

Mikrobiologische Charakterisierung eines Anaerobreaktors zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe

vorgelegt von
Diplom Biologe
Wolfgang Wenzel

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften –
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ing. M. Kraume
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. U. Szewzyk
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. U. Göbel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. April 2002

Berlin 2002

D 83

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Untersuchung mikrobiologischer Systeme | 2 |
| 1.2 | Mikrobiologische Grundlagen der anaeroben Abwasserreinigung | 5 |
| 1.2.1. | Anaerobe Atmungen | 6 |
| 1.2.2. | Gärungen | 9 |
| 1.3 | Theorie der anaeroben Abwasserreinigung | 11 |
| 1.4 | Ziele der Arbeit | 13 |
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1 | Verwendete Chemikalien, Gase und Oligonukleotide | 14 |
| 2.2 | Untersuchtes System | 14 |
| 2.2.1. | Aufbau der Reaktoranlage | 14 |
| 2.2.2. | Abwasserbeschaffenheit | 16 |
| 2.3 | Mikroskopische Untersuchungen | 17 |
| 2.4 | Kultivierung | 18 |
| 2.4.1. | Anaerobmedium | 18 |
| | Mineralmedium-Stammlösung | 18 |
| | Selenit-Wolframat-Lösung | 19 |
| | Spurenelementlösung SL9 | 19 |
| | Resazurinlösung | 19 |
| | Vitaminlösungen | 20 |
| | Natriumhydrogencarbonatpuffer | 20 |
| | Reduktionsmittel | 20 |
| | Ansetzen des Anaerobmediums | 21 |
| 2.4.2. | Kultivierung in Tiefagarröhrchen | 21 |
| 2.4.3. | Kultivierung in Flüssigkultur | 22 |
| 2.5 | Zellzahlbestimmung | 22 |
| 2.5.1. | Bestimmung der Gesamtzellzahl | 22 |
| 2.5.2. | Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen | 23 |
| 2.6 | Isolierung der Organismen | 25 |
| 2.7 | Molekularbiologische Methoden | 25 |
| 2.7.1. | In situ Hybridisierung | 25 |
| | Fixieren der Zellen | 26 |
| | Hybridisierung | 26 |
| 2.7.2. | Phylogenetische Einordnung der Isolate über die 16S rDNA Sequenzdaten | 27 |
| | Zellaufschluss und DNA-Isolierung | 28 |
| | DNA-Quantifizierung | 28 |

| | |
|---|----|
| Amplifikation der 16S rDNA | 29 |
| Kontrolle der PCR-Produkte | 29 |
| Cyclesequencing | 30 |
| Sequenzierung der 16S rDNA | 31 |
| Phylogenetische Einordnung der Isolate | 31 |
| 2.8 Populationsbiologische Untersuchungen | 32 |
| 2.9 Physiologische Untersuchungen | 33 |
| 3 Ergebnisse | 35 |
| 3.1 Mikroskopische Untersuchungen | 35 |
| 3.2 Fluoreszenz gekoppelte in situ Hybridisierung (FISH) | 37 |
| 3.2.1. Allgemeine Hybridisierbarkeit | 37 |
| 3.2.2. Gram positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt | 40 |
| 3.2.3. Gram Positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt | 41 |
| 3.2.4. <i>Cytophaga Flavobacteria Bacteroides</i> Gruppe | 41 |
| 3.2.5. <i>Proteobacteria</i> | 42 |
| 3.2.6. Archaeen | 43 |
| 3.3 Most Probable Number (MPN)-Untersuchungen | 45 |
| 3.3.1. Bestimmung der Zahl kultivierbarer Zellen | 45 |
| 3.3.2. Bestimmung der Zahl kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien | 47 |
| 3.3.3. Bestimmung der Zahl kultivierbarer homoacetogener Bakterien | 48 |
| 3.4 Bestimmung der Zahl physiologisch aktiver methanogener Archaeen | 48 |
| 3.5 Isolierung | 49 |
| 3.5.1. <i>Clostridiales</i> | 51 |
| 3.5.2. <i>Bacteroides</i> | 58 |
| 3.5.3. <i>Lactobacillus</i> | 60 |
| 3.5.4. <i>Propionibacterium</i> | 60 |
| 3.5.5. <i>Proteobacteria</i> | 62 |
| 3.5.6. <i>Paenibacillus</i> | 63 |
| 3.5.7. <i>Aminobacterium</i> | 64 |
| 3.5.8. <i>Staphylococcus</i> | 65 |
| 3.5.9. <i>Bifidobacterium</i> | 65 |
| 3.6 Abschätzung der Artenzahl (S) | 66 |
| 3.7 Physiologische Charakterisierung der Isolate | 69 |
| 3.8 Evaluierung mikrobiologischer Parameter für einen Einsatz bei der Reaktorsteuerung | 71 |
| 3.9 Einsatz mikrobiologischer Verfahren bei der Reaktorsteuerung | 76 |
| 3.10 Gezielte Beeinflussung der Bakterienpopulation in der Anfahrphase | 76 |
| 3.11 Reinstallation einer physiologischen Gruppe | 78 |
| 4 Diskussion | 80 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.1 | Bewertung der eingesetzten Methoden zur Beschreibung des Reaktors | 80 |
| 4.1.1. | Beschreibung der Biozönose mit lichtmikroskopische Methoden | 80 |
| 4.1.2. | Einsatz der fluoreszenzgekoppelten in situ Hybridisierung für die Beschreibung der Biozönose | 83 |
| 4.1.3. | MPN-Untersuchungen und Kultivierung | 86 |
| 4.1.4. | Populationsbiologische Abschätzungen | 93 |
| 4.2 | Ökologische Bewertung des Reaktors | 96 |
| 4.2.1. | Taxonomische und funktionale Einordnung der Isolate | 96 |
| | <i>Clostridium</i> | 96 |
| | <i>Ruminococcus</i> | 98 |
| | <i>Eubacterium</i> | 99 |
| | <i>Bacteroides</i> | 100 |
| | <i>Lactobacillus</i> | 100 |
| | <i>Propionibacterium</i> | 101 |
| | <i>Acetobacterium</i> | 101 |
| | <i>Paenibacillus</i> | 102 |
| | <i>Desulfovibrio</i> | 102 |
| | <i>Sphingomonas</i> | 102 |
| | <i>Sporobacterium</i> | 103 |
| | <i>Staphylococcus</i> | 103 |
| | <i>Bifidobacterium</i> | 104 |
| | <i>Aminobacterium</i> | 104 |
| | <i>Acidaminococcus</i> | 104 |
| 4.2.2. | Abschätzung der Stoffflüsse im Reaktor | 104 |
| | Hydrolyse | 105 |
| | Acidogenese | 106 |
| | Acetogenese | 108 |
| | Methanogenese | 112 |
| 4.3 | Einsatz mikrobiologischer Parameter für die Steuerung anaerober Reaktoren | 113 |
| 4.4 | Ausblick | 117 |
| 5 | Literatur | 119 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| A | Adenin |
| ARDRA | Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis |
| BSB ₅ | Biologischer Sauerstoffbedarf |
| CFB | Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides |
| C | Cytosin |
| CSB | Chemischer Sauerstoffbedarf |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid |
| DGGE | Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese |
| DNA | Desoxyribonucleic Acid |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung |
| G | Guanin |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| MPN | Most Probable Number |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| RCM | Reinforced Clostridial Medium (Difco®) |
| RDNA | Ribosomale DNA |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SRB | sulfatreduzierende Bakterien |
| T | Thymin |
| TGGE | Temperatur Gradienten Gelelektrophorese |
| TMB | Trimethoxybenzoat |
| TRFLP | Terminaler Restriktions Fragment Polymorphismus |
| Y | Pyrimidin |

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde ein zweistufiger Anaerobreaktor zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe mikrobiologisch charakterisiert. Es wurden unterschiedliche Verfahren zur Beschreibung der mikrobiellen Reaktorbiozönose eingesetzt, da einzelne Methoden in ihrer Aussagekraft limitiert sind.

Durch Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (FISH) wurde die räumliche Verteilung verschiedener phylogenetischer Gruppen im Reaktor untersucht. Bis zu 70 % der mit DAPI nachweisbaren Gesamtzellzahl ließen sich mit der in situ Hybridisierung erfassen und durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotidsonden konnte die räumliche Verteilung verschiedener phylogenetischer Gruppen im Reaktor untersucht werden.

Most Probable Number (MPN) Experimente wurden zur Abschätzung der Kultivierungseffizienz beim Einsatz unterschiedlicher Substrate sowie zur Untersuchung des Auftretens und der Verteilung physiologischer Gruppen im Reaktor eingesetzt. Mehr als 10 % der mit DAPI nachweisbaren Zellen ließen sich mit Melasseschlempe als Substrat kultivieren. Durch den Einsatz spezifischer Substrate und Elektronenakzeptoren für sulfatreduzierende Bakterien, homoacetogene Bakterien und methanogene Archeen konnten deutliche Profile in der Verteilung dieser physiologischen Gruppen im Reaktor nachgewiesen werden.

Die MPN-Experimente dienten als Ausgangspunkt für die Isolierung von Reinkulturen. Insgesamt wurden 182 Stämme isoliert, die über die Analyse der 16S rDNA 58 Arten aus 18 verschiedenen Gattungen zugeordnet werden konnten. Dominierend waren Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* und *Bacteroides*. Aus anderen Gattungen wurden jeweils nur wenige Arten isoliert.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Einordnung der Isolate wurde für die Abschätzung der Artenzahl (S) im Reaktor genutzt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Verfahren zur Abschätzung dieses Diversitätsindex konnte gezeigt werden, dass zwischen 30 % und 70 % der mit den eingesetzten Methoden kultivierbaren Arten isoliert wurden und damit ein erheblicher Teil der mikrobiellen Population mit kultivierungsbasierenden Methoden erfasst werden konnte.

