteom	FISH	Meta-proteom
Clostridia (ClostI, Synm700)	%	24,7 ± 1,2	25	14,2 ± 0,92	13	19,7 ± 2,2	18
Actinobacteria (HGC69a)	%	12,2 ± 3,1	41	0,5 ± 0,25	51	5,6 ± 1,8	27
Bacteroidetes (CFB719)	%	6,1 ± 1,2	8	1,6 ± 0,34	2	17,5 ± 3,9	6
Gammaproteobacteria (Gam42a)	%	1,7 ± 0,2	3	1,5 ± 0,42	4	0,9 ± 0,3	3
methanogene Archaea (Arc915)	%	0,0	0	0,0	0	4,43 ± 1,06	10

Vergleicht man diese FISH-Daten mit den Metaproteomdaten, so ergibt sich für die meisten Bakteriengruppen eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse (siehe Tabelle 6-1). Eine Ausnahme stellen die *Actinobacteria* dar. Diese bilden bei den Metaproteomdaten die größte Bakteriengruppe mit 27 - 51 %. Die FISH-Daten zeigen nur einen Anteil von etwa 0,5 - 12 %.

Eine Ursache kann in der unterschiedlichen Messweise der Methoden liegen. Während mit der FISH die einzelnen Bakterienzellen gemessen werden, werden bei der Metaproteom-analyse einzelne Proteine bestimmt. Diese liegen in größerer Anzahl in den jeweiligen Bakterienzellen vor, abhängig von der Aktivität der einzelnen Zelle. Bei hoher Aktivität werden also mehr Proteine bestimmt und der Anteil steigt. Tyers und Mann (2003) berichten, dass in aktiven Zellen sich das Protein-Expressionslevel um bis zu 10^6 unterscheiden kann. Zudem korrelieren die mRNA- und die Protein-Expression nicht immer direkt miteinander, da letztere eine Reflexion von spezifischen mikrobiellen Aktivitäten in einem bestimmten Ökosystem darstellt (Pradet-Balade et al., 2001).

Eine weitere Ursache für die niedrigeren Anteile bei den FISH-Daten könnte in einer ungenauen Bildauswertung durch Einsatz des grünen Farbstoffes 6-FAM bei dieser Sonde sein. Die Autofluoreszenz der Zellen liegt ebenfalls im grünen Bereich und wurde für alle Aufnahmen rausgerechnet. Zellen an die eventuell nur wenig Farbstoff gebunden wurde könnten dabei aus der Bildauswertung rausgefallen sein.

Insgesamt konnten mit den eingesetzten FISH-Sonden nur 33 - 56% an DAPI-gefärbten Zellen einem bestimmten Phylum, einer Klasse oder Familie zugeordnet werden. Eine Ursache dafür liegt in den Gensonden. Diese decken meist nicht das gesamte Phylum oder die gesamte Klasse ab. Die Phyla oder Klassen sind zum Teil so inhomogen, dass nicht alle Vertreter über

nur eine Gensonde markiert werden können. So konnten mit den zwei Sonden für Clostridien nur Vertreter der Untergruppe *Clostridia* Cluster I+II (ClostI) sowie die mesophilen Mitglieder der Familie *Syntrophomonadaceae* (Synm700) abgedeckt werden. Clostridien, die nicht in diese zwei Gruppen gehören, konnten über die FISH nicht identifiziert werden. So zum Beispiel *Oscillibacter valericigenes*, welches nach Iino et al. (2007) in das *Clostridia* Cluster IV gehört und so nicht mit den eingesetzten Gensonden erfasst werden konnte. Dieser Spezies konnten bei 10 °C und 20 °C mehrere Proteinhits zugeordnet werden. Das gleiche trifft auch auf *Megasphaera elsdenii* zu, welches nach Collins et al. (1994) in das *Clostridia* Cluster IX eingeordnet wird. Mit der Sonde CFB719 lassen sich die meisten Mitglieder der Klasse *Bacteroidetes* sowie einige *Flavobacteria* markieren (probeBase). Für viele Bakterien existieren noch gar keine passenden Sonden.

Ein Vergleich der FISH-Ergebnisse mit den Spot-Analysen (MALDI-TOF/TOF) ist mit den ausgewählten Spots nur begrenzt möglich, da letztere nur eine kleine Auswahl an Proteinen und somit Mikroorganismen darstellen. Einige Zusammenhänge bzw. Gemeinsamkeiten lassen sich trotzdem erkennen. So konnten bei dem Vergleich der 10 °C-Reaktoren untereinander für die Schlammverweilzeiten von 4 d und 1 d vor allem Proteinhits von Vertretern der Ordnung *Lactobacillales* (*Lactococcus raffinolactis*) und *Actinomycetales* (*Propionibacterium freudenreichii*) gefunden werden. Für die Schlammverweilzeit von 8 d hingegen konnten die Hits vor allem den Ordnungen *Clostridiales* und *Bacteroidales* sowie einigen anderen zugeordnet werden. Die FISH-Ergebnisse zeigen eine leichte Abnahme bei den Clostridien aus Cluster I+II (ClostI) und *Bacteroidetes* (CFB719) von 8 d hin zu 1 d Schlammverweilzeit. Die Ergebnisse beider Methoden scheinen also auf eine Abnahme der Aktivität oder der Zellen oder beides hinzuweisen.

Die Spot-Analysen für die 20 °C-Reaktoren ergaben überwiegend Zuordnungen zu Vertretern der Gattung *Actinomyces*, aber auch einige zu *Clostridium sp.*. Es konnte mit abnehmender Schlammverweilzeit eine Zunahme des Enzyms 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, das im Butyratmetabolismus der Clostridien aktiv ist, festgestellt werden. Die Spots, hinter denen sich dieses Enzym verbarg, waren bei 4 d und 1 d Schlammverweilzeit etwas größer (bis zu 10fach) als bei 8 d Schlammverweilzeit. Bei der FISH-Analyse ergab die Hybridisierung mit der Sonde ClostI ebenfalls einen leichten Anstieg an Zellen für die Schlammverweilzeiten von 4 d und 1 d. Sehr unterschiedlich waren die Ergebnisse für die Vertreter der Ordnung *Actinomycetales*. Während laut den FISH-Ergebnissen nur etwa 1 % der Zellen mit der HGC69a-Sonde markiert wurden, konnten nahezu alle Proteinspots des 8 d Schlammverweilzeit-Gels ausschließlich Vertretern dieser Ordnung zugeordnet werden.

Mögliche Erklärungen für den geringen Wert mit FISH wären eine zu geringe Abdeckung der Sonde, eine nicht optimale Bindung der HGC69a-Sonde an die Zellen oder eine nicht exakte Bildauswertung, aufgrund des grünen Fluoreszenzfarbstoffs der Sonde. Diese Problematik wurde bereits weiter oben diskutiert. Wie schon beschrieben, bilden die Spots aber nur eine kleine Auswahl, so dass auch darin die Ursache für die Unterschiede in den Ergebnissen der zwei Methoden liegen kann.

Wie bei den ESI-Ergebnissen konnten auch bei den MALDI-Messungen keine Proteinhits für Vertreter von *Syntrophomonas sp.* identifiziert werden, obwohl Zellen (5 - 15 % an DAPI markierten Zellen) mittels der spezifischen Sonde Synm700 markiert wurden.

Veröffentlichungen zu Untersuchungen bei denen beide Methoden (FISH und Metaproteomanalyse) gleichzeitig eingesetzt oder direkt miteinander verglichen wurden, konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Bei Abram et al. (2011) wurde zwischen der phylogenetischen Analyse und den Metaproteomdaten keine gute Übereinstimmung erreicht. Sie schreiben, dass die FISH-Methode wahrscheinlich besser geeignet wäre, da auch hier ausschließlich aktive Mikroorganismen erfasst werden, genau wie bei der Metaproteomanalyse.

6.3 Vergleichbarkeit der ESI-Ergebnisse und MALDI-Ergebnisse

Die Proben der 10 °C- und 20 °C-Reaktoren für 8 d Schlammverweilzeit wurden mit zwei unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden analysiert. Bei der Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) wurden alle über SDS-Gelelektrophorese erhaltenen Proteinbanden einer Probe gemessen. Dabei konnten 542 verschiedene Proteine in den zwei Proben R4 (10 °C) und R1 (20 °C) identifiziert werden. Mit der Massenspektrometrie mit matrixgestützter Laser-Desorption (MALDI) wurden nur einzelne, ausgewählte Proteinspots aus 2D-Gelen analysiert. Aus diesen Spots konnten 72 verschiedene Proteine identifiziert werden. Ein direkter Vergleich der beiden Methoden bezüglich einer besseren Eignung ist nicht möglich, da bei nanoHPLC-ESI-MS/MS alle Proteinbanden und bei MALDI-TOF/TOF nur einzelne Spots analysiert wurden. Insgesamt konnten nur 26 Proteine mit beiden Methoden unabhängig voneinander identifiziert werden. Zudem ionisieren die zwei Methoden Peptide unterschiedlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften. Für eine umfassende Analyse sollten daher beide Methoden parallel eingesetzt werden. (Yang, 2007)

Mit MALDI sind zwar hochauflösendere Messungen möglich, aber es ist nicht für komplexe Proteingemische geeignet. ESI hingegen ist durch die Kopplung an eine nanoHPLC und der damit verbundenen kontinuierlichen Betriebsweise dafür sehr gut geeignet. Durch Kombination konnte nachweislich die Zahl an identifizierten Proteinen in Proben von Biogasanlagen und Belebtschlamm erhöht werden (Heyer, 2011; Kohrs, 2011).

Während die Analyse ganzer Proteinbanden mit ESI einen guten Überblick über die Proteine und phylogenetischen Gruppen im untersuchten System liefern kann, bietet die Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Messung die Möglichkeit der Proteinquantifizierung über die Spotgrößen. Beide Methoden sind begrenzt durch die ungenügenden Metagenom- und Metaproteomdaten in den Datenbanken (Abram et al., 2011; Kohrs, 2011). Eine *de-novo*-Sequenzierung mit anschließender MS-BLAST-Suche kann eine Bestätigung von Grenzlinienhits oder neue Identifizierungen für Spektren bringen, für die keine Proteinsequenz in den Datenbanken zu finden ist (Kuhn et al., 2011).

6.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

In einstufigen Reaktorsystemen müssen Prozessbedingungen eingestellt werden, die für alle Mikroorganismen verträglich sind, aber nicht deren optimalen Lebensbedingungen entsprechen. So können lange Schlammverweilzeiten und ein pH-Wert im neutralen Bereich dazu führen, die Säurebildung durch die acidogenen Bakterien einzuschränken. Die Säuren fehlen dann den methanogenen *Archaea* für die Biogasbildung (Ghosh, 1987). Die Trennung von Hydrolyse/Versäuerung des Substrats (z.B. Abwasser) und anschließender Methanisierungsphase kann zur Stabilisierung des Systems und zu höheren Biogasausbeuten führen (Zhang und Noike, 1991; Guerrero et al., 2009; Maspolim et al., 2015). So dient die Versäuerungsstufe als „metabolischer Puffer“ für die Methanisierungsstufe, wenn sich die Zusammensetzung des Abwassers ändert. Die aciogenen Bakterien bauen zudem einige für acetogene Bakterien und methanogene *Archaea* toxische Substanzen ab, die sich in einem zweistufigen System nicht mehr negativ auf den Gesamtprozess auswirken können. (Zoetemeyer, 1982a) Bei Substraten mit einem hohen Feststoffgehalt bildet die Hydrolyse oft den limitierenden Schritt, so dass ein zweistufiges System empfohlen wird. (Miron et al., 2000; Mohr, 2011) Die wichtigsten Parameter für die Auslegung des Prozesses sind neben der Substratzusammensetzung/-konzentration und der hydraulischen Verweilzeit, die Schlammverweilzeit, der pH-Wert und die Temperatur.

Die gebildeten Säuren werden nicht nur für die Methanisierung gebraucht, sondern auch von den Mikroorganismen, die an der biologischen Stickstoff- und Phosphor-Rückgewinnung beteiligt sind. Dabei werden etwa 6 - 9 mg organische Säuren pro mg zurück gewonnenem Phosphor benötigt. (Banerjee et al., 1999)

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die höchsten Acetatkonzentrationen bei 10 °C Betriebstemperatur mit Schlammverweilzeiten zwischen 12 d und 6 d erreicht werden konnten. Acetat kann direkt von den methanogenen *Archaea* zu Biogas umgesetzt werden. Der Abbau kann also schneller erfolgen als bei den anderen organischen Säuren und Alkoholen. Dieser Bereich für die Schlammverweilzeit deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Arbeiten (Sans und Mata-Alvarez, 1993; Miron et al., 2000). Ein Aufheizen der ersten Stufe (Versäuerungsphase) wäre somit unnötig und Energieverschwendung.

Prinzipiell war eine Versäuerung bei allen untersuchten Betriebstemperaturen möglich und die Konzentrationen der gebildeten, organischen Säuren vergleichbar. Je nach Betriebstemperatur bildeten sich unterschiedliche Mikroorganismenpopulationen in den Reaktoren aus, die wiederum das Spektrum an gebildeten organischen Säuren und Alkoholen beeinflusst haben. In den 10 °C- und 38 °C-Reaktoren war Acetat das Hauptprodukt, gefolgt von Propionat (ausser bei 38 °C mit SRT = 8 d, da war es umgekehrt aufgrund der Populationszusammensetzung mit noch aktiven acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea*) und Ethanol. In den 20 °C-Reaktoren wies 2-Butanol die höchsten Konzentrationen bei Schlammverweilzeiten von 8 d, 4 d und 1 d auf. An der 2-Butanolbildung beteiligte Enzyme konnten für *Megasphaera elsdenii* und *Clostridium acetobotylicum* nachgewiesen werden.

In den 10 °C- und 20 °C- Reaktoren wurde die Methanogenese durch die niedrigen Temperaturen frühzeitiger unterdrückt als bei den 38 °C-Reaktoren. Dadurch könnte sich die Anfahrphase für das zweistufige Reaktorsystem verringern. Die Mikroskopaufnahmen zeigen zudem, dass die methanogenen *Archaea* ausschließlich in den Schlammflocken an den Feststoffpartikeln vorliegen. Die Zufuhr von feststofffreiem Substrat oder mit nur geringem Feststoffgehalt begünstigt das Auswaschen der methanogenen *Archaea* aus dem Reaktorsystem.

Betrachtet man neben den Ergebnissen dieser Arbeit auch die von Miron et al. (2000), die bei 25 °C für SRT > 8 d methanogene Bedingungen vorfanden, so sollten die Schlammverweilzeiten für die Versäuerungsstufe zwischen 8 d und 2 d liegen.

Das pH-Optimum für die Acidogenese ist abhängig von der Charakteristik des Abwassers und den Prozessbedingungen (Fang et al., 2001). Für das synthetische, Glucosebasierte Abwasser in dieser Arbeit haben sich ohne Regelung pH-Werte von 5,2 - 6,5 in den Reaktoren für SRT ≤ 8 d eingestellt. In der Literatur wurde für ähnliche Abwässer, mit konzentrierten Kohlenhydraten als Basissubstanz, wie Glucose (Cohen et al., 1979, Zoetemeyer et al., 1982), Saccharose (Zoetemeyer et al., 1982c) oder Lactose (Fang et al., 2001) ein pH-Wert-Optimum von 5,0 - 6,5 beschrieben. Für die Versäuerung von komplexen Substraten liegt der optimale pH-Wert etwas höher, für Fleischextrakt bei pH 6,8 (Dinopoulou et al., 1988) und für Gelatine bei pH 7,0 (Breure und van Andel, 1984). Bei allen Untersuchungen wurden Essigsäure, Propionsäure und Ethanol als Hauptprodukte der Acidogenese gefunden, neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid.

Generell wird für den Abbau von Proteinen ein pH-Wert im neutralen oder basischen Bereich und für Lipide und Kohlenhydrate im sauren Bereich empfohlen (Breure und van Andel, 1984, Miron et al, 2000, ATV-Berichte, 1994).

Der Einfluss der hydraulischen Verweilzeit (HRT) und der Raumbelastung auf die Acidogenese werden sehr unterschiedlich angegeben. Bei der Versäuerung von komplexen Substraten wie Klärschlamm (Henry et al., 1987), Primärschlamm (Elefsiniotis und Oldham, 1994) und Molkereiabwasser (Yu und Fang, 2000) wird das Produktspektrum sehr stark durch die HRT beeinflusst. Bei leicht abbaubaren Substraten, wie Glucose, Saccharose oder Lactose, ist dagegen kaum ein Einfluss auf die Produktzusammensetzung festzustellen (Cohen et al., 1979, Zoetemeyer et al., 1982c, Fang et al., 2001).

Bei geringen Raumbelastungen (2 g CSB/l) dominieren flüchtige, organische Säuren das Produktspektrum der Acidogenese, aber Propanol und Butanol sind die Hauptprodukte bei hohen Raumbelastungen (30 g CSB/l) (Fang et al., 2001, Jones und Woods, 1986).

Auch in der vorliegenden Arbeit bildeten die organischen Säuren das Hauptprodukt der Acidogenese. Die hydraulische Verweilzeit lag bei 2,5 d (60 h) und die Raumbelastung bei 2 g CSB/l*d^{-1}.

Der Versäuerungsgrad hingegen wird nicht von der HRT, aber sehr wohl von der Raumbelastung beeinflusst (Fang et al., 2001, de la Rubia et al., 2009).

In einem zweistufigen Reaktorsystem geht ein Großteil des gebildeten Kohlenstoffdioxids und Wasserstoffs bereits in der ersten Stufe als Gas weg. In der zweiten Stufe steht somit fast ausschließlich Acetat als Substrat für die methanogenen *Archaea* zur Verfügung. Der Fokus beim Einstellen der Prozessbedingungen muss daher bei den acetoklastischen Methanogenen liegen.

Eine andere Möglichkeit wäre den Gasstrom aus der ersten Stufe zur Durchmischung für die zweite Stufe zu verwenden. Dadurch würden Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff als Substrat für die hydrogenotrophen Methanogenen zur Verfügung stehen.

Neben der klassischen Vergärung von Klärschlamm oder Abwasser kann die Versäuerung bei niedrigen Temperaturen auch in anderen Gebieten, wie der Wertstoffproduktion, Anwendung finden. Der Vorteil des anaeroben Abbaus liegt dabei in der geringen Biomassebildung bei gleichzeitig hoher Produktbildung.

Die flüchtigen, organischen Säuren (Acetat, Butyrat) und Ethanol könnten als Substanzen mit Plattformcharakter für die Produktion von nachhaltigen Biokraftstoffen und grünen Chemikalien dienen (Syngiridis et al., 2014, van Aarle et al., 2015, He und You, 2015) oder zur Stromerzeugung mittels Biophotovoltaikzellen (Chandra et al., 2015). Dafür müssen jedoch noch höhere Konzentrationen erreicht werden.

Die Metaproteomanalyse bietet die Möglichkeit, tiefere Einblicke und ein besseres Verständnis über die Stoffwechselwege zu erhalten. Daraus könnten zukünftig Biosensoren für anaerobe Reaktoren entwickelt werden, die auf Basis von ausgewählten Proteinen funktionieren. Solche Indikatorproteine (metabolische Enzyme oder Stressproteine) können Veränderungen im Reaktor schon bis zu 10 Tage eher anzeigen als die Gasproduktion, der pH-Wert oder das FOS/TAC-Verhältnis (Heyer et al., 2013).

7 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten der Einfluss von Temperatur und Schlammverweilzeit auf den anaeroben Abbau und die beteiligten Mikroorganismen untersucht werden. Die versäuernden Bakterien und deren Stoffwechselprodukte standen dabei im Mittelpunkt.

Für die Untersuchungen wurden je drei gleiche 1L-Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C semikontinuierlich betrieben. Durch Zufuhr eines feststofffreien, synthetischen Abwassers mit Glucose und durch langsames Absenken der Schlammverweilzeit, beginnend mit 16 d in Schritten von 2 d, sollten in der ersten Versuchsphase die methanogenen *Archaea* aus den Reaktoren ausgewaschen werden. Es konnte dabei für die 10 °C- und 20 °C-Reaktoren ein kontinuierliches Absinken der Biogasproduktion und des Methangehaltes gemessen werden. Bei den 38 °C-Reaktoren wurde mit einer Schlammverweilzeit von 12 d begonnen und in Schritten von 4 d abgesenkt. Die Biogasproduktion nahm zunächst auch ab, blieb aber bei 8 d Schlammverweilzeit nahezu konstant. Nachdem zunächst einige methanogene *Archaea* mit den Feststoffflocken ausgewaschen wurden, konnten die verbliebenen noch in den Reaktoren wachsen und aktiv sein. Erst mit weiterem Absenken der Schlammverweilzeit sank auch die Biogasproduktion weiter. Bis einschließlich 8 d Schlammverweilzeit waren noch methanogenen *Archaea* aktiv. Bei 10 °C und 20 °C konnten nur bis zu einer Schlammverweilzeit von 10 d noch vereinzelte methanogenen *Archaea* sichtbar gemacht werden. Während zu Beginn in allen Reaktoren sehr verschiedene Morphologien erkennbar waren, dominierten am Ende in den 10 °C- und 20 °C-Reaktoren kleine Stäbchen von *Methanobacterium sp.* und *Methanobrevibacter sp.* und in den 38 °C-Reaktoren Agglomerate von *Methanosarcina sp.*.

Gleichzeitig stieg in allen Reaktoren die Konzentration an organischen Säuren. Diese sowie das Spektrum an verschiedenen Alkoholen wurden in der zweiten Versuchsphase genauer untersucht. Unterschiede zeigten sich in der Acetat- und Propionatkonzentration zwischen den Reaktoren verschiedener Temperaturen. Die konstant höchsten Acetatkonzentrationen wiesen die 10 °C-Reaktoren auf, gefolgt von den 38 °C-Reaktoren. Bei den 38 °C-Reaktoren mit 8 d Schlammverweilzeit lag die Propionatkonzentration deutlich höher als in den anderen Reaktoren.

Das Spektrum und die Konzentration an gebildeten Alkoholen für 10 °C und 20 °C mit 8 d, 4 d und 1 d Schlammverweilzeit waren vergleichbar. Für 38 °C hingegen konnte nur Ethanol in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden. Ursache waren zum einen die noch aktiven acetogenen Bakterien und methanogenen *Archaea* bis zur Schlammverweilzeit von 8 d. Durch diese wurde ein niedriger Wasserstoffpartialdruck und damit auch etwas höherer pH-Wert als in den Reaktoren mit 10 °C und 20 °C gewährleistet. Unter diesen Bedingungen werden mehr organische Säuren als Alkohole gebildet. Die Populationen der 38 °C-Reaktoren bei 4 d und 1 d Schlammverweilzeit unterschieden sich deutlich von denen der 10 °C- und 20 °C-Reaktoren, was ebenfalls das Produktspektrum beeinflusst.

Die Mikroorganismen wurden mittels zwei unterschiedlicher mikrobiologischer Methoden – Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Metaproteomanalyse – untersucht. Bei der FISH-Analyse konnten Zellen für die Phyla *Actinobacteria* (HGC69a), *Bacteroidetes* (CFB719), die Klassen *Clostridia* (ClostI) und *Gammaproteobacteria* sowie die Familie *Syntrophomonadaceae* nachgewiesen werden. In den 38 °C-Reaktoren fanden sich für 8 d Schlammverweilzeit zudem markierte Zellen für die Gattung *Syntrophobacter* und methanogene *Archaea*. Letztere wiesen einen Anteil von 3 - 5 % auf. Insgesamt konnten mit den eingesetzten Sonden jedoch nur 30 % - 55 % aller DAPI-gefärbten Zellen hybridisiert werden.

Die Metaproteomanalyse mit nanoHPLC und ESI-Ionenfalle erfolgte für je einen Reaktor jeder Temperatur (10 °C, 20 °C, 38 °C) bei einer Schlammverweilzeit von 8 d. Es konnten dabei 769 Proteine identifiziert werden, die nach biologischen Prozessen unterteilt und taxonomischen Klassen zugeordnet wurden. Es fanden sich für alle drei Reaktoren Enzyme der Glykolyse sowie des Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsels. Andere Proteine konnten als ribosomale Proteine und Stressproteine identifiziert oder der Energiekonservierung, dem Transport oder der Genregulierung zugeordnet werden. Die 10 °C-Reaktorprobe zeigte zum einen mehr Proteinhits für Vertreter der Ordnung *Clostridiales* als die Probe des 20 °C-Reaktors. Zum anderen konnte das Enzym Acetatkinase identifiziert werden, welche an der Acetatbildung aus Acetyl-CoA beteiligt ist. Beides könnte eine Erklärung für die höheren Acetatkonzentrationen bei den 10 °C- gegenüber den 20 °C-Reaktoren sein.

Insgesamt wurden vor allem für den 10 °C-und 20 °C-Reaktor zahlreiche Proteinhits von Vertretern der *Lactobacillales, Selenomonadales* und *Clostridiales* gefunden, die nicht mit den FISH-Sonden hybridisiert werden konnten. Die ESI-Daten bestätigten zudem die Aktivität methanogener *Archaea* in den 38 °C-Reaktoren bei der Schlammverweilzeit von 8 d. Das am häufigsten gefundene Enzym war die Methyl-CoenzymM-Reduktase und die meisten Hits fanden sich für *Methanosarcina sp.*.