Die taxonomische Einordnung der Isolate ermöglichte eine erste funktionale Einordnung anhand der physiologischen Kapazitäten der nächsten Verwandten des

Isolats. Physiologische Experimente an ausgewählten Reinkulturen erlaubten die qualitative Abschätzung der Stoffflüsse im Reaktor.

Verschiedene Experimente wurden direkt am untersuchten Reaktor durchgeführt. Anhand verschiedener Fallbeispiele wurden die Möglichkeiten zum Einsatz mikrobiologischer Parameter in der Prozesssteuerung dargelegt. Dabei zeigte sich, dass besonders in kritischen Phasen des Reaktorbetriebs (z.B. Inbetriebnahme des Reaktors) die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen nützliche Informationen liefern, die für die Prozesssteuerung herangezogen werden können.

Summary

In the present work microbiological aspects of the anaerobic treatment of molasses wastewater were studied. Different methods for the phylogenetic and physiologic description of the microbial biocoenosis within the reactor were applied. The spatial distribution of different phylogenetic groups of microorganisms was measured by fluorescent in situ hybridisation (FISH). Up to 70 % of the total cell count (DAPI) could be covered by in situ hybridisation and the spatial distribution of different phylogenetic groups in the reactor could be investigated by the use of specific oligonucleotides.

Most probable number experiments (MPN-experiments) with selective substrates were used to estimate the cultivation efficiency of selected substrates and for the measurement of the distribution and abundance of different physiological groups within the reactor. More than 10 % of the total cellcount could be cultivated with molasses wastewater as substrate. The use of specific substrates for sulphate reducing bacteria, homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea showed distinct profiles over the reactor length.

MPN-experiments were also used for the isolation of pure cultures. 182 strains were isolated, which could be affiliated to 58 different species from 18 genera by sequencing of the 16S rDNA-gene. Members of the genera *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* and *Bacteroides* were dominating. Representatives of other genera could be isolated less frequently.

The results of the phylogenetic affiliation of the isolated strains were used for the estimation of the species richness (S). Different methods for the measurement of this microbial diversity index were applied. Depending on the estimations used a fraction of 30 – 70 % of all species that could be cultured by the applied isolation methods were actually isolated, indicating that the major part of the microbial population could be covered by cultivation based methods.

The taxonomical affiliation of the isolates allowed a first functional grouping according to physiologic capacities of the closest relatives. This preliminary functional grouping was specified by physiological experiments on selected pure cultures and allowed an qualitative estimation of fluxes within the reactor.

Microbiological results could finally be used as parameters in process control. Especially during critical phases (e.g. during startup of the reactor) microbiological experiments provided useful information that were successfully integrated into process control.

1 Einleitung

Der Mensch bedient sich seit jeher der natürlichen Diversität und Effizienz von Mikroorganismen (Dijkhuizen und Harder 1991). Die Reinigung von Abwasser ist der wohl am weitesten verbreitete technische Einsatz von Mikroorganismen. Während bei der Reinigung kommunaler Abwässer überwiegend aerobe Verfahren eingesetzt werden, kommt es bei der Reinigung von industriellen und landwirtschaftlichen Abwässern häufig zum Einsatz anaerober Verfahren. Gegenüber der aeroben Abwasserbehandlung weisen anaerobe Behandlungsverfahren verschiedene Vorteile auf, die direkt auf die mikrobiologischen Prozesse in diesen Anlagen zurückzuführen sind. So entfällt bei anaeroben Anlagen die Notwendigkeit, eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Während in aeroben Anlagen durch Belüftung gewährleistet sein muss, dass allen Organismen Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor in ausreichender Menge zur Verfügung steht, ist dieser Punkt in anaeroben Anlagen irrelevant. Da im anaeroben Stoffwechsel Sauerstoff nicht als terminaler Elektronenakzeptor genutzt wird, ist die Energieausbeute, die beim Abbau des Substrats anfällt, deutlich geringer als bei aeroben Prozessen. Aus diesem Grund wachsen die Organismen langsam und daher fällt bei der anaeroben Abwasserreinigung deutlich weniger Biomasse an, die als Überschussschlamm kostenintensiv entsorgt werden muss. Darüber hinaus besteht bei anaeroben Anlagen die Möglichkeit, das entstehende Biogas für die Energiegewinnung zu nutzen und dadurch die Betriebskosten zu senken. Diese Faktoren machen die anaerobe Behandlung von Abwässern gerade bei hohen Schadstofffrachten zu einer wirtschaftlich interessanten Alternative zur aeroben Abwasserbehandlung.

Durch die vergleichsweise geringe Energieausbeute beim anaeroben Abbau und die daraus resultierenden geringen Wachstumsraten anaerober Bakterien entstehen aber auch Probleme für die Planung und den Betrieb anaerober Reaktoren zur Behandlung von Abwässern. So kann sich die Anfahrzeit bei anaeroben Reaktoren durchaus über einen Zeitraum von drei Monaten erstrecken (Bello-Mendoza und Castillo-Rivera 1998). Diese langen Adaptionszeiten können auch während des Betriebs, zum Beispiel bei Veränderungen der Abwasserzusammensetzung Probleme verursachen und zu unbefriedigenden Abbauleistungen führen. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren versucht Reaktoren zu entwickeln, die gleichzeitig hohe Abbauleistungen und eine hohe Prozessstabilität aufweisen.

Da die Effizienz biologischer Anlagen zur Abwasserbehandlung ausschließlich von der Aktivität der mikrobiellen Biozönose abhängt, ist es sinnvoll, die ingenieurwissenschaftlichen Forschungen durch mikrobiologische Untersuchungen zu ergänzen und zu versuchen, die Ergebnisse mikrobiologischer Experimente in die Steuerung und Optimierung von Anlagen zur Reinigung von Abwässern zu integrieren. Die Einbeziehung mikrobiologischer Parameter in die verfahrenstechnische Steuerung setzt aber voraus, dass die relevanten Organismen der mikrobiellen Biozönose in diesen Anlagen bekannt sind und die Stoffwechselprozesse, die in Anaerobreaktoren ablaufen, gemessen werden können. Die Tatsache, dass aus Abwasseranlagen regelmäßig bisher unbekannte Organismen isoliert werden können, zeigt, dass die mikrobielle Diversität in diesen Anlagen nach wie vor nicht vollständig erfasst ist.

Die mikrobiologischen Grundlagen zur Erklärung der Prozesse beim Abbau organischer Substanzen in Abwasseranlagen oder Kenntnisse über die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönosen in diesen Systemen sind häufig bekannt und exemplarisch an Reinkulturen untersucht, aber das Auftreten und Verhalten der Bakterien in situ ist weitgehend ungeklärt. Die Ursache für diese fehlenden Kenntnisse liegt in den Beschränkungen der Methoden zur Untersuchung natürlicher mikrobiologischer Biozönosen.

1.1 Untersuchung mikrobiologischer Systeme

Die Untersuchung mikrobiologischer Systeme kann mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen. Alle bisher eingesetzten Methoden haben aber ihre Limitierungen, die verhindern, dass ein umfassendes und tiefgehendes Verständnis der mikrobiologischen Prozesse gewonnen werden kann.

Bakterien besitzen keine ausreichende morphologische Diversität, um sie anhand äußerer Merkmale sicher zu unterscheiden. Zur ihrer Charakterisierung müssen andere Merkmale, wie zum Beispiel die Physiologie der Organismen, herangezogen werden. Physiologische Untersuchungen setzen aber eine Kultivierung der Organismen und die Isolierung der Reinkulturen voraus. In vielen Fällen lässt sich nur ein Bruchteil der vorhandenen Organismen aus einem Habitat mit Standardmethoden kultivieren (Amann und Schleifer 1995). Das Isolieren von Bakterien aus natürlichen Habitaten ist nicht trivial. Für eine erfolgreiche Kultivierung von Mikroorganismen ist es erforderlich, die Kultivierungsbedingungen mit der Einstellung unterschiedlicher Parameter (Kultivierungsmedium, Temperatur, pH-Wert,

Sauerstoffgehalt und andere) optimal und vor allem spezifisch an die Bedürfnisse des jeweiligen Zielorganismus anzupassen. Die Entwicklung angepasster und spezifischer Kultivierungsmedien ist aber ein zeitaufwendiger Prozess, der darüber hinaus für jede Organismengruppe wiederholt werden muss.

Bei der Isolierung von Bakterien kommt es außerdem oft zu einer Verschiebung der Populationszusammensetzung. Organismen, die auf dem eingesetzten Kultivierungsmedium schnell wachsen können, werden häufiger isoliert als langsam wachsende Organismen, auch wenn die langsam wachsenden Organismen zahlenmäßig häufiger in der Ausgangspopulation vertreten sind. Eine allein auf der Kultivierung mit Standardmedien beruhende Beschreibung der Biozönose ist also limitiert und repräsentiert nicht die tatsächlichen Verhältnisse im untersuchten mikrobiologischen Habitat.

Da die Beschreibung mikrobieller Biozönosen mit Hilfe kultivierungsbasierender Methoden aus den oben genannten Gründen nicht ausreichend ist, wurden im letzten Jahrzehnt unterschiedliche molekularbiologische Methoden eingesetzt, um mikrobiologische Lebensgemeinschaften zu untersuchen (Amann et al. 1990; Gelsomino et al. 1999; Muyzer et al. 1993; Osborn et al. 2000). Molekularbiologische Methoden haben den Vorteil, dass die Analyse der Biozönose auf der Ebene des Genoms stattfindet und somit die unterschiedlichen Ansprüche zur Kultivierung der verschiedenen Organismen nicht mehr berücksichtigt werden müssen. Die Ergebnisse vieler molekularbiologischer Untersuchungen in unterschiedlichen Habitaten zeigen, dass viele bisher unbekannte Organismen in den untersuchten Systemen auftraten, deren Kultivierung bisher nicht gelungen war (Godon et al. 1997a; Hugenholtz et al. 1998; Suau et al. 1999).

Von den molekularbiologischen Methoden verdient die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden besondere Beachtung, weil mit dieser Methode eine direkte Untersuchung der Zellen möglich wird. Andere Methoden wie DGGE, TGGE, ARDRA oder (T)RFLP-Analysen arbeiten mit extrahierter DNA und lassen nur eingeschränkt Aussagen über die Organisation der mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu. Durch in situ Hybridisierung konnte das Auftreten einzelner Gruppen von Organismen in anaeroben technischen Systemen (Harmsen et al. 1995; Merkel et al. 1999; Raskin et al. 1994b) sowie die räumliche Organisation mikrobieller Lebensgemeinschaften untersucht werden (Sekiguchi et al. 1999).

Trotz dieser Vorteile besitzen rein molekularbiologische Untersuchungen mikrobieller Biozönosen auch Nachteile. Aussagen über die Physiologie der Organismen und deren ökologische Rolle im System sind nur sehr eingeschränkt möglich. Diese Informationen sind aber für das Verstehen der mikrobiologischen Prozesse und eine vollständige ökologische Beschreibung eines biologischen Systems erforderlich. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass auch bei molekularbiologischen Methoden eine Verschiebung der Populationszusammensetzung auftreten kann. Alle Schritte der Probenaufarbeitung, von der Probenahme bis zur PCR der extrahierten DNA, können als potentielle Ursache für eine solche Verschiebung in Frage kommen (von Wintzingerode et al. 1997).

Bei der Extraktion der DNA kann es zu einer selektiven Anreicherung der DNA leicht zu lysierender Zellen im DNA-Extrakt kommen. So ist zum Beispiel der Zellaufschluss bei Gram positiven Bakterien aufgrund der dicken Zellwand deutlich schwieriger als der Aufschluss von Gram negativen Bakterien. Ein unzureichender Zellaufschluss wird also vorrangig die DNA leicht zu lysierender Zellen enthalten, während bei zu harschen Extraktionsbedingungen die DNA geschert werden kann, was zu Artefakten bei der PCR führt.

Die Amplifikation der DNA in der PCR kann durch Kontaminationen im DNA-Extrakt behindert werden. Das Auftreten von Huminsäuren im DNA-Extrakt kann die Ergebnisse der PCR deutlich beeinflussen. Viele Polymerasen werden durch die Anwesenheit von Huminsäuren gehemmt (Tebbe und Vahjen 1993). Wenn versucht wird, die inhibierende Wirkung der Huminsäuren durch Verdünnung des DNA-Extrakts zu umgehen, besteht die Gefahr, dass niedrig konzentrierte DNA-Moleküle nicht mehr über die PCR nachgewiesen werden können.

Auch ohne inhibierende Faktoren kann nicht davon ausgegangen werden, dass in der PCR ein Gemisch unterschiedlicher DNA quantitativ amplifiziert wird. Um eine gleichmäßige Amplifikation aller DNA-Moleküle in einem Gemisch zu erhalten, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Alle DNA-Moleküle müssen gleich gut mit den eingesetzten Primern hybridisieren, wobei die Bindungshäufigkeit und die Bindungsstärke bei allen Molekülen vergleichbar sein und die DNA-Polymerase bei allen DNA-Molekülen mit der gleichen Effizienz arbeiten muss. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass diese Annahmen nicht unbedingt zutreffen (Hansen et al. 1998; Suzuki und Giovannoni 1996).

Da sowohl die kultivierungsbasierenden wie auch die kultivierungsunabhängigen, molekularbiologischen Methoden ihre Limitierungen haben, sollte eine vollständige und umfassende Untersuchung einer mikrobiellen Biozönose verschiedene Methoden kombinieren. Dabei können besonders die Kultivierung der Organismen und weiterführende physiologische Untersuchungen an den Reinkulturen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der ökologischen Zusammenhänge liefern. Die physiologischen Untersuchungen an Reinkulturen und definierten Mischkulturen können dazu beitragen, die mikrobiologischen Prozesse in natürlichen Habitaten oder technischen Systemen zur Reinigung von Abwasseranlagen besser zu verstehen.

1.2 Mikrobiologische Grundlagen der anaeroben Abwasserreinigung

Anaerobe Lebensgemeinschaften unterscheiden sich grundsätzlich von aeroben Biozönosen. Anders als in aeroben Systemen, wo einzelne heterotrophe Bakterien organische Substrate vollständig mineralisieren können, ist der Abbau in anaeroben Ökosystemen ein komplexes Zusammenspiel verschiedener funktionaler Gruppen.

Grundsätzlich lassen sich in anaeroben Habitaten zwei verschiedene Stoffwechselformen unterscheiden, nämlich die anaeroben Atmungen und die Gärungen. Bei den anaeroben Atmungsprozessen können Elektronen auf externe Elektronenakzeptoren übertragen werden. Die dabei frei werdende Energie reicht aus, um einen chemiosmotischen Gradienten über die Zellmembran zu erzeugen, der anschließend zur Energiekonservierung genutzt werden kann. Viele Bakterien, die zur anaeroben Atmung befähigt sind, können einen Gärungsstoffwechsel durchführen, wenn der externe Elektronenakzeptor fehlt. Bei Gärungen erfolgt die Konservierung von Energie in der Regel nur über eine Substrat-Phosphorylierung. Einige gärende Organismen besitzen zwar die Möglichkeit, auch externe Elektronenakzeptoren zu nutzen, um die elektronenübertragenden Cofaktoren zu regenerieren (Benz et al. 1998; Coates et al. 1998), aber dieser Prozess ist nicht mit der Ausbildung eines chemiosmotischen Gradienten gekoppelt.

Eine Besonderheit anaerober mikrobieller Biozönosen ist die Ausbildung syntropher Beziehungen zwischen gärenden und anaeroben atmenden Organismen. Verschiedene gärende Organismen können die Elektronen, die bei der Oxidation des Substrats anfallen, auf Protonen übertragen und dabei molekularen Wasserstoff erzeugen. Dieser Prozess wird durch einen syntrophen Partner unterstützt, der den entstehenden Wasserstoff verbraucht. Sulfatreduzierende Bakterien, homo-

acetogene Bakterien und methanogene Archaeen können in syntrophen Gemeinschaften als wasserstoffzehrende Partner fungieren. Die Ausbildung solcher syntrophen Gemeinschaften erhöht die Energieausbeute der gärenden Organismen und macht in vielen Fällen einen Abbau organischer Moleküle erst möglich.

1.2.1. Anaerobe Atmungen

Die Nitratatmung wird häufig von fakultativ anaeroben Bakterien durchgeführt, wenn Sauerstoff nicht als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Je nach gebildetem Endprodukt unterscheidet man zwischen Denitrifikation und Nitrat-Ammonifikation. Die Denitrifikation ist der einzige biologische Weg zur Bildung von molekularem Stickstoff. Die Nitrat-Ammonifikation wird sowohl von fakultativ anaeroben Organismen als auch von strikten Anaerobiern durchgeführt. Die Reduktion von Nitrat erfolgt dabei vollständig zu Ammonium. Für die technische Abwasserreinigung ist die Denitrifikation der wichtigere Prozess, da das Endprodukt (N_2) das System als Gas verlassen kann. Das Endprodukt der Nitrat-Ammonifikation verbleibt als lösliches Ion im Abwasser und kann als Stickstoffquelle für den Aufbau von Biomasse dienen. In hohen Konzentrationen kann Ammonium toxisch wirken, wobei die undissoziierte Form, der Ammoniak, deutlich toxischer wirkt als das Ammonium (Lay et al. 1998).

Ein weiterer wichtiger Atmungsprozess in anaeroben Abwasseranlagen nutzt Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor. Die Sulfatatmung wird von einer speziell angepassten Gruppe von Bakterien, den sulfatreduzierenden Bakterien, durchgeführt. Diese Organismen nutzen unter anderem Alkohole und Fettsäuren als Substrat. Komplexe Substrate wie Zucker oder polymere Verbindungen können in der Regel nicht verwertet werden. Bei sulfatreduzierenden Bakterien können vollständige Oxidierer und unvollständige Oxidierer unterschieden werden. Vollständige Oxidierer oxidieren das Substrat komplett zu CO_2 , während unvollständige Oxidierer Acetat als Stoffwechselprodukt ausscheiden.

In sulfathaltigen Abwässern spielen sulfatreduzierende Bakterien eine wichtige Rolle. Sie können mit gärenden Organismen um die Substrate konkurrieren, wobei die sulfatreduzierenden Bakterien durch die Fähigkeit des Elektronentransfers bei gleichzeitiger Ausbildung eines Protonengradienten einen ökologischen Vorteil besitzen. Viele Sulfatreduzierer sind in der Lage, molekularen Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen. Damit können sie als wasserstoffzehrende Partner in syntrophen Gemeinschaften mit gärenden Bakterien den Abbau von Fettsäuren und

Aromaten ermöglichen und die Energieausbeute gärender Organismen verbessern. In dieser Rolle konkurrieren die Sulfatreduzierer mit den methanogenen Archaeen und den homoacetogenen Bakterien um den Wasserstoff.