Die Metaproteomanalyse mittels 2D-PAGE und MALDI-TOF/TOF erfolgte für die 10 °C- und 20 °C-Reaktoren mit unterschiedlichen Schlammverweilzeiten (8 d, 4 d und 1 d). Aus den sechs 2D-Gelen konnten 163 Proteine identifiziert werden. Für die 10 °C-Reaktoren mit Schlammverweilzeiten von 4 d und 1 d wurden vor allem Proteine für *Lactococcus raffinolactis* und *Propionibacterium freudenreichii* identifiziert. Spots für die 20 °C-Reaktoren konnten überwiegend Vertretern der Gattung *Actinomyces* zugeordnet werden.

Ausblick

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass in zweistufigen, anaeroben Reaktorsystemen die erste Stufe – Hydrolyse/ Versäuerung – bei niedrigen Temperaturen (< 20 °C) erfolgreich betrieben werden kann. Dabei wurden vergleichbare Konzentrationen an organischen Säuren, speziell Essigsäure, erreicht, die in der zweiten Stufe zu Methan umgesetzt werden. Dies stellt eine Möglichkeit der Energieeinsparung bei zweistufigen, anaeroben Prozessen dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stammen aus Versuchen im Labormaßstab bei denen mit

synthetischem Medium gearbeitet wurde. Die Ergebnisse sollten in zweistufigen, kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen im Technikummaßstab verifiziert werden. Zudem sind weitere Untersuchungen mit realen Abwässern verschiedener Zusammensetzung und unterschiedlichem Feststoffgehalt notwendig. Diese werden Aufschluss über die Allgemeingültigkeit der Ergebnisse bringen.

Es liegen zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der verschiedenen methanogenen *Archaea* und deren Stoffwechselwege und beteiligten Enzymen vor. Weit weniger Aufmerksamkeit haben bisher die versäuernden Bakterien erhalten. Diese sind für den anaeroben Abbau aber genauso wichtig. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die versäuernden Bakterien bei Temperaturen zwischen 10 °C und 38 °C sowie verschiedenen Schlammverweilzeiten untersucht und verglichen. Es sind weitere Untersuchungen mit realen Abwässern und der Einsatz verschiedener mikrobiologischen Methoden notwendig um zukünftig Leitorganismen und Markerproteine zu identifizieren. Mit diesen lassen sich Biosensoren oder Arrays für die Prozesssteuerung von anaeroben Fermentern auf Kläranlagen und Biogasanlagen entwickeln.

8 Literaturverzeichnis

Abram, F., Enright, A. M., O'Reilly, J., Botting, C. H., Collins, G., & O'Flaherty, V. (2011). A metaproteomic approach gives functional insights into anaerobic digestion. *J Appl Microbiol, 110*, 1550-1560.

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

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology, 56*, 1919-1925.

Ariesyady, H. D., Ito, T., & Okabe, S. (2007). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res, 41*, 1554-1568.

ATV-Arbeitsberichte. (1994). Geschwindigkeitsbestimmende Schritte beim anaeroben Abbau von organischen Verbindungen in Abwässern. In *ATV-Arbeitsberichte* (Vol. 41, pp. 101-107).

Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Thomas, P., Garcia, J.-L., & Patel, B. K. C. (1998). Aminobacterium colombiense gen. nov. sp. nov., an Amino Acid-degrading Anaerobe Isolated from Anaerobic Sludge *Anaerobe, 4*, 241-250.

Banerjee, A., Elefsiniotis, P., & Tuhtar, D. (1999). The effect of addition of potato-processing wastewater on the acidogenesis of primary sludge under varied hydraulic retention time and temperature. *Journal of Biotechnology, 72*, 203-212.

Bauer, C., Lebuhn, M., & Gronauer, A. (2009). Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In.

Belnap, C. P., Pan, C., Denef, V. J., Samatova, N. F., Hettich, R. L., & Banfield, J. F. (2011). Quantitative proteomic analyses of the response of acidophilic microbial communities to different pH conditions. *ISME J, 5*, 1152-1161.

Benndorf, D., Balcke, G. U., Harms, H., & von Bergen, M. (2007). Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J, 1*, 224-234.

Besgen, S., & Kempkens, K. (2004). Energie- und Stoffumsetzungen in Biogasanlagen. In.

Bischofsberger. (2005). Anaerobtechnik. *2. Auflage*.

Breure, A. v. A., J. (1984). Hydrolysis and acidogenic fermentation of protein, gelatin in an anaerobic continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol, 20*, 40-45.

Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., & Yenigun, O. (2005). Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry, 40*, 1285-1292.

Cardenas, E., & Tiedje, J. M. (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol, 19*, 544-549.

Cha, G. C., & Noike, T. (1997). Effect of rapid temperature change and HRT on anaerobic acidogenesis. *Water Sience Technology, 36*, 247-253.

Chandra, R., Annie Modestra, J., & Venkata Mohan, S. (2015). Biophotovoltaic cell to harness bioelectricity from acidogenic wastewater associated with Microbial Community Profiling. *Fuel, 160*, 502-512.

Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., & Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Res, 41*, 683-689.

Cheng, C.-H., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Liau, P.-Y., Liang, C.-M., Yang, L.-H., Lin, P.-J., & Lin, C.-Y. (2008). Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*, 5242-5249.

Cohen, A., Zoetemeyer, R. J., van Deursen, A., & van Andel, J. G. (1979). Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. *Water Research, 13*, 571-580.

Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M. W., & O'Flaherty, V. (2003). Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology, 46*, 159-170.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol, 44*, 812-826.

Connaughton, S., Collins, G., & O'Flaherty, V. (2006). Development of microbial community structure and actvity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 degrees C. *Water Res, 40*, 1009-1017.

Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology, 28*, 193-202.

Conrad, R. (2002). Control of microbial methane production in wetland rice fields. *Nutr. Cycl. Agroecosyst., 64*, 59-69.

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (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*, 434-444.

De La Rubia, M. A., Raposo, F., Rincón, B., & Borja, R. (2009). Evaluation of the hydrolytic–acidogenic step of a two-stage mesophilic anaerobic digestion process of sunflower oil cake. *Bioresource Technology, 100*, 4133-4138.

DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L., & Preston, C. M. (1999). Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide

probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology, 65*.

DeLong, E. F., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science, 243*.

Dinopoulou, G., Rudd, T., & Lester, J. N. (1988). Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: I. The influence of operational parameters on reactor performance. *Biotechnol Bioeng, 31*, 958-968.

Elefsiniotis, P., & Oldham, W. K. (1994). Effect of HRT on Acidogenic Digestion of Primary Sludge. *Environ Engineering, 120*, 645-660.

Fall, P. A. D. (2002). *FISH zur Überwachung von Biogasreaktoren.* Technische Universität München.

Ghosh, S. (1987). Improved Sludge Gasification by Two-Phase Anaerobic Digestion. *Journal of Environmental Engineering, 113*, 1265-1284.

Gilot, P., & Content, J. (2002). Specific Identification of Listeria welshimeri and Listeria monocytogenes by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. *Journal of Clinical Microbiology, 40*, 698-703.

Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. New York: Springer-Verlag.

Grepmeier, M. (2002). *Experimentelle Untersuchungen an einer zweistufigen fuzzy-geregelten anaeroben Abwasserreinigungsanlage mit neuartigem Festbettmaterial.* TU München.

Guerrero, L., Montalvo, S., Coronado, E., Chamy, R., Poirrier, P., Crutchik, D., Sanchez, E., De La Rubia, M. A., & Borja, R. (2009). Performance evaluation of a two-phase anaerobic digestion process of synthetic domestic wastewater at ambient temperature. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 44*, 673-681.

Hanreich, A., Heyer, R., Benndorf, D., Rapp, E., Pioch, M., Reichl, U., & Klocke, M. (2011). Functional analysis of biogas-producing microbial consortia by community metaproteomics. In.

Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schluter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Puhler, A., Reichl, U., & Klocke, M. (2013). Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol, 36*, 330-338.

Hansen, K. H., Ahring, B. K., & Raskin, L. (1999). Quantification of syntrophic fatty acid-beta-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol, 65*, 4767-4774.

Hauer, I. (1993). Biogas-, Klärgas- und Deponiegasanlagen im Praxisbetrieb. *Landtechnische Schriftenreihe, 192*.

Henry, M. P., Sajjad, A., & Ghosh, S. (1987). The effects of environmental factors on acid-phase digestion of sewage sludge. *Proc., 42nd Purdue Industrial Waste Conf.*, 727-737.

Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M., & Reichl, U. (2013). Metaproteome analysis of the microbial communities in agricultural biogas plants. *N Biotechnol*, 614-622.

Hobson, P. N., Melvin, W. T., & Ng, A. (1994). Identification of anaerobic digester bacteria using PCR. *Bioresource Technology, 47*.

Iino, T., Mori, K., Tanaka, K., Suzuki, K., & Harayama, S. (2007). Oscillibacter valericigenes gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *Int J Syst Evol Microbiol, 57*, 1840-1845.

Industrieabwässern, A.-F. A. V. z. B. v. (1994). Geschwindigkeitsbestimmende Schritte beim aneroben Abbau von organischen Verbindungen in Abwässern. In (Vol. 41): ATV-Arbeitsberichte.

Jetten, M. (1991). *Acetate metabolism in Methanothrix soehngenii.* University Wageningen, Wageningen.

Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M., & Zehnder, A. J. B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in Methanothrix soehngenii and Methanosarcina spp. *FEMS Microbiology Letters, 88*, 181-197.

Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews, 50*, 484-524.

Kan, J., Hanson, T. E., Ginter, J. M., Wang, K., & Chen, F. (2005). Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Systems, 1*, 7.

Karakashev, D., Batstone, D. J., & Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic composition in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology, 71*, 331-338.

Kim, J., Shin, S. G., Han, G., O'Flaherty, V., Lee, C., & Hwang, S. (2011). Common key acidogen populations in anaerobic reactors treating different wastewaters: Molecular identification and quantitative monitoring. *Water Research, 45*, 2539-2549.

Kim, J. K., Oh, B. R., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2006). Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *J Biosci Bioeng, 102*, 328-332.

Kobabe, S., Wagner, D., & Pfeiffer, E. M. (2004). Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol, 50*, 13-23.

Kohrs, F. (2011). *Weiterentwicklung und Optimierung von Methoden für die Metaproteomanalyse von Belebtschlamm.* Otto von Guericke Universität Magdeburg.

Kuhn, R., Benndorf, D., Rapp, E., Reichl, U., Palese, L. L., & Pollice, A. (2011). Metaproteome analysis of sewage sludge from membrane bioreactors. *Proteomics, 11*, 2738-2744.

Kunst, S., & Mudrack, K. (1993). Mikrobiologische Grundlagen. In S. C. F. H. Böhnke B.; Bischofsberger W. (Ed.), *Anarobtechnik: Handbuch der anaeroben Behandlung von Abwasser und Schlamm*. Berlin/Heidelberg/New York, TU Braunschweig: Springer-Verlag.

Küsel, K., Pinkart, H. C., Drake, H. L., & Devereux, R. (1999). Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizoplane and Deep Cortex Cells of the Sea Grass Halodule wrightii. *Applied and Environmental Microbiology, 65*, 5117-5123.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophade-t4. *Nature, 227*, 680-685.

Lathe, R. (1985). Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J Mol Biol, 183*, 1-12.

Liu, W., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by TRFLP_16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology, 63*.

Maharaj, I., & Elefsiniotis, P. (2001). The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology, 76*, 191-197.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic Oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol, 15*, 593-600.

Manz, W., Amann, R., Szewzyk, U., Ericsson, P., & Schleifer, K. H. (1993). In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology, 59*.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R., & Schleifer, K.-H. (1994). In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Research, 28*, 1715-1723.

Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., & Ng, W. J. (2015). Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems - Performance and microbial community dynamics. *Chemosphere, 140*, 54-62.

McKeown, R. M., Scully, C., Mahony, T., Collins, G., & O'Flaherty, V. (2009). Long-term (1,243 days), low-temperature (4-15 degrees C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Res, 43*, 1611-1620.

Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1999). Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Syst Appl Microbiol, 22*, 186-196.

Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1999). Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C Content. *Syst Appl Microbiol, 22*, 186-196.

Meisgeier, N. (2007). *Verkürzung der Einfahrphase bei der anaeroben Behandlung von Fäkalien, organischen Abfällen und Reststoffen.* Bauhaus-Universität Weimar, Weimar.

Menes, R. J., & Muxi, L. (2002). Anaerobaculum mobile sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus Anaerobaculum. *Int J Syst Evol Microbiol, 52*, 157-164.

Miron, Y., Zeeman, G., van Lier, J. B., & Lettinga, G. (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research, 34*, 1705-1713.

Mohr, M. (2011). *Betrieb eines anaeroben Membranbioreaktors vor dem Hintergrunde der Zielstellung des vollständigen Recyclings kommunalen Abwassers und seiner Inahltsstoffe.* Stuttgart.