Die Stoffwechselaktivität von sulfatreduzierenden Bakterien kann in anaeroben Systemen aber auch zu Problemen führen. Die Energieausbeute bei der Sulfatreduktion ist deutlich niedriger als bei der aeroben Atmung oder bei der Nitratatmung. Aus diesem Grund müssen zur Aufrechterhaltung der Lebensprozesse große Mengen Sulfat reduziert werden. Der bei der Sulfatreduktion entstehende Schwefelwasserstoff ist schon in geringen Konzentrationen toxisch, wobei genaue Angaben der minimalen Hemmkonzentration in der Literatur schwanken (Kolmert et al. 1997; Mizuno et al. 1998; Oleszkiewicz et al. 1989). Wie bei der Toxizität von Ammonium ist auch der toxische Effekt von Schwefelwasserstoff abhängig vom pH-Wert und steigt bei niedrigen pH-Werten, weil dann ein größerer Teil des Schwefelwasserstoffs undissoziiert vorliegt. Aus technischer Sicht ist die Rolle der sulfatreduzierenden Bakterien aus einem weiteren Grund wichtig. Diese Organismen spielen eine bedeutende Rolle bei der Korrosion von metallischen und nicht metallischen Werkstoffen (Hamilton 1991; Lee et al. 1995; Pankhania 1988)

Zwei weitere anaerobe Atmungsprozesse nutzen Kohlendioxid als Elektronenakzeptor: die Homoacetogenese und die Methanogenese. Bei beiden Prozessen wird CO_2 gleichzeitig als Elektronenakzeptor und für die Assimilation von Kohlenstoff genutzt. Aus diesem Grund können diese Prozesse auch als Gärung aufgefasst werden (Gottschalk 1986), aber die Mechanismen der Energiekonservierung bei beiden Organismengruppen rechtfertigen die Einordnung dieser Stoffwechselprozesse als anaerobe Atmung.

Homoacetogene Bakterien sind obligat anaerobe Organismen, die den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechsel nutzen, um Acetyl-CoA aus CO_2 zu synthetisieren (Drake 1994). Dadurch können diese Organismen Elektronen auf den externen Elektronenakzeptor Kohlendioxid übertragen. Dieser Prozess ist mit der Bildung eines chemiosmotischen Gradienten über der Zellmembran gekoppelt und kann zur ATP Synthese genutzt werden (Dolfing 1988). Dies bietet den homoacetogenen Bakterien einen ökologischen Vorteil gegenüber gärenden Organismen, weil die Energieausbeute bei der Nutzung der Substrate höher ist. Darüber hinaus besitzen homoacetogene Bakterien oft einen sehr vielseitigen Stoffwechsel, der diese

Organismen zum Abbau der unterschiedlichsten Substrate befähigt (Drake et al. 1997).

Der zweite anaerobe Atmungsprozess, bei dem Kohlendioxid als terminaler Elektronenakzeptor dient, ist die Methanogenese. Dieser Stoffwechselprozess tritt ausschließlich bei Archaeen auf und reduziert CO_2 vollständig zu Methan. Die Methanogenese spielt für die anaerobe Abwasserreinigung eine wichtige Rolle, weil das gebildete Methan als Biogas genutzt werden kann. Kohlendioxid wird in mehreren Schritten zu Methan reduziert. Die Elektronen werden dabei von einem speziellen Cofaktor F_{420} übertragen, der fast ausschließlich bei methanogenen Archaeen auftritt. Andere Enzyme der Methanogenese sind nur bei den Archaeen zu finden und treten nicht bei Bakterien auf. Methanogene Archaeen können nur wenige Substrate als Kohlenstoffquelle nutzen. Die Reduktion des CO_2 zu Methan erfolgt schrittweise, wobei das Kohlenstoffatom die Redoxstufen des Formiats, des Formaldehyds und des Methanols durchläuft, bevor die entgeltige Reduktion zu Methan erfolgt. Diese Zwischenprodukte können einigen Methanogenen als Substrat dienen. Darüber hinaus werden methylierte Amine und Acetat als C-Quelle genutzt. Die methanogene Acetatspaltung ist im Grunde eine Decarboxylierung und stellt eine Variation eines reversen Acetyl-CoA Stoffwechsels dar. Dieser Prozess ist mit der Ausbildung eines Protonen- oder Natriumionen-Gradienten gekoppelt, der zur Energiegewinnung genutzt werden kann.

Neben diesen vorgestellten anaeroben Atmungen existieren weitere Stoffwechselwege, bei denen Elektronen auf externe Elektronenakzeptoren übertragen werden und eine Energiekonservierung über einen chemiosmotischen Gradienten erfolgen kann. Der Vollständigkeit halber seien die anaeroben Atmungen mit Metall-Ionen (Eisen, Mangan und andere) und mit Schwefelverbindungen (Thiosulfat, Sulfid und elementarer Schwefel) als Elektronenakzeptoren genannt. Ein besonderer Fall ist die Fumarat-Atmung. Bei der Reduktion von Fumarat zu Succinat kommt es an der membrangebundenen Fumarat-Dehydrogenase zu einer Protonentranslokation. Dieser Stoffwechselschritt ist ein integraler Bestandteil der Propionsäuregärung. Trotzdem rechtfertigt die Ausbildung eines Protonen-Gradienten, der zur Energiekonservierung genutzt wird, die Zuordnung der Fumarat-Atmung zu den anaeroben Atmungsprozessen.

1.2.2. Gärungen

Neben den anaeroben Atmungsprozessen sind die Gärungen der zweite wichtige Prozess beim anaeroben Abbau von Biomasse. Gärenden Organismen fehlt die Fähigkeit, durch die Übertragung von Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor einen chemiosmotischen Gradienten über die Zellmembran aufzubauen, der dann für die ATP-Synthese genutzt werden kann. Diese Organismen müssen die elektronenübertragenden Cofaktoren dadurch regenerieren, indem die Elektronen auf einen internen Elektronenakzeptor übertragen werden. Der Elektronenakzeptor wird anschließend als reduziertes Gärprodukt ausgeschieden. Ohne die Möglichkeit, eine chemiosmotische Energiekonservierung zu nutzen, sind gärende Organismen ausschließlich auf die Substratphosphorylierung zur ATP-Synthese angewiesen. Darüber hinaus muss das Substrat gleichzeitig als Regenerator der Reduktionsäquivalente dienen und kann deswegen nicht vollständig oxidiert werden. Aus diesen Gründen ist die ATP-Ausbeute bei Gärungen gering. Daher müssen die Zellen gärender Organismen beträchtliche Mengen des Substrats umsetzen, bevor ausreichend Energie und Biomasse zur Verfügung steht, um eine Zellteilung durchzuführen.

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Gärungstypen gebildet, die sich im wesentlichen durch die Metabolisierung von Pyruvat unterscheiden. Pyruvat ist das zentrale Intermediat der Gärungsstoffwechsel und wird durch die Glykolyse oder alternative Stoffwechselwege gebildet. Neben Kohlenhydraten können auch Fettsäuren, Aminosäuren und einige aromatische Verbindungen vergoren werden, wobei der Abbau oft von speziellen Organismengruppen durchgeführt wird.

Bei der einfachen Reduktion von Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase entsteht Milchsäure, die aus der Zelle ausgeschieden wird. Dieser Gärungstyp wird von verschiedenen Bakterien durchgeführt und ist namensgebend für die Milchsäurebakterien. Nach einer Decarboxylierung von Pyruvat entsteht Acetaldehyd, der durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol reduziert werden kann. Die alkoholische Gärung wird von Hefen und Bakterien durchgeführt.

Neben der Funktion von Pyruvat für die Regeneration der elektronenübertragenden Cofaktoren kann dieses Molekül auch zur Energiekonservierung eingesetzt werden. Durch Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktasen bzw. durch Pyruvat-Formiat-Lyasen kann Acetyl-CoA gebildet werden. Der CoA-Rest von Acetyl-CoA kann durch Phosphotransacetylase gegen einen Phosphatrest ausgetauscht werden und das

entstehende Acetyl-Phosphat kann durch die Acetat-Kinase zur ATP-Regenerierung genutzt werden. Diese Reaktion kann aber nur ablaufen, wenn die Cofaktoren in der Zelle auf anderen Wegen regeneriert werden können. Diese Regeneration kann zum Beispiel durch assimilatorische Prozesse in der Zelle oder durch den Transfer der Elektronen auf andere Organismen in Form von molekularem Wasserstoff ablaufen. Diese Form der Elektronenübertragung wird als „interspecies hydrogen transfer“ bezeichnet und ermöglicht eine höhere Energieausbeute bei den gärenden Organismen.

Acetyl-CoA dient als Intermediat bei verschiedenen Gärungstypen. Durch Kondensation von zwei Acetyl-CoA entsteht Acetoacetyl-CoA, das zu Butyryl-CoA reduziert wird. Der CoA-Rest kann dann auf Acetat übertragen werden und das entstehende Acetyl-CoA kann zur ATP-Regeneration eingesetzt werden. Das dabei frei werdende Butyrat wird aus der Zelle ausgeschleust. Bei diesem Gärungstyp kann es besonders bei niedrigen pH-Werten auch zur Bildung von Lösungsmitteln (Butanol, 2-Propanol, Aceton) kommen. Die Buttersäuregärung wird unter anderem von Arten der Gattungen *Clostridium* und *Eubacterium* durchgeführt.