Mudrack, K., & Kunst, S. (2003). Biologie der Abwasserreinigung. In.

MURL. (1999). *Energie in Kläranlagen: Handbuch*. Düsseldorf: Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft das Landes Nordrhein-Westfalen.

Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek, 73*, 127-141.

NCBI-Taxonomy.

Neuhoff, V., Stamm, R., & Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis, 6*, 427-448.

Nielsen, P. H., Daims, H., & Lemmer, H. (2009). *FISH handbook for biological wastewater treatment*.

O'Farell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Biol. Chem., 250*, 4007-4021.

O'Reilly, J., Lee, C., Chinalia, F., Collins, G., Mahony, T., & O'Flaherty, V. (2010). Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15°C) anaerobic wastewater treatment bioreactors. *Bioresource Technology, 101*, 6336-6344.

Oda, Y., Slagman, S.-J., Meijer, W. G., Forney, L. J., & Gottschal, J. C. (2000). Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of Rhodopseudomonas palustris. *FEMS Microbiology Ecology, 32*, 205-213.

Park, C., Helm, R. F., & Novak, J. T. (2008). Investigating the fate of activated sludge extracellular proteins in sludge digestion using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Environ Res, 80*, 2219-2227.

Peng, J., Lu, Z., Rui, J., & Lu, Y. (2008). Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Appl Environ Microbiol, 74*, 2894-2901.

Popov, N., Schmitt, S., & Matthies, H. (1975). Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta biol. Germ., 34*, 1441-1446.

Poulsen, L. K., Ballard, G., & Stahl, D. A. (1993). Use of rRNA FISH for measuring the activity of sigle cells in young biofilms. *Applied and Environmental Microbiology, 59*.

Pradet-Balade, B., Boulme, F., Beug, H., Müllner, E. W., & garcia-Sanz, J. A. (2001). Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends in Biochemical Sciences, 26*, 225-229.

probeBase. Department of Microbial Ecology, University Vienna.

Ram, R. J., Verberkmoes, N. C., Thelen, M. P., Tyson, G. W., Baker, B. J., Blake, R. C., 2nd, Shah, M., Hettich, R. L., & Banfield, J. F. (2005). Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science, 308*, 1915-1920.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology, 140 (Pt 10)*, 2849-2858.

Sans, C., & Mata-Alvarez, J. (1993). Volatile fatty acids production by anaerobic fermentation of urban organic wastes. *American Chemical Society, 206*.

Sanz, J. L., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry, 42*, 119-133.

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61*.

Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*: Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Shevchenko, A., & Shevchenko, A. (2001). Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem, 296*, 279-283.

Sonntag, D. (1990). Important new values of the physical constants of 1986, vapour pressure formulations based on the ITS-90 and psychrometer formulae. *Zeitschrift für Meteorologie, 40(5)*, 340-344.

Sorensen, A. H., Torsvik, V. L., Torsvic, T., Poulsen, L. K., & Ahring, B. K. (1997). Whole-cell hybridization of Methanosarcina cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol., 63*, 3043–3050.

Sowell, S. M., Wilhelm, L. J., Norbeck, A. D., Lipton, M. S., Nicora, C. D., Barofsky, D. F., Carlson, C. A., Smith, R. D., & Giovanonni, S. J. (2009). Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. *ISME J, 3*, 93-105.

Spendlin, H.-H. (1991). Untersuchungen zur frühzeitigen Initiierung der Methanbildung bei festen Abfallstoffen. In *Hamburger Berichte Band 4* (Vol. 4).

Spies, P. (1986). Anaerobe Behandlung fetthaltigen Abwassers am Beispiel einer Wollwäscherei. *Veröffentlichung d. Instituts f. Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover, Schriftenreihe TU Hannover, Heft 65*.

Stahl, D. A., & Amann, R. (1991). Development and Application of Nucleic Acid Probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 205–248). New York: Wiley.

Syngiridis, K., Bekatorou, A., Kandylis, P., Larroche, C., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2014). Favouring butyrate production for a new generation biofuel by acidogenic glucose fermentation using cells immobilised on γ-alumina. *Bioresource Technology, 161*, 118-123.

Tyers, M., & Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature, 422*, 193-197.

van Aarle, I. M., Perimenis, A., Lima-Ramos, J., de Hults, E., George, I. F., & Gerin, P. A. (2015). Mixed inoculum origin and lignocellulosic substrate type both influence the production of volatile fatty acids during acidogenic fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 103*, 242-249.

VDI4630. (2006). Vergärung organischer Stoffe: Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. In. Berlin: Beuth Verlage GmbH.

Vesey, G., Deere, D., Gauci, M. R., Griffiths, K. R., Williams, K. L., & Veal, D. A. (1997). Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. *Cytometry, 29*, 147–154.

Wallner, G., Amann, R., & Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry, 14*, 136-143.

Weber, S. (2000). *Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden.* Philipps-Universität Marburg.

Weiland, P. (2003). Biologie der Biogaserzeugung.

Weller, R., Glockner, F. O., & Amann, R. (2000). 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Syst Appl Microbiol, 23*, 107-114.

Wessendorf, M. W., & Brelje, T. C. (1992). Which fluorophore is the brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry, 98*, 81–85.

Whiteley, A. S., & Bailey, M. J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 2400-2407.

Wilkins, M. J., Verberkmoes, N. C., Williams, K. H., Callister, S. J., Mouser, P. J., Elifantz, H., N'Guessan A, L., Thomas, B. C., Nicora, C. D., Shah, M. B., Abraham, P., Lipton, M. S., Lovley, D. R., Hettich, R. L., Long, P. E., & Banfield, J. F. (2009). Proteogenomic monitoring of Geobacter physiology during stimulated uranium bioremediation. *Appl Environ Microbiol, 75*, 6591-6599.

Wilmes, P., & Bond, P. L. (2004). The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ Microbiol, 6*, 911-920.

Xia, Y., Masse, D. I., McAllister, T. A., Kong, Y., Seviour, R., & Beaulieu, C. (2012). Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes. *Bioresour Technol, 110*, 111-119.

Yang, Y., Zhang, S., Howe, K., Wilson, D. B., Moser, F., Irwin, D., & Thannhauser, T. W. (2007). A comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-based protein identification and iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Biomol Tech, 18*, 226-237.

Yu, H. Q., & Fang, H. H. (2000). Thermophilic acidification of dairy wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol, 54*, 439-444.

Zhang, T. C., & Noike, T. (1991). Comparison of One-Phase and Two-Phase Anaerobic Digestion Processes in Characteristics of Substrate Degradation and Bacterial Population Levels. *Water Sci Technol, 23*, 1157-1166.

Zoetemeyer, R. J., Borgerding, P. H., Van Den Heuvel, J. C., Cohen, A., & Boelhouwer, C. (1982c). Pilot scale anaerobic acidification of waste water containing sucrose and lactate. *Biomass, 2*.

9 Anhang

9.1 Geräte und Messmethoden

Tabelle 9-1: Komponenten und Eigenschaften des Micro-Gaschromatographen Typ CP490 (Varian/ Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Komponente	Typ bzw. Eigenschaften
Kapillarsäulen	Molsieve 5 Å PLOT Pora Plot Q
Injektor	Injektionsvolumen 10 µl (sample loop); davon 40 ms (= 20 nl) für Analyse T = 110°C
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD)
Trägergas	Argon
Datenerfassung/ Auswertung	Galaxie 1.9

Tabelle 9-2: Komponenten und Eigenschaften des Gaschromatographen Typ 3900 (Varian/Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Komponente	Typ bzw. Eigenschaften
Autosampler	Varian CP 8400
Kapillarsäule	7485WCOT Fused Silica Coating FFAP-CP Länge = 25 m; ID = 32 mm; Ofen: 40-180 °C
Injektor	Varian Typ 1177
	Injektionsvolumen 1 µl (Split Ratio 50); T = 230°C; v = 3,0 ml/min
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID); T = 280°C
Trägergas	Helium
Datenerfassung/ Auswertung	Star Wars 6.41 Varian

Tabelle 9-3: HPLC-Gerät und Messbedingungen (Perkin Elmer, Shelton, USA)

Komponente	**Typ bzw. Eigenschaften**
Autosampler	Flexar UHPLC
Kapillarsäule	Aminex
Detektor	RI-Detektor
Datenerfassung/ Auswertung	Chromera 3.4.0.5712
HPLC-Messbedingungen	
Fluss	0,6 ml/ min
Injektionsvolumen	20 µl
Ofentemperatur	45 °C
Laufmittel	5 mM H_2SO_4

Tabelle 9-4: Messprinzip, Störquellen und Messbereich der verwendeten kolorimetrischen Küvettentests (Hach-Lange, Düsseldorf, Deutschland) (Hach-Lange, 2001-2003 66)

Test Kit-Nr	**Messprinzip**	**Störquellen und Messbereich**
CSB LCK 514	In schwefelsaurer Lösung und in Gegenwart von Silbersulfat als Katalysator reagieren oxidierbare Stoffe mit Kaliumdichromat-Lösung. Chlorid wird mit Quecksilbersulfat maskiert. Ausgewertet wird die Extinktion durch die Grünfärbung des Cr^{3+} bei einer Wellenlänge von 605 nm. Im Gegensatz zur klassischen Bestimmung des CSB nach DIN 38409 H41 -1 wird die Probe bei einer höheren Temperatur (171°C) und für eine kürzere Zeit (15 min) in einem Thermostat (Typ HT 200S,. Hach Lange) aufgeschlossen	Störquellen: Cl^{2-} > 1.500 mg/l (Mehrbefunde durch Oxidation von Chlorid zu Chlor) Messbereich: 100 – 2.000 mg/l
TN LCK 338	Organisch und anorganisch gebundener Stickstoff wird durch den Aufschluss mit Peroxodisulfat zu Nitrat oxidiert. Die Nitrationen reagieren in der schwefel- und phosphorsauren Lösung mit 2.6-Dimethy-lphenol zu einem Nirophenol. Es wird die Extinktion bei 370 nm gemessen.	Störquellen: Keine Störung bis CSB < 2.500 mg/l Cl^{2-} < 5.000 mg/l Messbereich: 20 – 100 mg/l

Tabelle 9-5: nanoHPLC-MS/MS und Messbedingungen

Komponente	**Typ bzw. Eigenschaften**
Massenspektrometer	amaZon^{TM} ETD
MS/MS	Elektrospray-Ionisation (ESI), nano-Sprayer
HPLC	UltiMate® 3000 RSLCnano splitless RPLC (Thermo Fisher Scientific)
Software	DataAnalysis 2.0
nanoHPLC-MS/MS-Messbedingungen	
Probenvolumen	5 µl je Lauf (Peptide gelöst in mobiler Phase A)
Peptid-Separation	Binärer Gradient von 4% bis 55 % der mobilen Phase B, in 120 min
Flow rate	0,3 µl/ min
MS	Positiver Ionen Modus
Auto-MS/MS	10 Precursor pro MS

Tabelle 9-6: MALDI-TOF/TOF-Gerät (Bruker) und Messbedingungen

Komponente	**Typ bzw. Eigenschaften**
Massenspektrometer	ultrafleXtreme^{TM} MALDI-TOF/TOF
Laser	Smartbeam-II^{TM} 1 – 1000 Hz
Detektor	4 GHz digitizer, 1 ppm accurance
MS/MS	LID-LIFT process
Software	Flexcontrol, FlexAnalysis, Biotools, Warp-LC
MALDI-TOF/TOF-Messbedingungen	
Mass range	700 – 4.000 Da
Detector gain	4,0-fach
Electronic gain	Enhanced, 100 mV
Shots per spot	4.000

Tabelle 9-7: MASCOT-Sucheinstellungen und benutzte Datenbanken

Datenbank-Suche		
NCBInr UniProt_sprot		
Parameter	**ESI-TRAP**	**MALDI-TOF/TOF**
Enzyme	Trypsin	Trypsin
Allow up to	1 missed cleavage(s)	1 missed cleavage(s)
Fixed modifications	-	-
Variable modifications	Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)	Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
Protein mass	Unrestricted	Unrestricted
Peptide mass tolerance	± 0,6 Da	± 50,0 ppm
Fragment mass tolerance	± 0,3 Da	± 0,5 Da
#^{13}C	1	0
Peptide charge	2+ und 3+	1+
Mass values	Monoisotopic	Monoisotopic
Data format	Mascot generic	Mascot generic
Instrument	ESI-TRAP	MALDI- TOF/TOF