Die Propionsäuregärung mit Hilfe des Methylmalonyl-CoA Wegs unterscheidet sich von den anderen Gärungen durch ihre Komplexität. Dabei wird mit Hilfe des Coenzym Biotin zuerst Oxalacetat gebildet, indem CO_2 auf Pyruvat übertragen wird. Anschließend wird Oxalacetat schrittweise über Malat und Fumarat zu Succinat reduziert. Die Fumarat-Reduktase katalysiert die Reduktion von Fumarat zu Succinat. Dieses Enzym ist membrangebunden und kann einen Protonengradienten aufbauen, der zur Energiekonservierung genutzt werden kann. Succinat wird nach Aktivierung mit Coenzym A durch das Coenzym B_{12} zu Methylmalonyl-CoA umgewandelt und durch Biotin zu Propionyl-CoA decarboxyliert. Propionat wird dann schließlich durch eine Coenzym A-Transferase freigesetzt. Das Coenzym A wird dabei auf Succinat übertragen.

Propionsäure kann auch durch weniger komplexe Stoffwechselwege entstehen. Bei verschiedenen Clostridien wird Lactyl-CoA über das charakteristische Zwischenprodukt Acryloyl-CoA zu Propionyl-CoA reduziert und Propionat ausgeschieden. Ein Sonderfall ist die Decarboxylierung von Succinat, die von *Propionibacterium modestum* und anderen Organismen durchgeführt wird (Jannsen und O'Farrell 1999; Schink und Pfennig 1982). Die Decarboxylierung von Succinat erfolgt an einer membrangebundenen Decarboxylase, die gleichzeitig Natrium-Ionen

durch die Zellmembran transportiert. Der entstehende chemiosmotische Gradient kann dann zur ATP-Synthese genutzt werden. Die freie Energie dieser Reaktion (-20 kJ/mol) ist die Niedrigste, die von Lebewesen zum Wachstum genutzt werden kann.

In vielen Fällen entsteht bei der Vergärung nicht nur ein Produkt, sondern ein Gemisch verschiedener Produkte. Charakteristisch für die Enterobacteriaceen ist die Gemischte-Säure-Gärung oder Ameisensäure-Gärung. Bei dieser Gärung entstehen Formiat, Acetat, Succinat, Lactat, Ethanol, Kohlendioxid und Wasserstoff in Abhängigkeit vom Organismus und von den herrschenden Umweltbedingungen. Die Stoffwechselwege gleichen denen der vorgestellten Gärungen. Formiat wird durch die Pyruvat-Formiat-Lyase gebildet, wobei das gebildete Formiat zu CO₂ und H₂ gespalten werden kann.

1.3 Theorie der anaeroben Abwasserreinigung

Der anaerobe Abbau kann aus physiologisch-funktionaler Sicht in vier Abbauphasen unterteilt werden. In einem ersten Schritt, der hydrolytischen Phase, werden Biopolymere (Polysaccharide, Polypeptide und Fette) durch Exoenzyme hydrolytischer primärer Gärer in Monomere (Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren) zerlegt. Diese Monomere werden in der acidogenen Phase durch primäre Gärer oder syntrophe Bakterien in Alkohole, kurzkettige Fettsäuren, CO₂ und H₂ umgesetzt. Gärende Organismen übertragen Elektronen auf Stoffwechselprodukte des Substratabbaus und scheiden die reduzierten Produkte aus. Diese reduzierten Stoffwechselprodukte dienen sekundären Gärern oder sulfatreduzierenden Bakterien als Substrat. In der acetogenen Phase werden die Alkohole und kurzkettigen Fettsäuren zu Acetat verstoffwechselt (Boone und Bryant 1980). Der Abbau einiger Substrate ist nur durch die Ausbildung syntropher Gemeinschaften zwischen gärenden und wasserstoffzehrenden Organismen möglich. So ist zum Beispiel der anaerobe Abbau kurz- und langkettiger Fettsäuren (Propionat, Butyrat u. a.), verschiedener aromatischer Verbindungen (Benzoat, Phenol), Alkoholen und einigen Aminosäuren endergon und kann nur ablaufen, wenn diese Prozesse mit exergonen Reaktionen wie anaeroben Atmungen gekoppelt werden können (Schink 1980). Das in der acetogenen Phase gebildete Acetat kann in der methanogenen Phase durch die Aktivität methanogener Organismen zu CO₂ und Methan umgewandelt werden oder durch verschiedene Arten sulfatreduzierender Bakterien vollständig zu CO₂ oxidiert werden. Die Produktion von Biogas ist bei der anaeroben Abwasserreinigung der bevorzugte Prozess,

weil dann durch die Verbrennung des Biogas Energie gewonnen werden kann. Abbildung 1.1 zeigt ein Schema des anaeroben Abbaus mit den daran beteiligten Stoffwechselwegen. Neben den oben erwähnten Gärungsstoffwechseln können in anaeroben Habitaten auch Atmungsstoffwechsel durchgeführt werden, wobei das Substrat häufig vollständig oxidiert werden kann.

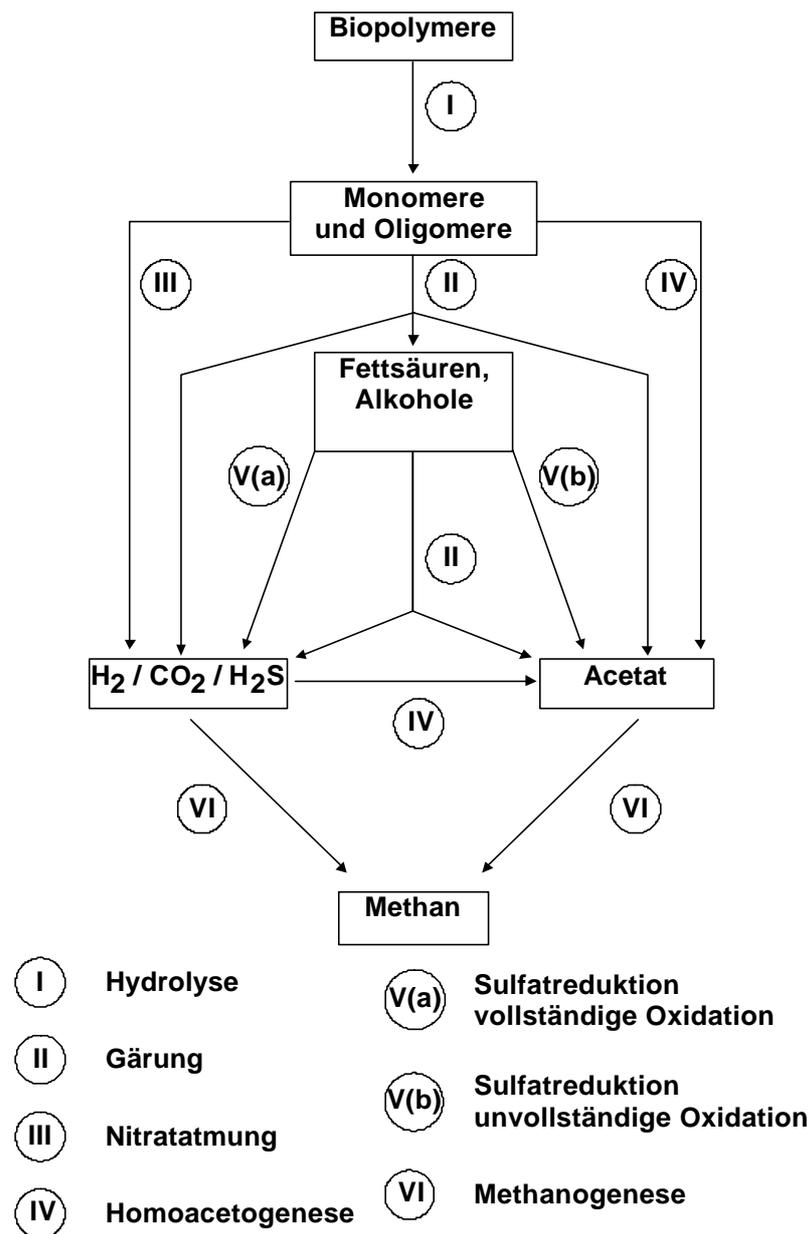


Abbildung 1.1: Schema des anaeroben Abbaus, modifiziert nach (Schink 1980)

Die klare physiologische Strukturierung des anaeroben Abbaus erlaubt die selektive Untersuchung einzelner funktionaler Gruppen. Während die finalen Schritte des anaeroben Abbaus (Acetogenese und Methanogenese) das Ziel verschiedener Untersuchungen waren (Hansen et al. 1999; Raskin et al. 1994a; Yoda et al. 1987),

ist weit weniger über die hydrolysierenden und acidogenen Organismen bekannt und nur in wenigen Untersuchungen wurden die Organismen kultiviert, um deren physiologisches Potential zu testen (Delbès und Godon 1998).

1.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose in einem Anaerobreaktor zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe. Diese Charakterisierung sollte mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden, um die Limitierungen, denen einzelne Methoden unterliegen, auszugleichen. Einige physiologische Gruppen der anaeroben Nahrungskette wurden in der Vergangenheit bereits intensiv untersucht (sulfatreduzierende Bakterien, Methanogene), aber der heterogenen Gruppe der hydrolytischen und acidogenen Organismen wurde weit weniger Aufmerksamkeit zuteil. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch diese Gruppe intensiv untersucht werden.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Kultivierungsmedien sollten möglichst viele unterschiedliche Organismen isoliert werden, wobei durch die Wahl der Substrate bereits eine vorläufige Einordnung der Isolate in die anaerobe Nahrungskette erfolgte. Physiologische Untersuchungen sollten im weiteren das metabolische Potential der Isolate klären und Hinweise auf die Rolle verschiedener Arten beim anaeroben Abbau der Rübenmelasseschlempe geben.

Da die Isolierung anaerober Bakterien ein langwieriger Prozess ist, sollte das Potential der Fluoreszenz in situ Hybridisierung für eine schnelle Beschreibung der mikrobiellen Populationen in anaeroben Systemen untersucht werden. Verschiedene Sonden sollten auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen eingesetzt werden, um einen schnellen Überblick über die Zusammensetzung und Aktivität der unterschiedlichen Reaktorpopulation zu geben.