9.2 Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen

Chemikalie/ Lösung	Beschreibung
ABC-Puffer	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung
Aceton	VWR Produkt: 20063.296
Acetonitril	LC-MS grade Fluka 34967
Acetonitril-Lösung (10 %-ig)	Acetonitril in Reinstwasser 1:10 (v/v)
Acrylamid	Acrylamid Lösung (30%) für die Molekular-biologie; AppliChem, A3626,1000
Agarose	Agarose für DNS/ RNS-Elektrophorese; Roth, Art. 6352.4
Amidoschwarz	Naphthol Blue Black; Sigma Alderich 195243-255
80 % Amidoschwarz Lösung	90 ml Methanol 10 ml Essigsäure 26 mg Amidoschwarz
Ammoniumacetat	Ammoniumacetat >97%, Roth, Art.7869.1
Ammoniumbicarbonat	Ammoniumhydrogencarbonat ultra >99,5%; Fluka 09830
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma Alderich A1645-100G
Ammoniumformiat	für Massenspektrometrie; Sigma Alderich 70221
Ammoniumpersulfat	ammonium persulphate minimum assay 98%, Amersham Biosciences 17-1311-01
Ammoniumsulfat	Sigma A4418
Ampholin	Pharmalyt™ 3 - 10 für IEF; Ammersham Bioscience, 17-0456-01
Äquilibrierpuffer	69 ml Glycerol gelöst in 70 ml Reinstwasser 6.6 ml 1.5 M Tris-HCL pH 8,8 72.07 g Harnstoff 4 g SDS dazu 200 ml Reinstwasser geben Spatelspitze Bromphenolblau
Aufschluss-Tubes	Precellys 7 ml Aufschluss-Tubes (leer) (91-PCS-TVC7)
Bromphenolblau	Amersham Biosciences, 17-1329-01
Bovine Serum Albumine	Albumin von Bovin Serum min. 96 %; Sigma Alderich, A3912-1006
Butanol, wassergesättigt	p. A., Merck mit Reinstwasser, ca. 3:1

Iso-Butanol	p. A., Merck
Cellophan Folien	Siehe Geltrocknungsrahmen
Colloidal Coomassie Lösung	Roti®-Blue, 5x konzentriert; C. Roth
Colloidal Coomassie Lösung	0.5 g Coomassie Brillant Blau G-250 in 10 ml Reinstwasser lösen 50 g Ammoniumsulfat 6 ml 85 % Phosphorsäure auffüllen mit Reinstwasser bis 500 ml 125 ml Methanol
Coomassie Brillant Blau G250	Coomassie Brilliant Blue G250, 1.15444.0025
Cover Fluid	GeHealthcare, 17-1335-01
DeStreak Solution	DeStreak™ reagent, GeHealthcare, 17-6003-18
Dithiothreitol (DTT)	DTT für die Molekularbiologie; Appli-Chem, A2948,0010
DTT-Lösung	45 mM DTT in ABC-Puffer
Discover® DPA-6S	Discovery DPA-6S, Supelco 52633-U
EDTA (Ethylendiamintetracetat)	Sigma Aldrich
EDTA-Lösung (0,5 M), pH 8,0	18,6 g EDTA in 80 ml A. bidest lösen mit NaOH den pH 8,0 einstellen bis auf 100 ml mit A. bidest auffüllen
Essigsäure	LC-MS, Fluka 49199
Extraktionspuffer (trypt. Verdau)	5 ml Reinstwasser 5 ml Acetonitril 100 µl Trifluoressigsäure
Fixierlösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure 50 % Reinstwasser
0,5 %ige Gelatine-Lösung	5 g Gelatine 0,01 g Chromkaliumsulfat ($CrK(SO_4)_2$) 100 ml A. Bidest (70 °C) Lagerung bei 4 °C;
Geltrocknungsrahmen+Cellophanfolien	Maxi-Set-Geltrocknungsrahmen; C.Roth, 24x24 cm
Glycerol	Glycerol (wasserfrei); AppliChem, A1123.2500
Glycerol-Lösung	200 ml Glycerol 600 ml Ethanol bis auf 2 l mit Reinstwasser auffüllen
Iodacetamid (IAA)	Iodacetamide, AppliChem, A1666.0025

IAA-Lösung	100 mM IAA in ABC-Puffer
IPG-Streifen	Immobiline Dry Strip pH 4-7; 7cm & 18cm
Mercaptoethanol	beta-Mercaptoethanol, Merck, 444203
Methanol	Methanol ROTIPURAN, >99,9%, ROTH 4627.2
Molecular Weight Standard	Page Ruler™
Natriumchlorid	p. A., Merck
5 M NaCl-Lösung	sterilfiltriert (0,2 µm)
Objektträger mit Reaktionsfeldern, teflonbeschichtet	Diagnostische Objektträger 10/5 mmDM schwarz (Marienfeld)
Paperbridge	Paperbridge pads, GeHealthcare, 80-6499-33
Paper-Wick-Filter	Paper Wicks, GEHealthcare
Paraformaldehyd-Lösung (8 %ig)	4 g Paraformaldehyd 30 ml A. bidest (60 °C) 2 N NaOH zum lösen 16,6 ml 3-fach PBS mit A. bidest bis auf 50 ml auffüllen Lagerung in Aliquote bei – 20 °C
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, 3-fach), pH 7,4	0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (NaH_3PO_4) 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (Na_2HPO_4) → mischen bis pH 7,4 → 300 ml davon mit 22,8 g Natriumchlorid (NaCl) mischen und bis auf 1000 ml mit A. bidest auffüllen Autoklaviert (Autoklav Typ VX-95,Systec)
PBS-Lösung (1-fach)	50 ml PBS (3-fach) 100 ml A. bidest
PBS/Ethanol-Lösung (1:1)	50 Vol. % 1xPBS-Lösung 50 Vol. % Ethanol-Lösung (96 %) Sterilfiltration (2 µm)
Pepton aus Casein	tryptisch verdaut, Th. Geyer
Phenol	Merck, 1.00206.0250
Phenollösung	10 g Phenol in 1 ml Reinstwasser
Probenpuffer	50 ml A. bidest 12,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 10 ml Glycerol 20 ml 10 %ig SDS 5 ml Mercaptoethanol 1 ml 0,5 %ig Bromphenolblau
Propanol	Fluka; Assay ≥ 99,5 %
Protein LowBind Tube 0,5 ml	Eppendorf

Proteinstandard	Prestained Protein Ladder #22619, Thermo Fisher Scientific
Iso-Propanol (2-P)	HPLC-Grade, ROTH
Saccharose	Fluka, für die Mikrobiologie ≥ 99,0 %
Salzsäure (HCl)	32 % p. A., Merck
Sammelgel (4 %)	6,1 ml Reinstwasser 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,3 ml Acrylamid (30 %) 100 µl 10 % SDS 75 µl 10 % APS 15 µl TEMED
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Für die Elektrophorese, ROTH
SDS-Lösung (10 %ig), pH 7,2	50 g SDS 400 ml (70 °C) A. bidest mit konz. HCl auf pH 7,2 einstellen auf 500 ml mit A. bidest auffüllen
SDS-Laufpuffer (5x)	15 g TRIS 72 g Glycin 5 g SDS
Silica Beads	0.5mm Zirconia/ Silica Beads, BioSpec Products Inc, 1179105z
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	TEMED assay 99%, GE Healthcare, 17-1312-01
Trenngel (12 %)	6,7 ml Reinstwasser 5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 8 ml Acrylamid (30 %) 200 µl 10 % SDS 150 µl 10 % APS 15 µl TEMED
Trichloressigsäure	Sigma Alderich T6399-259
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Life Science, 73645
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, A2264500
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 8,0	0,01 M EDTA-Lösung 0,1 M Tris-HCl-Lösung → mischen bis pH 8;0 Sterilfiltration (2 µm); Lagerung bei 4 °C
Tris-HCl (0.5 M) pH 6.8	15 g Tris in Reinstwasser lösen mit 1 N HCl pH 6,8 einstellen

	auf 250 ml mit Reinstwasser auffüllen
Tris-HCl (1 M) pH 8,0	121,1 g Tris in ca 800 ml A. bidest lösen mit konz. HCl (ca 42 ml) pH 8,0 einstellen bis auf 1000 ml mit A. bidest auffüllen autoklavieren
Trypsin Gold	Lyophilisiert, Mass Spectrometry Grade; Promega
Trypsin-HCl-Lösung	100 µg Trypsin 100 µl HCl
Trypsinpuffer	50 µl Trypsin-HCl-Lösung ($c_{Trypsin}$ = 1 µg/µl)
Waschlösung (tryptischer Verdau)	50 % Methanol 45 % Reinstwasser 5 % Essigsäure

9.3 MATLAB-Algorithmus

Datei: PixelZaehlenMult

```
function PixelZaehlenMult
d=dir(pwd); d(~[d.isdir])=[]; d(1:2)=[];
sel=listdlg('ListString',{d.name});
d=d(sel);

%% optionen
opt.GrenzeRot=40;
opt.GrenzeGrn=45;
opt.GrenzeBlu=45;

opt.KorrLicht=true;
opt.Belicht_Rot=200;
opt.Belicht_Grn=400;
opt.Belicht_Blu=30;

%% Durchlauf aller ordner
for i=1:length(d);
   if d(i).isdir
      res=PixelZaehlen(d(i).name,opt);
      val=struct2cell(res)';
      if i==1
         % Spaltenbeschriftung
         fn=fieldnames(res)';
         Tab=['Name',fn];
      end
      Tab=[Tab;d(i).name,val];
   end
end
% xlswrite(['Auswertung_',SondeRot,'_',SondeGruen,'_Korrigiert.xlsx'],Tab)
xlswrite('Auswertung.xlsx',Tab)
end
```

Datei: PixelZaehlen

```
function varargout=PixelZaehlen(Path,opt)
close all; clc;

if exist(fullfile(Path,'_meta.xml'))==2
   xDoc = xmlread(fullfile(Path,'_meta.xml'));
   V43 = xDoc.getElementsByTagName('V43');

   st0 = char(V43.item(1).getFirstChild.getData);
   res.Belicht_Rot = str2double(strrep(st0,',','.'));

   st1 = char(V43.item(2).getFirstChild.getData);
   res.Belicht_Grn = str2double(strrep(st1,',','.'));

   st1 = char(V43.item(3).getFirstChild.getData);
   res.Belicht_Blu = str2double(strrep(st1,',','.'));
end

File=Path(1:end-10);
Rot = imread(fullfile(Path,[File,'_c0.tif']));
% Farben auf gleiche Belichtungszeit beziehen
if opt.KorrLicht
   Rot=double(Rot)*opt.Belicht_Rot/res.Belicht_Rot;
   if max(max(Rot))>255
      Rot(Rot>255)=255;
   end
   Rot=uint8(Rot);
end

try
   % Darstellen in der Richtigen Farbe
   rgb(:,:,1)=Rot;              % Roter Kanal
   rgb(:,:,2)=zeros(size(Rot));   % Grüner Kanal = 0
   rgb(:,:,3)=zeros(size(Rot));   % Blauer Kanal = 0
catch
   rgb=Rot;
```

```
   Rot=rgb(:,:,1);
end

subplot(2,2,1);
image(rgb); title('Cy3')
set(gca,'Xtick',[],'Ytick',[]); % keine Achsenbeschriftung

Grn = imread(fullfile(Path,[File,'_c1.tif']));
% Farben auf gleiche Belichtungszeit beziehen
if opt.KorrLicht
   Grn=double(Grn)*opt.Belicht_Grn/res.Belicht_Grn;
   if max(max(Grn))>255
      Grn(Grn>255)=255;
   end
   Grn=uint8(Grn);
end

try
   % Darstellen in der Richtigen Farbe
   rgb(:,:,1)=zeros(size(Grn));  % Roter Kanal = 0
   rgb(:,:,2)=Grn;               % Grüner Kanal
   rgb(:,:,3)=zeros(size(Grn));  % Blauer Kanal = 0
catch
   rgb=Grn;
   Grn=rgb(:,:,2);
end
subplot(2,2,2);
image(rgb); title('6FAM')
set(gca,'Xtick',[],'Ytick',[]); % keine Achsenbeschriftung

Blu = imread(fullfile(Path,[File,'_c2.tif']));
% Farben auf gleiche Belichtungszeit beziehen
if opt.KorrLicht
   Blu=double(Blu)*opt.Belicht_Blu/res.Belicht_Blu;
   if max(max(Blu))>255
      Blu(Blu>255)=255;
```

```
    end
    Blu=uint8(Blu);
end

try
    % Darstellen in der Richtigen Farbe
    rgb(:,:,1)=zeros(size(Blu));  % Roter Kanal = 0
    rgb(:,:,2)=zeros(size(Blu));              % Grüner Kanal
    rgb(:,:,3)=Blu;  % Blauer Kanal = 0
catch
    rgb=Blu;
    Blu=rgb(:,:,2);
end
subplot(2,2,3);
image(rgb); title('Dapi')
set(gca,'Xtick',[],'Ytick',[]); % keine Achsenbeschriftung

Blu1=Blu>opt.GrenzeBlu;
Rot1=Rot>opt.GrenzeRot & Blu1;
Grn1=Grn>opt.GrenzeGrn & Blu1;
Rot2=Rot>opt.GrenzeRot;
Grn2=Grn>opt.GrenzeGrn;

rgb(:,:,1)=255*Rot1;  % Roter Kanal = 0
rgb(:,:,2)=255*Grn1;              % Grüner Kanal
rgb(:,:,3)=255*Blu1;

subplot(2,2,4)
image(rgb);
set(gca,'Xtick',[],'Ytick',[]); % keine Achsenbeschriftung

res.Pixel_Rot=sum(sum(Rot1)); % Anzahl Roter Pixel
res.Pixel_Grn=sum(sum(Grn1)); % Anzahl Roter Pixel
res.Pixel_Blu=sum(sum(Blu1)); % Anzahl Roter Pixel

res.Anteil_Rot_Blu=res.Pixel_Rot/(res.Pixel_Blu)*100;
```

```
res.Anteil_Grn_Blu=res.Pixel_Grn/(res.Pixel_Blu)*100;

GR=Grn1&Rot1;

res.Anteil_Grn_zu_Rot=sum(GR(:))/(res.Pixel_Rot)*100;
res.Anteil_Rot_zu_Grn=sum(GR(:))/(res.Pixel_Grn)*100;
res.Anteil_GR_zu_Blu=sum(GR(:))/(res.Pixel_Blu)*100;

% Leuchtstärke der erkannten Zellen
res.ImRot=mean(mean(Rot));
res.ImGrn=mean(mean(Grn));
res.IRot=mean(mean(Rot(Blu1)));
res.IGrn=mean(mean(Grn(Blu1)));
res.IRot2=mean(mean(Rot(Rot2)));
res.IGrn2=mean(mean(Grn(Grn2)));

% Bild speichern als emf
saveas(gcf,fullfile(Path,File),'emf')

varargout{1}=res;
end
```