Ferner sollte untersucht werden, ob durch Veränderungen verfahrenstechnischer Parameter beim Betrieb des Anaerobreaktors Schwankungen in der Zusammensetzung und Aktivität der mikrobiellen Biozönose auftreten, die mit Hilfe der in situ Hybridisierung detektiert werden können. Damit wäre ein interessantes Werkzeug für die mikrobiologische Überwachung von anaeroben Abwasseranlagen verfügbar, mit dem innerhalb kurzer Zeit Aussagen über den Zustand der Reaktorpopulation gemacht werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Gase und Oligonukleotide

Für alle Untersuchungen wurde Wasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn) verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, waren die verwendeten Chemikalien von p.a.-Qualität und wurden von Aldrich (Steinhofen), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Gase wurden in 5.0 (N₂, H₂) oder 2.8 (CO₂)- Reinheit verwendet (Messer-Griesheim oder Linde). Für das Arbeiten mit anaeroben Organismen wurden die Gasgemische „Biogon“ (Linde) oder „Inertal“ (Messer Griesheim) eingesetzt. Diese Gasgemische bestanden aus 80 % Stickstoff 5.0 und 20 % Kohlendioxid 2.8 (vol/vol). Den Gasen wurden mögliche Restkonzentrationen von Sauerstoff durch einen Katalysator (Ochs, Göttingen) entzogen.

Die DNA-Synthese von Primern für PCR und Sequenzierung sowie von Sonden zur in situ Hybridisierung wurde von MWG Biotech (Ebersberg) oder Biometra (Göttingen) durchgeführt.

2.2 Untersuchtes System

2.2.1. Aufbau der Reaktoranlage

Zur Reinigung des eingesetzten Abwassers wurden zweistufige Festbettreaktoren eingesetzt, die am Institut für Verfahrenstechnik der TU Berlin (Prof. Kraume) betrieben wurden. Die Anlagen hatten ein Volumen von 2 l (Laboranlage) bzw. von 27 l (Versuchsanlage) und wurden im upflow-Betrieb gefahren. Das Festbett bestand aus geschäumter Keramik (Dohse Aquarisitk, Bonn). An den Reaktoren waren über die Reaktorlänge Probenahmestellen eingerichtet. Dadurch war es möglich, die Zusammensetzung des Abwassers und der entstehenden Stoffwechselprodukte in den Zu- und Abläufen sowie über der Reaktorlänge zu bestimmen.

Die Reaktoren hatten einen Wassermantel und wurden über einen Badthermostat auf 37 °C temperiert. Die Melasseschlempe wurde in einem Vorlagebehälter mit Wasser auf den gewünschten CSB-Wert verdünnt und über doppelköpfige Eintragspumpen in die Reaktoren gepumpt. Entstehendes Biogas wurde über Abtauchungen aus dem System entfernt. Eine Messung des Biogasvolumenstroms war über Gasuhren möglich. Die Anlage war mit einem Rezirkulationssystem

ausgestattet. Durch Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit konnte überschüssige Biomasse aus dem System ausgetragen werden (Abbildung 2.1).

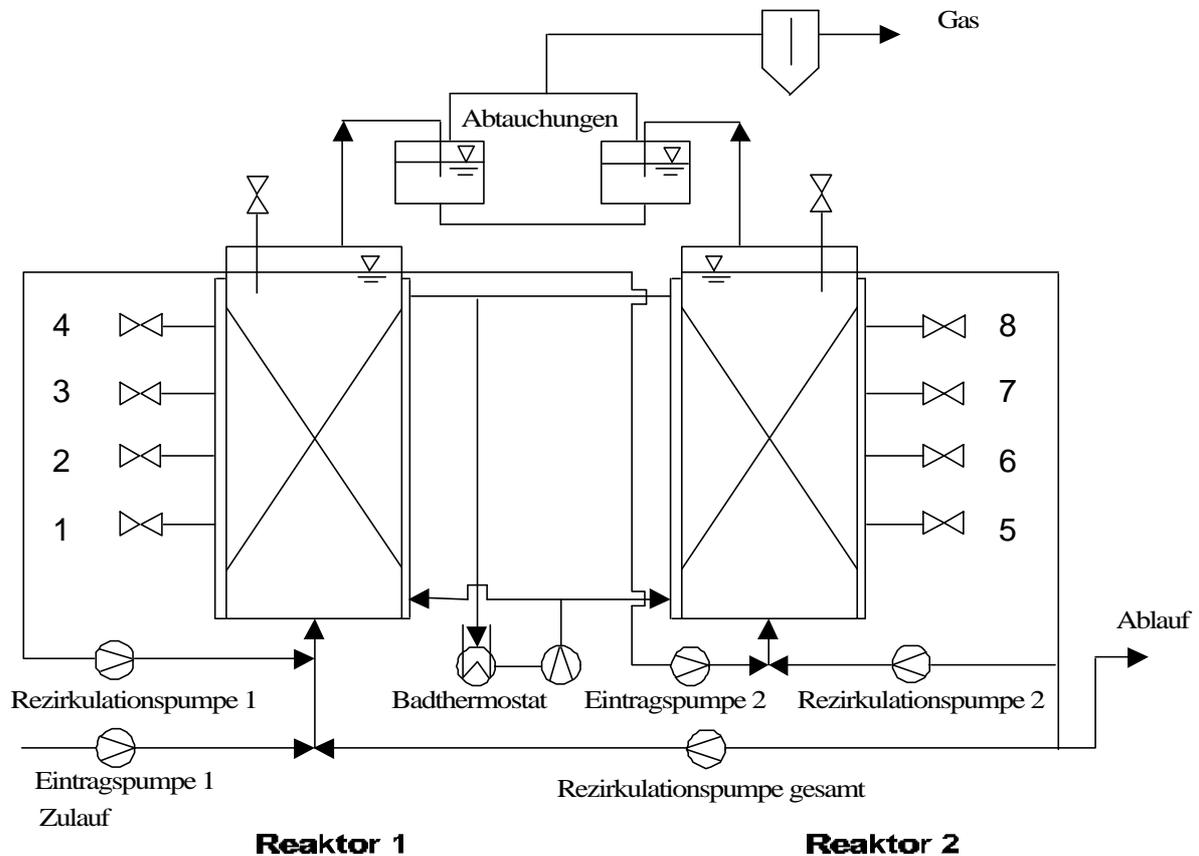


Abbildung 2.1: Fließbild der anaeroben Reaktoren

Bei der Versuchsanlage wurde ein dritter Reaktor parallel zum ersten Reaktor betrieben. Dieser Reaktor wurde nicht mikrobiologisch untersucht, sondern diente der Beantwortung verschiedener verfahrenstechnischer Fragestellungen (unterschiedliche Festbettmaterialien u. a.). Die biologischen Untersuchungen wurden an der Versuchsanlage mit dem Trägermaterial Keramik durchgeführt. An der Laboranlage wurden begleitende Untersuchungen zu verfahrenstechnischen Experimenten durchgeführt. Für Experimente zum Verhalten der Biozönose bei schwankender Substratversorgung wurden Reaktoren mit einem Volumen von 0,2 l eingesetzt. Diese Reaktoren waren nur mit einer Probenahmestelle ausgestattet. Die Proben wurden aus dem Zentrum des Reaktors gezogen.

2.2.2. Abwasserbeschaffenheit

Die Rübenmelasseschlempe, die bei den untersuchten Reaktoren als Substrat eingesetzt wurde, war ein Abfallprodukt der Spiritusfabrikation. Die Schlempe stammte aus dem Institut für Brauerei und Brennereiwesen der Technischen Universität Berlin und wurde direkt aus dem Sumpf einer Destillationskolonne entnommen. Dieses Abwasser war durch einen hohen CSB-Wert, hohe Sulfatkonzentrationen und einen niedrigen pH-Wert charakterisiert. Der hohe CSB-Wert war überwiegend auf Zuckerderivate sowie auf Zellrückstände der Rübenmaische und auf Stoffwechselprodukte der Hefen zurückzuführen. Die hohen Sulfatkonzentrationen sowie der niedrige pH-Wert resultierten aus dem Ansäuern der Rübenmaische mit Schwefelsäure. Diese Ansäuerung soll den Wuchs unerwünschter Bakterien unterbinden und eine bessere Vergärung der Rübenmaische durch die Hefen gewährleisten. Das Verhältnis von BSB₅ zu CSB lag bei ca. 0,8, was zeigt, dass etwa 20 % der organischen Fracht biologisch nur schwer abbaubar war. Der schwer abbaubare Teil bestand überwiegend aus Betainen und Ligninen (Kuttig 1992). Der Feststoffanteil der Rübenmelasseschlempe war gering, was einen Aufstrombetrieb in einem Festbettreaktor ermöglichte. Die Beschaffenheit des Abwassers ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Rübenmelasseschlempe

| Komponente | Abkürzung | Konzentration [g/l] |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|
| chemischer Sauerstoffbedarf | CSB | 60 – 100 |
| biologischer Sauerstoffbedarf | BSB ₅ | 51 – 85 |
| Trockensubstanz | TS | 70 – 95 |
| organische Trockensubstanz | oTS | 50 – 68 |
| organischer Kohlenstoff | TOC | 28 – 37 |
| Gesamtstickstoff | N | 4 – 5 |
| Ammonium-Stickstoff | NH ₄ -N | 0,3 – 0,5 |
| Nitrat-Stickstoff | NO ₃ -N | 0 – 0,03 |
| Gesamtschwefel | S | 1,7 – 2,3 |
| Sulfat-Schwefel | SO ₄ -S | 1,6 – 2,3 |

Die native Melasseschlempe wurde im Institut für Verfahrenstechnik in großen Kellertanks zwischengelagert und vor dem Einsatz mit Wasser auf die gewünschten CSB-Werte verdünnt.

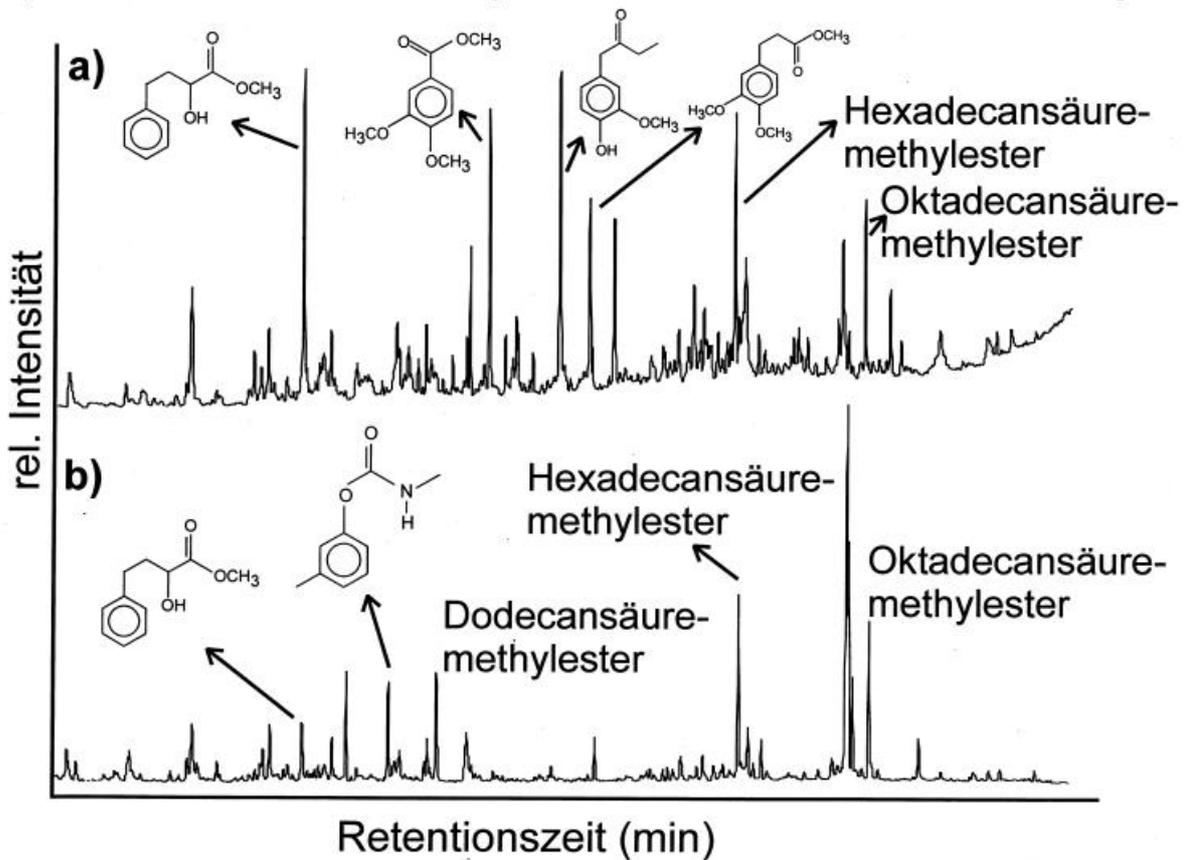


Abbildung 2.2: Massenspektrum der Melasseschlempen vor (a) und nach (b) der Behandlung im Reaktor

Chemische Analysen des Abwassers, die im Institut für Wasserreinigung der TU Berlin durchgeführt wurden, zeigten, dass verschiedene methoxylierte Verbindungen auftraten (Abbildung 2.2). Die methoxylierten Produkte wurden im Reaktor abgebaut.

2.3 Mikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Reaktorbiozönose erfolgte mit einem Zeiss Axioplan (Fa. Carl Zeiss Oberkochen). Dabei wurde die Morphologie und die Beweglichkeit von Zellen, sowie das Auftreten von Teilungsstadien beobachtet und in die mikrobiologische Bewertung der Reaktorbiozönose einbezogen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Kameraaufsatzes MC 80 auf einem Farbdiafilm (Fuji 100).

Für epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen war das Mikroskop mit einer 100 W Quecksilberdampf Hochdrucklampe ausgestattet. Die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale wurden mit dem Filtersatz Nr.1 für DAPI (Anregung 365 nm, Strahlenteiler 395 nm Emissionsfilter 397 nm) und dem HQ light Filter (AF Analysetechnik, Tübingen) für Cy3-markierte Sonden (Anregung 535 – 550 nm, Strahlenteiler

565 nm, Emissionsfilter 610 – 675 nm) erzeugt. Aufgrund einer starken Autofluoreszenz des Reaktormaterials war ein Einsatz von Sonden, die mit einem grünen Fluorochrom markiert waren, nicht möglich.

Autotrophe methanogene Archaeen wurden an einem Zeiss Axioskop durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 420 nm selektiv detektiert. Bei dieser Wellenlänge zeigt der Cofaktor F_{420} eine typische Fluoreszenz. Die Autofluoreszenz autotropher Archaeen wurde mit dem Filtersatz Nr. 5 (Anregung 395 – 440 nm, Strahlenteiler 460 nm, Emissionsfilter 470 nm) untersucht. Die Dokumentation von in situ Hybridisierungen und Autofluoreszenzen erfolgte mit einem lichtempfindlichen Farbdiafilm (Kodak 1600).

Die Beschreibung der Koloniemorphologie von Reinkulturen in Tiefagar erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit einem Kameraaufsatz MC 63 der Fa. Zeiss (Vergrößerung 8 – 50 x).

2.4 Kultivierung

Die Kultivierung der Organismen erfolgte in Tiefagar oder in Flüssigkultur. Ein Mineralmedium wurde für die jeweilige experimentelle Fragestellung mit entsprechenden Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren und Reduktionsmitteln angesetzt.

2.4.1. Anaerobmedium

Die Zubereitung eines anaeroben Mediums erfolgte grundsätzlich wie von (Widdel 1980) beschrieben. Folgende Lösungen wurden eingesetzt:

Mineralmedium-Stammlösung

Die Stammlösung für den Ansatz des Anaerobmediums wurde gemäß Tabelle 2.2 hergestellt (Widdel und Bak 1992). Die Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 2.2: Mineralmedium (50-fach konzentriert)

| | |
|--|-----------|
| destilliertes Wasser | 1000,0 ml |
| KH ₂ PO ₄ | 10,0 g |
| NH ₄ Cl | 13,5 g |
| NaCl | 50,0 g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 20,5 g |
| KCl | 26,0 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 7,5 g |

Selenit-Wolframat-Lösung

Die Selenit-Wolframat-Lösung wurde gemäß Tabelle 2.3 angesetzt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C (Tschech und Pfennig 1984).

Tabelle 2.3: Selenit/Wolframatlösung

| | |
|---|---------|
| destilliertes Wasser | 1000 ml |
| NaOH | 200 mg |
| Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O | 6 mg |
| Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O | 8 mg |

Spurenelementlösung SL9

Die Spurenelementlösung SL9 wurde gemäß Tabelle 2.4 angesetzt und autoklaviert (121 °C, 20 min). Die Lösung wurde mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 6,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C (Tschech und Pfennig 1984).

Tabelle 2.4: Spurenelementlösung SL 9

| | |
|---|-----------|
| destilliertes Wasser | 1000,0 ml |
| Nitritotriessigsäure (NTA) | 12,8 g |
| FeCl ₂ x 4 H ₂ O | 1,5 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 190,0 mg |
| MnCl ₂ x 2 H ₂ O | 80,0 mg |
| ZnCl ₂ | 70,0 mg |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 36,0 mg |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 24,0 mg |
| H ₃ BO ₃ | 6,0 mg |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 2,0 mg |

Resazurinlösung

Resazurin wurde als Redoxindikator eingesetzt. Dazu wurden 50 mg Resazurin in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei 4 °C gelagert. Die Resazurinlösung wurde dem fertigen Medium zugegeben und zeigte durch einen Farbumschlag von Grau nach Rosa ein positives Redoxpotential an.

Vitaminlösungen

Die Vitaminlösungen wurden gemäß Tabelle 2.5 2000fach konzentriert angesetzt. Beide Vitaminlösungen wurden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert (Pfennig 1978).

Tabelle 2.5: Vitaminlösungen

| Vitaminlösung | |
|------------------------------|--------|
| destilliertes Wasser | 100 ml |
| 4-Aminobenzoessäure | 4 mg |
| D(+)-Biotin | 1 mg |
| Nikotinsäure | 10 mg |
| Ca-D(+)-Pantothenat | 5 mg |
| Pyridoxamindihydrochlorid | 15 mg |
| Thiaminchloriddihydrochlorid | 10 mg |
| Vitamin B12-Lösung | |
| destilliertes Wasser | 100 ml |
| Cyanocobalamin | 5 mg |

Natriumhydrogencarbonatpuffer

Zur Herstellung des Bicarbonatpuffers wurden 7,06 g Natriumhydrogencarbonat in 84 ml Wasser in einer Schraubdeckelflasche (250 ml) gelöst. Die Lösung wurde mit CO₂ gesättigt und im verschlossenen Gefäß autoklaviert (Pfennig 1978).