9.4 Ergebnistabellen zur Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Metaproteomanalyse

Tabelle 9-8: Ergebnisse mit Konfidenzen der FISH-Analysen für die Reaktoren bei 10 °C, 20 °C und 38 °C mit den verschiedenen Gensonden

		10 °C						20 °C						38 °C					
FISH-Sonde	Gram	1 d		4 d		8 d		1 d		4 d		8 d		1 d		4 d		8 d	
		Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz	Wert	Konfidenz
ClostI	+	7,63	2,04	14,34	3,26	14,54	2,38	5,47	1,93	6,30	1,88	1,91	0,31	30,49	4,63	9,19	2,94	11,45	2,26
Class: Clostridia		7,56	1,80	9,77	2,03	14,40	1,37	5,74	1,15	5,00	1,56	1,34	0,26	40,07	7,56	15,20	2,86	1,23	0,51
		6,66	1,72	11,42	2,26	16,59	1,72	5,03	1,53	4,71	1,52	1,92	0,37	0,00	-	33,87	4,96	4,13	1,76
		7,30	1,05	**11,91**	1,60	**15,15**	1,12	**5,41**	0,88	**5,38**	0,97	**1,68**	0,19	**35,28**	4,79	**19,77**	7,94	**5,65**	1,74
HGC69a	+	11,52	3,01	11,42	4,49	23,51	3,29	8,77	1,75	7,23	1,68	0,94	0,73	0,46	0,37	0,37	0,42	2,90	1,68
Phylum: Actinobacteria		17,78	4,27	8,33	2,63	10,22	2,33	2,43	1,49	20,82	5,83	0,37	0,08	0,21	0,15	1,32	1,28	4,04	1,17
		18,23	6,14	10,30	3,57	4,76	0,86	2,68	1,36	30,31	5,66	0,20	0,08	9,69	6,03	0,12	0,12	10,37	3,99
		15,54	2,57	**10,53**	2,63	**12,20**	3,08	**4,63**	1,33	**19,09**	4,18	**0,49**	0,25	**0,34**	0,21	**0,60**	0,46	**5,63**	1,79
CFB719	-	1,07	0,52	2,04	0,80	7,53	1,81	13,40	2,42	3,51	0,77	2,18	1,14	0,00	-	23,68	4,24	31,01	1,90
Phylum: Bacteroidetes		0,93	0,79	2,22	0,84	3,11	1,26	5,93	0,59	4,31	1,17	1,37	0,56			18,30	5,48	8,41	2,81
		1,84	0,90	1,51	0,80	7,98	1,83	11,80	1,74	1,54	0,43	1,40	0,25	0,00	-	12,67	3,38	11,06	4,08
		1,32	0,45	**1,91**	0,47	**6,11**	1,21	**10,61**	1,51	**3,12**	0,62	**1,58**	0,34	**0,00**		**18,22**	2,97	**17,51**	3,94
Synm700	+	5,30	1,35	8,00	2,63	9,22	1,42	16,00	2,60	10,35	1,45	16,60	0,15	34,95	3,62	16,48	4,83	7,03	2,35
Family: Syntrophomonada		7,05	1,34	11,79	2,10	6,88	1,06	13,97	3,31	19,91	2,73	11,89	2,54	40,92	5,56	20,66	4,38	13,03	2,22
Order: Clostridiales		5,16	1,19	9,06	1,28	12,30	2,51	13,49	2,01	6,98	1,18	9,12	1,71	0,42	0,57	11,90	1,03	22,84	4,14
		5,81	0,78	**9,65**	1,25	**9,57**	1,33	**14,49**	1,55	**12,36**	2,13	**12,53**	1,64	**37,94**	3,48	**16,35**	2,45	**14,00**	2,71
Gam42a	-	0,74	0,45	1,30	1,09	1,54	0,26	15,65	1,49	2,55	0,44	0,71	0,17	4,68	0,53	1,26	0,22	1,82	0,72
Class: Gammaproteobact		0,53	0,39	1,74	0,75	1,50	0,28	6,36	0,79	3,51	1,15	3,26	0,44	2,58	0,55	0,33	0,12	0,44	0,14
		1,57	0,78	2,41	0,99	1,91	0,45	16,66	2,08	1,46	0,46	0,77	0,14	1,22	0,73	0,37	0,15	0,42	0,21
		0,96	0,36	**1,80**	0,56	**1,65**	0,20	**12,89**	1,82	**2,47**	0,51	**1,53**	0,42	**2,73**	0,62	**0,64**	0,18	**0,92**	0,34
Synbac824	-	0,00	-	0,00	-							0,06	0,02					1,87	0,90
Genus: Syntrophobacter		0,00	-	0,00	-							0,17	0,10					0,65	0,43
Class: Deltaproteobacteria		0,00	-	0,00	-							0,03	0,02					2,89	1,00
		0,00		**0,00**								**0,09**	0,04					**1,77**	0,54
Arc915																0,50	0,37	5,22	0,89
Archaea																0,36	0,22	3,12	2,14
																0,36	0,24		
																0,40	0,16	**4,43**	1,06

Tabelle 9-9: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R4, 10 °C, SRT = 8 d, R5, 10 °C, SRT = 4 d und R6, 10 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF

Spot	Protein Identifikation	*Proteinname*	Spezies (Taxonomie)	Mascot Score/ Peptid	Biologischer Prozess	Molekul. Funktion
R4, 10 °C, 8 d						
14, 15	gi|489231030	30S ribosomales Protein S2	*Lactococcus raffinolactis*	191/ 4	Translation	Ribonukleoprotein
	sp|A2RNV0|RS2_LACLM		*Lactococcus lactis*	180/ 4		
	sp|A8AZP1|RS2_STRGC		*Streptococcus gordonii*	102/ 1		
	gi|489226536		*Lactococcus garvieae*	128/ 1		
36	gi|493348292	S-layer Protein	*Centipeda periodontii*	88/ 1	Zellschutz, Formgebung	Hüllprotein
53	gi|494119809	*Flagellin*	*Clostridium carboxidivorans*	105/ 1	Bakterienbewegung	Flagellin
58	gi|489228932	Pyruvatkinase	*Lactococcus raffinolactis*	494/ 9	Glykolyse	Kinase, Transferase
	gi|288905191		*Streptococcus gallolyticus*	373/ 2		
81	sp|P11653|MUTB_PROFR	Methylmalonyl-CoA-Mutase, large subunit	*Propionibacterium freudenreichii*	237/ 4	Propionsäuregärung	Isomerase
83	gi|350270005	Acyl-CoA Dehydrogenase/protein FixB	*Oscillibacter valericigenes*	118/ 2	ß-Oxidation	Oxidoreduktase
	gi|492553603	Acyl-CoA Dehydrogenase	*Fusobacterium mortiferum*	117/ 1		
98, 99	gi|489875926	Phosphoglyceromutase	*Actinomyces naeslundii*	120/ 3	Glykolyse	Isomerase
104	sp|A6L3M9|ENO_BACV8	Enolase	*Bacteroides vulgatus*	212/ 4	Glykolyse	Lyase
	gi|490137026	Glutamatdehydrogenase	*Clostridium sp.*	229/ 3	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
	gi|496329545	Glutamatdehydrogenase	*Bacteroides sp.*	124/ 2	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
	gi|150005171	Phosphopyruvat-Hydratase	*Bacteroides vulgatus*	186/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese	Lyase
	gi|497699080	Protein RecA	*Lactobacillus coryniformis*	81/ 2	DNA-Zerstörung/ Rekombination/ Reparatur	ATP binding, ATPase, Einzelstrang-DNA-bindend

R5, 10 °C, 4 d						
1	sp|P80293|SODM_PROFR	Superoxid-Dismutase	*P. freudenreichii*	96/ 1	Superoxidmetabolismus	Oxidoreduktase
2	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	237/ 5	Aminosäurebiosynthese	Transferase
3	gi|297625352	Argininsuccinat-Synthase	*P. freudenreichii*	84/ 3	Aminosäurebiosynthese	Ligase
	gi|489228932	Pyruvatkinase	*Lactococcus raffinolactis*	108/ 2	Glykolyse	Kinase, Transferase
	gi|288905191	Pyruvatkinase	*Streptococcus gallolyticus*	110/ 2		
R6, 10 °C, 1 d						
2	sp|P80293|SODM_PROFR	Superoxid-Dismutase	*P. freudenreichii*	122/ 1	Superoxidmetabolismus	Oxidoreduktase
5	gi|124483855	Superoxid-Dismutase	*Lactococcus sp.*	135/ 4	Superoxidmetabolismus	Oxidoreduktase
6	gi|297626249	Cobalamin-Adenosyltransferase	*P. freudenreichii*	139/ 3	-	Transferase
9	gi|497992498	Eisen ABC transporter (ATP-binding)	*Kurthia sp.*	131/ 2	Transport	Hydrolase
10	gi|489231035	Glucose-1-phosphat- thymidylyltransferase	*Lactococcus raffinolactis*	209/ 4	Polysaccharidbiosynthese	Transferase
	sp|P95778|RMLA_STRMU		*Streptococcus mutans*	152/ 3		
13, 14	gi|297626703	hypothetisches Protein	*P. freudenreichii*	325/ 7	-	-
15	gi|489232029	Lactat-Dehydrogenase	*Lactococcus raffinolactis*	305/ 5	Glykolyse, Milchsäuregärung	Oxidoreduktase
17	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	425/ 8	Aminosäurebiosynthese	Transferase
	gi|489231030	30S ribosomales Protein S2	*Lactococcus raffinolactis*	98/ 3	Translation	Ribonukleoprotein
19	gi|163119468	Acetoinreduktase	*Bacillus licheniformis*	109/ 1	Acetoinkatabolismus	Oxidoreduktase
25	gi|297626465	L-Lactat-Dehydrogenase	*P. freudenreichii*	91/ 2	Glykolyse, Milchsäuregärung	Oxidoreduktase
	gi|76556237	Transaldolase 1		331/ 5	Pentosephosphatweg	Transferase
27	sp|A0ALL5|ATPA2_LISW6	ATP synthase, subunit α	*Listeria welshimeri*	110/ 2	ATP-Synthese, Transport	Hydrolase
30	gi|297625645	Glucose-6-phosphate-Isomerase	*P. freudenreichii*	104/ 2	Glykolyse	Isomerase
30, 31	gi|490381477	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase	*Lactococcus raffinolactis*	211/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese, TCA-Zyklus	Transferase
	gi|490382266	Acetolactat-Synthase		525/ 9	Aminosäurebiosynthese	Transferase

Datensuche mit MASCOT™ gegen die Datenbanken NCBInr und UniProt, Proteine mit Mascot-Scores > 50 und mit mindestens einem gefunden Peptid wurden als identifiziert angenommen

Tabelle 9-10: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R3, 20 °C, SRT = 8 d, R2, 20 °C, SRT = 4 d und R2, 20 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF

Spot	Protein Identifikation	*Proteinname*	Spezies (Taxonomie)	Mascot Score/ Peptide	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
R3, 20 °C, 8 d						
17, 40, 41	gi|496881139	Fruktosebisphosphat-Aldolase, Klasse II, partial	*Actinomyces sp.*	274/ 4	Glykolyse	Lyase
22, 47	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	91/ 1	-	-
24	gi|489880226	DNA-Einzelstrang-bindendes Protein	*Actinomyces naeslundii*	99/ 2	DNA-Replikation	Bindung von DNA-Einzelstrang
29	gi|496904654	Triosephosphat-Isomerase	*Actinomyces sp.*	82/ 2	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
33	gi|489875926	Phosphoglyceromutase	*Actinomyces naeslundii*	118/ 2	Glykolyse	Isomerase
42, 43, 44	gi|492830896 gi|489881427	Lactat-Dehydrogenase Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	*Actinomyces graevenitzii* *Actinomyces naeslundii*	183/ 2 421/ 8	Glykolyse, Milchsäuregärung Glykolyse	Oxidoreduktase
45	gi|489885837	Elongationsfaktor Tu	*Actinomyces viscosus*	227/ 4	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
46	gi|489881427	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	*Actinomyces naeslundii*	254/ 4	Glykolyse	Oxidoreduktase
48	gi|493731992	ATP-Synthase, subunit β	*Actinomyces turicensis*	137/ 3	ATP-Synthese, Transport	Hydrolase
51	gi|489877909 gi|336319528 sp|P94360|MSMX_BACSU	ABC Transporter, ATP-bindendes-Protein, partial Maltodextrin Import ATP-bindendes Protein	*Actinomyces naeslundii* *Cellvibrio sp.* *Bacillus subtilis*	130/ 3 105/ 1 85 /2	ATP Katabolismus, Transport (Zucker, Polysaccharide)	Hydrolase
52	gi|489881651	1,4-α-Glucan-verzweigendes Protein	*Actinomyces naeslundii*	88/ 1	Gykogenbiosynthese	Transferase

R2, 20 °C, 4 d						
1	gi|507094796	hypothetisches Protein	*Acinetobacter tandoii*	100/ 2	-	-
2, 21, 22	gi|15895969 gi|18311283	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum* *Clostridium perfringens*	97/ 1 118/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
4, 5	gi|491342301 sp|B0V6R7|MDH_ACIBY	Malat-Dehydrogenase	*Acinetobacter sp.*	546/ 6 474/ 5	TCA-Zyklus, Propionsäu-regärung	Oxidoreduktase
9	gi|493358010	NADP-spezif. Glutamat-Dehydrogenase	*Clostridiaceae bacterium*	104/ 2	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
10	gi|299771094	Isocitrat-Lyase	*Acinetobacter oleivorans*	268/ 6	Glyoxylsäure-Zyklus	Lyase
11	gi|352684123	Outer membrane Protein M1	*Acidaminococcus intestini*	85/ 1	-	-
12	gi|29347383	Glutamat-Dehydrogenase	*Bacteroides thetaiotaomicron*	160/ 3	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
14	gi|492830896 gi|489881427 gi|348027367	Lactat-Dehydrogenase Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Acyl-CoA-Dehydrogenase	*Actinomyces graevenitzii* *Actinomyces naeslundii* *Megasphaera elsdenii*	144/ 2 189/ 4 101/ 1	Glykolyse, Milchsäuregärung Glykolyse ß-Oxidation	Oxidoreduktase
15, 16, 17, 18	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	100/ 1	-	-
19	gi|496904654	Triosephosphat-Isomerase	*Actinomyces sp.*	215/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
22, 23	gi|404496805	Triosephosphat-Isomerase	*Geobacter metallireducens*	136/ 2	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
24	gi|495316860	Triosephosphat-Isomerase	*Reinekea blandensis* *Geobacter metallireducens*	133/ 2	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
28	gi|189485082	Elongationsfaktor G	*Nicht-kultiviertesTermiten Gruppe 1 Bakterium*	138/ 4	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
43	gi|297626657 gi|347522258 sp|Q5XA12|ALF_STRP6	ABC Transporter ATPase Fruktosebisphosphat-Aldolase	*P. freudenreichii* *Lactococcus garvieae* *Streptococcus pyogenes*	156/ 3 521/ 6 95/ 1	Transport Glykolyse	Hydrolase Lyase
R2, 20 °C, 1 d						
1, 2	gi|493639413	Methioninsulfoxid-Reduktase A	*Kineosphaera limosa*	286/ 6	Antwort auf oxidativen Stress, Protein-Reparatur	Oxidoreduktase
3	gi|489875926	Phosphoglyceromutase	*Actinomyces naeslundii*	141/ 4	Glykolyse	Isomerase

4	gi|15895969 gi|18311283	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum* *Clostridium perfringens*	86/ 1 101/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
5, 6	gi|489875815 gi|496004939	Transkriptionaler Regulator, Crp/Fnr-Familie	*Actinomyces naeslundii* *Actinomyces massiliensis*	188/ 3 281/ 4	Transkription	DNA-bindend
7	gi|15895969	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum*	86/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
9, 10, 11	gi|189485289	Fruktosebisphosphat-Aldolase	*Nicht-kultiviertesTermiten Gruppe 1 Bakterium*	210/ 4	Glykolyse	Lyase

Datensuche mit MASCOT™ gegen die Datenbanken NCBInr und UniProt, Proteine mit Mascot-Scores > 50 und mit mindestens einem gefunden Peptid wurden als identifiziert angenommen.

Tabelle 9-11: Identifikation und wahrscheinliche Funktion von Proteinen der Reaktoren R4, 10 °C, SRT = 8 d, R5, 10 °C, SRT = 4 d und R6, 10 °C, SRT = 1 d sowie R3, 20 °C, SRT = 8 d, R2, 20 °C, SRT = 4 d und R2, 20 °C, SRT = 1 d nach 2D-PAGE und Messung mit MALDI-TOF/TOF

Spot	Protein Identifikation	*Proteinname*	Spezies (Taxonomie)	Mascot Score/ Peptide	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
R3, 20 °C, 8 d						
17, 40, 41	gi|496881139	Fruktosebisphosphat-Aldolase, Klasse II, partial	*Actinomyces sp.*	274/ 4	Glykolyse	Lyase
22, 47	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	91/ 1	-	-
R4, 10 °C, 8 d						
13, 14, 15	gi|489231030 sp|A2RNV0|RS2_LACLM sp|A8AZP1|RS2_STRGC gi|489226536	30S ribosomales Protein S2	*Lactococcus raffinolactis* *Lactococcus lactis* *Streptococcus gordonii* *Lactococcus garvieae*	191/ 4 180/ 4 102/ 1 128/ 1	Translation	Ribonukleoprotein
16	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	121/ 2	Aminosäurebiosynthese	Transferase
20	gi|488411788	6-Phosphofructokinase	*Staphylococcus simulans*	82/ 2	Glykolyse	Kinase, Transferase

25	gi|490138279	Hypothetisches Protein	*Clostridium sp.*	118/ 2	-	-
28	gi|490478856	OmpA Familien-Protein	*Prevotella buccalis*	205/ 3	-	Zellmembran
36	gi|493348292	S-Layer Protein	*Centipeda periodontii*	88/ 1	Zellschutz, Formgebung	Hüllprotein
44	gi|490137026	Glutamat-Dehydrogenase (NADP+)	*Clostridium sp.* *Neisseria sp.*	271/ 5 118/ 1	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
45	gi|496329545	Glutamat-Dehydrogenase	*Bacteroides sp.*	310/ 5	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
51	gi|336319528 sp|P94360|MSMX_BACSU gi|489885477	Zucker ABC Transporter ATP-bindendes Protein	*Cellvibrio gilvus* *Bacillus subtilis* *Actinomyces viscosus*	195/ 2 122/ 2 264/ 5	Transport	Hydrolase
52, 53, 54	gi|494119809	Flagellin	*Clostridium carboxidivorans*	105/ 1	Bakterienbewegung	Flagellin
55	gi|31615813 sp|Q8GBW6|12S_PROFR gi|220904816	Transcarboxylase 12S Subunit, Chain A Methylmalonyl-CoA Carboxyl-Transferase, 5S Subunit Chaperon GroEL	*P. freudenreichii* *Desulfovibrio desulfuricans*	182/ 3 146/ 3 213/ 2	Propionsäuregärung Stressantwort	Transferase Chaperon
56, 57	gi|55669666 sp|Q70AC7|5S_PROFR	Transcarboxylase 5S Subunit, Chain A Methylmalonyl-CoA Carboxyl-transferase, 5S Subunit	*Propionibacterium Shermanii* *P. freudenreichii*	267/ 7 282/ 7	Propionsäuregärung	Transferase
58, 59, 60, 61	gi|489228932 gi|288905191	Pyruvatkinase	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus gallolyticus*	494/ 9 373/ 2	Glykolyse	Kinase, Transfera-se
62	sp|A0ALL5|ATPA2_LISW6	ATP-Synthase, Subunit α 2				
62, 63, 64	gi|489228724 sp|A4VTQ7|EFTU_STRSY	Elongationsfaktor Tu	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus suis*	501/ 8 398/ 6	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
64	gi|489230748	30S ribosomales Protein S1	*Lactococcus raffinolactis*	159/ 2	Translation	Ribonukleoprotein
65, 66	gi|489231880 sp|A2RIX1|ENO_LACLM sp|A3CMA7|ENO_STRSV	Enolase	*Lactococcus raffinolactis* *Lactococcus lacti* *Streptococcus sp.*	1176/ 17 409/ 6 376/ 3	Glykolyse	Lyase
68, 69	sp|P11652|MUTA_PROFR	Methylmalonyl-CoA-Mutase, small subunit	*P. freudenreichii*	99/ 2	Propionsäuregärung	Isomerase
81	sp|P11653|MUTB_PROFR	Methylmalonyl-CoA-Mutase, large subunit	*P. freudenreichii*	237/ 4	Propionsäuregärung	Isomerase

82	sp|A0ALY8|EFTU_LISW6 gi|6572543	Elongationsfaktor Tu	*Listeria welshimeri* *Enterococcus avium*	97/ 1 97/ 1	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
83	gi|350270005 gi|492553603	Acyl-CoA Dehydrogenase/protein FixB Acyl-CoA Dehydrogenase	*Oscillibacter valericigenes* *Fusobacterium mortiferum*	118/ 2 117/ 1	ß-Oxidation	Oxidoreduktase
91	gi|489235845 sp|B3WE64|K6PF_LACCB	6-Phosphofructokinase	*Gemella haemolysans* *Lactobacillus casei*	98/ 2 97/ 2	Glykolyse	Kinase, Transferase
273	gi|489231794	50S ribosomales Protein L10	*Lactococcus raffinolactis*	368/ 6	Ribosombiogenese, Translation	Ribonucleoprotein
684	gi|489229091 sp|B9DVS0|PGK_STRU0 sp|Q9CIW1|PGK_LACLA	Phosphoglyceratkinase	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus uberis* *Lactococcus lactis*	430/ 7 145/ 2 234/ 4	Glykolyse	Kinase, Transferase
R2, 20 °C, 4 d						
2, 21, 22	gi|15895969 gi|18311283	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum* *Clostridium perfringens*	97/ 1 118/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
4, 5	gi|491342301 sp|B0V6R7|MDH_ACIBY	Malat-Dehydrogenase	*Acinetobacter sp.*	546/ 6 474/ 5	TCA-Zyklus, Propionsäuregärung	Oxidoreduktase
7	gi|455738705	Outer membrane protein C Precursor	*Morganella morganii*	468/ 8	Transport	Porin-Protein
9	gi|493358010	NADP-spezif. Glutamat-Dehydrogenase	*Clostridiaceae bacterium*	104/ 2	Aminosäurebiosynthese	Oxidoreduktase
10	gi|299771094	Isocitrat-Lyase	*Acinetobacter oleivorans*	268/ 6	Glyoxylsäure-Zyklus	Lyase
11	gi|352684123	Outer membrane Protein M1	*Acidaminococcus intestini*	85/ 1	-	-
12	gi|29347383	Glutamat-Dehydrogenase	*Bacteroides thetaiotaomicron*	160/ 3	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
13	gi|489881427	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	*Actinomyces naeslundii*	322/ 6	Glykolyse	Oxidoreductase
	gi|118444538 gi|348027367	Acyl-CoA-Dehydrogenase	*Clostridium novyi* *Megasphaera elsdenii*	82/ 1 101/ 1	ß-Oxidation	
15, 16, 18	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	100/ 1	-	-
19	gi|496904654	Triosephosphat-Isomerase	*Actinomyces sp.*	215/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
22, 23	gi|404496805	Triosephosphat-Isomerase	*Geobacter metallireducens*	136/ 2	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase
24	gi|495316860	Triosephosphat-Isomerase	*Reinekea blandensis* *Geobacter metallireducens*	133/ 2	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	Isomerase

R5, 10 °C, 4 d						
2	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	237/ 5	Aminosäurebiosynthese	Transferase
3	gi|297625352	Argininsuccinat-Synthase	*P. freudenreichii*	84/ 3	Aminosäurebiosynthese	Ligase
	gi|489228932	Pyruvatkinase	*Lactococcus raffinolactis*	108/ 2	Glykolyse	Kinase, Transfera-
	gi|288905191	Pyruvatkinase	*Streptococcus gallolyticus*	110/ 2		se
4, 7	gi|15826384	Methylmalonyl-CoA Epimerase, Chain A	*P. freudenreichii*	195/ 4	Fettsäureabbau	Isomerase
5, 6	gi|489231794	50S ribosomales Protein L10	*Lactococcus raffinolactis*	368/ 6	Ribosombiogenese, Translati-	Ribonucleoprotein
					on	
7	gi|383754928	vermeintl. Rubperoxin	*Selenomonas ruminantium*	105/ 3	Transport	Eisenion-bindend, Oxidoreduktase
8, 9, 10	gi|489230597	Phosphoglycerat-Mutase	*Lactococcus raffinolacti*	373/ 6	Glykolyse	Isomerase
	sp|A2RI67|GPMA_LACLM	2,3-bisphosphoglycerat-dependent Phosphoglycerat-Mutase	*Lactococcus lactis*	270/ 4		
12	gi|350269165	hypothetisches Protein OBV_07690	*Oscillibacter valericigenes*	96/ 3	-	-
	gi|15895969	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum*	87/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
13	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	400/ 6	Aminosäurebiosynthese	Transferase
	gi|297627384	Aldose 1-Epimerase	*P. freudenreichii*	240/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese	Isomerase
	gi|489229130	Peptid ABC Transporter ATP-bindendes Protein	*Lactococcus raffinolactis*	98/ 2	Transport	Hydrolase
14, 15	gi|491798679	6-Phosphofructokinase	*Granulicatella adiacens*	96/ 3	Glykolyse	Kinase, Transfer-
	sp|B3WE64|K6PF_LACCB		*Lactobacillus casei*	89/ 3		ase
16	gi|493348292	S-Layer Protein	*Centipeda periodontii*	116/ 1	Zellschutz, Formgebung	Hüllprotein
19	gi|490137026	Glutamat-Dehydrogenase	*Clostridium sp.*	334/ 5	Aminosäuremetabolismus	Oxidoreduktase
	gi|251782235		*Streptococcus dysgalactiae*	208/ 2		
19, 21, 23	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	111/ 1	-	-
28	sp|Q8GBW6|12S_PROFR	Methylmalonyl-CoA- carboxyltransfer- ase 12S Subunit	*P. freudenreichii*	333/ 6	Propionsäuregärung	Transferase
	gi|31615813	Transcarboxylase 12s Subunit, Chain A		311/ 5		
29, 30, 31	gi|297627036	Methylmalonyl-CoA- carboxyltransfer- ase 5S Subunit	*P. freudenreichii*	288/ 6	Propionsäuregärung	Transferase
30	gi|55669666	Transcarboxylase 5S Subunit	*P. freudenreichii*	398/ 8	Propionsäuregärung	Transferase

32, 34	gi|489228932 gi|374337862	Pyruvatkinase	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus sp.*	533/ 10 341/ 1		
35	gi|489228724 sp|A4VTQ7|EFTU_STRSY	Elongationsfaktor Tu	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus sp.*	412/ 6 328/ 5	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
	sp|A3CM14|ATPB_STRSV	ATP-Synthase, Subunit β	*Streptococcus sanguinis*	103/ 2	ATP-Synthese, Transport	Hydrolase
36	gi|489231880 sp|A3CMA7|ENO_STRSV	Enolase	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus sanguinis*	1141/ 17 385/ 6	Glykolyse	Lyase
38	gi|127549	Methylmalonyl-CoA-Mutase, small subunit	*P. freudenreichii*	510/ 7	Propionsäuregärung	Isomerase
39, 40, 41	gi|297626675 gi|297570041	Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydro-genase	*P. freudenreichii* *Desulfurivibrio alkaliphilus*	645/ 11 168/ 1	Glykolyse	Oxidoreduktase
43	gi|489229091 sp|Q9CIW1|PGK_LACLA sp|B9DVS0|PGK_STRU0	Phosphoglycerat-Kinase	*Lactococcus raffinolactis* *Lactococcus lactis* *Streptococcus uberis*	371/ 6 190/ 4 122/ 2	Glykolyse	Kinase, Transfera-se
	gi|493647720	β-Lactamase	*Pseudoramibacter alactolyti-cus*	99/ 2	Antibiotika-Resistenz	Hydrolase
44	gi|297625775	Elongationsfaktor Tu	*P. freudenreichii*	243/ 3	Proteinbiosynthese	Elongationsfaktor
45	gi|297627075	Glutamat-1-semialdehyd 2,1-aminomutase	*P. freudenreichii*	203/ 4	Porphyrinbiosynthese	Isomerase, Trans-ferase
46	gi|494119809	Flagellin	*Clostridium carboxidivorans*	88/ 1	Bakterienbewegung	Flagellin
47	gi|297625524 gi|489231702 sp|P0C0H6|IMDH_STRPY	Coenzym A Transferase Inosin 5'-monophosphat-Dehydrogenase	*P. freudenreichii* *Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus pyogenes*	221/ 4 134/ 2 88/ 1	Acetyl-CoA-Stoffwechsel Purinbiosynthese	Transferase Oxidoreduktase
49	gi|219880961 sp|P0C0G6|G3P_STRPY gi|489232229 gi|15674228	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	*Lactococcus garvieae* *Streptococcus pyogenes* *Lactococcus raffinolactis* *Lactococcus lactis*	231/ 6 113/ 3 155/ 1 193/ 1	Glykolyse	Oxidoreduktase
R2, 20 °C, 1 d						
3	gi|489875926	Phosphoglyceromutase	*Actinomyces naeslundii*	141/ 4	Glykolyse	Isomerase
4	gi|15895969 gi|18311283	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	*Clostridium acetobutylicum* *Clostridium perfringens*	86/ 1 101/ 1	Butyratmetabolismus	Lyase
5	gi|489875815	Transkriptionaler Regulator, Crp/Fnr-Familie	*Actinomyces naeslundii*	188/ 3	Transkription	DNA-bindendes Protein

9, 12	gi|189485289	Fruktosebisphosphat-Aldolase	*Nicht-kultiviertesTermiten Gruppe 1 Bakterium*	210/ 4	Glykolyse	Lyase
R6, 10 °C, 1 d						
2, 33	sp|P80293|SODM_PROFR	Superoxid-Dismutase	*P. freudenreichii*	122/ 1	Superoxidmetabolismus	Oxidoreduktase
3, 4, 5	gi|124483855	Superoxid-Dismutase	*Lactococcus sp.*	135/ 4	Superoxidmetabolismus	Oxidoreduktase
6	gi|297626249	Cobalamin-Adenosyltransferase	*P. freudenreichii*	139/ 3	-	Transferase
7, 36	gi|489230597	Phosphoglycerat-Mutase	*Lactococcus raffinolactis*	282/ 4	Glykolyse	Isomerase
9	gi|497992498	Eisen ABC Transporter (ATP-binding)	*Kurthia sp.*	131/ 2	Transport	Hydrolase
10	gi|489231035 sp|P95778|RMLA_STRMU	Glucose-1-phosphat- thymidylyltrans-ferase	*Lactococcus raffinolactis* *Streptococcus mutans*	209/ 4 152/ 3	Polysaccharidbiosynthese	Transferase
11, 43 44	gi|297626657 gi|347522258	ABC Transporter ATPase Fruktosebisphosphat-Aldolase	*P. freudenreichii* *Lactococcus garvieae*	225/ 4 340/ 7	Transport Glykolyse	Hydrolase Lyase
17	gi|297626804 gi|489231030	Cystein-Synthase 30S ribosomales Protein S2	*P. freudenreichii* *Lactococcus raffinolactis*	425/ 8 98/ 3	Aminosäurebiosynthese Translation	Transferase Ribonukleoprotein
20	gi|297627014 gi|496353367	Oxidoreductase Allophanat-Hydrolase	*P. freudenreichii* *Clostridium sp.*	284/ 3 93/ 2	- Proteinfaltung	Oxidoreduktase Hydrolase
21	gi|297626592	Succinat-Dehydrogenase	*P. freudenreichii*	166/ 3	TCA-Zyklus	Oxidoreduktase
24	sp|B9DVS0|PGK_STRU0 gi|489229091	Phosphoglycerat-Kinase	*Streptococcus sp.* *Lactococcus sp.*	145/ 2 430/ 7	Glykolyse	Kinase, Transfera-se
27	gi|2662324 sp|A0ALL5|ATPA2_LISW6	Proton-translocating ATPase alpha subunit ATP-Synthase, subunit α	*Streptococcus equinus* *Listeria welshimeri*	110/ 2 110/ 2	Transport ATP-Synthese, Transport	Hydrolase
28	gi|297626793	Aspartat-Ammonium-Lyase	*P. freudenreichii*	434/ 9	Aminosäuremetabolismus, TCA-Zyklus	Lyase
32	gi|410867845 gi|489232147	Fumarat-Hydratase, Klasse II Aspartyl/Glutamyl-tRNA Amidotrans-ferase, subunit A	*Propionibacterium aci-dipropionici* *Lactococcus raffinolactis*	106/ 2 170/ 3	Fumaratmetabolismus, TCA-Zyklus Proteinbiosynthese	Lyase Ligase, Transferase
35	gi|15672318	Phosphoglyceromutase	*Lactococcus lactis*	185/ 2	Glykolyse	Isomerase
35, 36	sp|A2RI67|GPMA_LACLM	2,3-Bisphosphoglycerat-dependent Phosphoglycerat-Mutase	*Lactococcus lactis*	211/ 3	Glykolyse	Isomerase
35, 36, 37	gi|489230597	Phosphoglyceromutase	*Lactococcus raffinolactis*	282/ 4	Glykolyse	Isomerase

39	gi|29376891	ABC Transporter ATP-binding Protein	*Enterococcus faecalis*	108/ 2	Transport	Isomerase
	gi|489231191	Triosephosphat-isomerase	*Lactococcus raffinolactis*	118/ 3	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	
41	gi|297627012	hypothetisches Protein	*P. freudenreichii*	305/ 6	-	-
42	gi|297626289	Dolichyl-phosphat beta-D-mannosyltransferase	*P. freudenreichii*	104/ 2	N-Glycanbiosynthese	Transferase
	gi|347522258	Fruktosebisphosphat-Aldolase	*Lactococcus garvieae*	297/ 5	Glykolyse	Lyase
46, 47	gi|76556199	vermeintl. Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	*P. freudenreichii*	723/ 12	Glykolyse	Oxidoreduktase
48	gi|297626804	Cystein-Synthase	*P. freudenreichii*	446/ 6	Aminosäurebiosynthese	Transferase
49, 50	gi|491798679	6-Phosphofructokinase	*Granulicatella adiacens*	118/ 3	Glykolyse	Kinase, Transferase
50	gi|489228929	6-Phosphofructokinase	*Lactococcus raffinolactis*	108/ 2	Glykolyse	Kinase, Transferase
	sp|B3WE64|K6PF_LACCB		*Lactobacillus casei*	112/ 2		
52	gi|348026725	Outer membrane insertion signal	*Megasphaera elsdenii*	100/ 1	-	-
	gi|489228878	Serin-Hydroxymethyltransferase	*Lactococcus raffinolactis*	98/ 1	Aminosäure Biosynthese, 1-Kohlenstoffmetabolismus	Transferase
53, 54	gi|297626790	Fumarat-Hydratase, Klasse II	*P. freudenreichii*	353/ 6	Fumaratmetabolismus, TCA-Zyklus	Lyase
57	gi|374337862	Pyruvatkinase	*Streptococcus macedonicus*	367/ 2	Glykolyse	Kinase, Transferase
	gi|489228932		*Lactococcus raffinolactis*	464/ 8		
58	sp|Q8DTS9|ENO_STRMU	Enolase	*Streptococcus mutans*	428/ 8	Glykolyse	Lyase
	gi|493741525	Membranprotein	*Selenomonas flueggei*	84/ 1	-	-
59	gi|297626774	Protein mrp (ATP-binding Protein)	*P. freudenreichii*	95/ 2	-	ATP-bindend
58, 59, 60	gi|489231880	Enolase	*Lactococcus raffinolactis*	1352/ 21	Glykolyse	Lyase
	sp|A3CMA7|ENO_STRSV		*Streptococcus sanguinis*	185/ 2		
61	gi|489230104	Zellteilungsprotein FtsZ	*Lactococcus raffinolactis*	220/ 4	Zellzyklus, Zellteilung	Hydrolase

Datensuche mit MASCOT™ gegen die Datenbanken NCBInr und UniProt, Proteine mit Mascot-Scores > 50 und mit mindestens einem gefunden Peptid wurden als identifiziert angenommen.