Reduktionsmittel

Es wurden je nach experimenteller Fragestellung entweder mit einer Natriumsulfidlösung oder mit Titan(III)-Verbindungen (Zehnder und Wuhrmann 1976) reduziert. Der Ansatz der Natriumsulfidlösung erfolgte in einem 25 ml Schraubdeckelfläschchen. Dazu wurden 0,9 g Na₂S in 10 ml destillierten Wasser gelöst. Das Wasser wurde vor Gebrauch durch Kochen (10 Minuten) entgast. Der Gasraum des Gefäßes wurde mit N₂/CO₂ gespült und die Lösung wurde im dicht verschlossenen Gefäß autoklaviert.

Zur Synthese von Ti(III)-Citrat wurden 5,14 ml 15 %iges Ti(III)-Chlorid (technische Reinheit Merck-Schuchard, Darmstadt) und 10 ml 1 M Natriumcitrat unter einer Stickstoffatmosphäre zusammengegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von festem Na₂CO₃ auf pH 7,0 eingestellt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Darstellung von Ti(III)-NTA erfolgte entsprechend mit 1 M NTA anstelle von Natriumcitrat (Adrian 1999).

Die Ti(III)-Lösung wurde mit einer Glasspritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter (Isopore GTTP 0,2 µm, Millipore Eschborn) in sterile 2 ml Probefläschchen mit Schraubverschluss gegeben. Die Fläschchen wurden mit teflonkaschierten Butylgummisepten und Schraubdeckeln verschlossen und in größeren mit N₂ begasten Flaschen aufbewahrt. Einmal geöffnete Gläschen wurden kein zweites Mal verwendet.

Ansetzen des Anaerobmediums

56 ml der Minerallösung und 2,7 l MilliQ-Wasser wurden in einem Widdelkolben (3^l) gemischt und für 90 min bei 121 °C sterilisiert. Nach Ablauf des Sterilisationsprogramms wurde der Kolben bei ca. 80 °C aus dem Autoklaven genommen. Die Gasphase wurde durch Spülen mit N₂/CO₂ ausgetauscht und das Medium auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem das Medium abgekühlt war, wurden folgende Lösungen anoxisch und steril zugegeben:

| | |
|--------------------------|--------|
| Selenit-Wolframat-Lösung | 2,8 ml |
| Spurenelementlösung SL9 | 2,8 ml |
| Bicarbonatlösung | 84 ml |
| Vitaminlösung | 1,4 ml |
| Vitamin B12-Lösung | 2,8 ml |
| Natriumsulfidlösung | 8 ml |
| Resazurinlösung | 300 µl |

Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls mit steriler 2 M HCL oder 1 M NaOH auf pH 7,0 – 7,2 eingestellt (Widdel 1980). Das Medium wurde dann entweder direkt in Serumfläschchen abgefüllt oder für die Herstellung von Tiefagarröhrchen verwendet. Nach Abfüllen des Mediums in Serumfläschchen wurden diese mit einem Butylgummistopfen verschlossen. Die Gasphase in den Serumfläschchen wurde über einen Begasungsapparat ausgetauscht (Adrian 1999). Bevor das Medium für die Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt wurde, musste es mindestens 24 Stunden equilibrieren.

2.4.2. Kultivierung in Tiefagarröhrchen

Für die Herstellung der Tiefagarröhrchen wurde zuerst ein von Verunreinigungen freier Agar hergestellt. Dazu wurden 6,75 g Agar in einem Erlenmeyerkolben in 250 ml Wasser suspendiert und 5 Minuten bei 500 U/min gerührt. Danach wurde die Suspension 10 Minuten zum Absetzen des Agars stehen gelassen, der Überstand

dekantiert und der Erlenmeyerkolben wieder mit 500 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Abschließend wurde mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Der gereinigte Agar wurde geschmolzen und jeweils 3 ml in dickwandige Reagenzgläser gefüllt. Die Reagenzgläser wurden mit Zellstoffstopfen verschlossen und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die 3 ml des 2,7 % Agars wurden beim Ansatz der Tiefagarverdünnungsröhrchen durch Zugabe der Medien, der Substrate und des Inokulums auf 10 ml verdünnt, so dass die Endkonzentration des Agars 0,8 % betrug.

2.4.3. Kultivierung in Flüssigkultur

Anreicherungskulturen und Reinkulturen wurden in Flüssigkultur angesetzt. Dazu wurde das Medium in Serumfläschchen gefüllt und mit Butylgummistopfen verschlossen. Das sulfidreduzierte Medium wurde vor dem Verschließen mit einigen Körnchen Natriumdithionit nachreduziert. Medium, das mit Ti(III)-Salzen reduziert wurde, musste nicht unter einer Schutzatmosphäre abgefüllt werden. Nach Verschließen der Flasche wurde die Gasphase über einen Begasungsrechen mit sauerstofffreiem N₂/CO₂-Gasgemisch ausgetauscht. Anschließend wurde mit einer gasdichten Spritze das Reduktionsmittel zugegeben. Die C-Quellen, die Elektronenakzeptoren und das Inokulum wurden ebenfalls mit einer Spritze zugegeben.

2.5 Zellzahlbestimmung

Zur mikrobiologischen Charakterisierung der Reaktorbiozönose wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und zur Zahl der kultivierbaren Zellen ins Verhältnis gesetzt. Durch Auswahl geeigneter Substrate wurden unterschiedliche physiologische Gruppen der Reaktorbiozönose kultiviert.

2.5.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl der Bakterien wurde durch eine mikroskopische Zählung bestimmt. Die Probe aus dem Reaktor wurde durch Ultraschall homogenisiert und danach mit Anaerobmedium verdünnt. Die verdünnte Suspension wurde auf einen Polycarbonatfilter (0,2 µm) gezogen und die Bakterien wurden mit DAPI (5 µg/ml) angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden mindestens 1000 Zellen oder 10 Gesichtsfelder (100 µm x 100 µm) ausgezählt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte dann nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{N_{\text{Zellen}}}{A_{\text{Quadrat}} \times N_{\text{Quadrate}}} \times \delta \times A_{\text{Filter}} \times \frac{1}{\text{Verdünnung}}$$

mit:

N = Anzahl

A = Fläche

Mit diesem Verfahren konnte die Gesamtzellzahl bestimmt werden, eine Aussage über die Anzahl kultivierbarer Zellen war damit jedoch nicht möglich.

2.5.2. Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen

Die Anzahl der kultivierbaren Zellen wurde mit Most Probable Number-(MPN) Tests geschätzt (Gavin und Cummings 1978). Die Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Zellen erfolgte mit Melasseschlempe (10 % vol/vol) als Substrat. Dabei wurde ausschließlich die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bewertet.

Die Abschätzung der Anzahl kultivierbarer Zellen einzelner physiologischer Gruppen im Reaktor ließ sich mit Hilfe von selektiven Substraten, beziehungsweise durch den Nachweis spezifischer Stoffwechselprodukte in MPN-Ansätzen durchführen.

Für homoacetogene Bakterien ist ein colorimetrisches Verfahren beschrieben, bei dem die Bildung eines farbigen Komplexes die Entstehung typischer Stoffwechselprodukte von Homoacetogenen anzeigt (Harriott und Frazer 1997). Homoacetogene Bakterien können aromatische und aliphatische Methylether als Kohlenstoffquelle nutzen und die Methoxygruppen durch eine O-Demethylierung zur Synthese von Acetat einsetzen (Bache und Pfennig 1981). Durch die O-Demethylierung von methoxylierten Substraten entstehen Hydroxylgruppen. Benachbarte Hydroxylgruppen bilden mit Ti(III) einen farbigen Komplex, der colorimetrisch nachgewiesen werden kann (Liu 1997). Für den Nachweis homoacetogener Bakterien wurde Trimethoxybenzoat als selektive C-Quelle eingesetzt. Titancitrat diente als Reduktionsmittel. Bei der Inkubation bildete sich ein gelber Hof um die Kolonien, die zur O-Demethylierung fähig waren. Es wurden ausschließlich die Kolonien ausgewertet, die eine Gelbfärbung des Mediums verursachten, auch wenn diese Gelbfärbung bei weiterer Inkubation wieder verschwand.

Die Aktivität von Sulfatreduzierern ließ sich mit Hilfe von Eisenchlorid nachweisen. Das Eisenchlorid bildet mit dem entstehenden Sulfid einen schwarzen Niederschlag

und dient als Nachweis für die biogene Produktion von Sulfid. Um die biogene Sulfidproduktion zu messen, musste auf Natriumsulfid als Reduktionsmittel verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment anstelle von Natriumsulfid Titancitrat als Reduktionsmittel eingesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente ein Gemisch aus verschiedenen Substraten, die von sulfatreduzierenden Bakterien verwertet werden können (Tabelle 2.6). In diesem Ansatz wurden nur Kolonien ausgewertet, die eine charakteristische Schwarzfärbung zeigten. Nur sulfidogene Organismen wurden in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des SRB-Mix-Substrats

| | Arbeitskonzentration | |
|-------------------|----------------------|----------|
| | Flüssigkultur | Tiefagar |
| Natriumacetat | 20 mM | 12 mM |
| Natriumformiat | 20 mM | 12 mM |
| Natriumbenzoat | 20 mM | 12 mM |
| D,L-Lactat (60 %) | 10 mM | 6 mM |
| Ethanol (absolut) | 10 mM | 6 mM |
| Natriumpropionat | 10 mM | 6 mM |
| Natriumbutyrat | 10 mM | 6 mM |

Physiologisch aktive methanogene Archaeen wurden über den gaschromatographischen Nachweis der Methanproduktion detektiert. Der Gaschromatograph (Shimadzu 14B) war mit einer gepackten Stahlsäule (Chromosorb 102, 60-80 Mesh, Macherey & Nagel, Düren; 305 mm Länge, 3,2 mm Stärke, 2 mm Innendurchmesser) und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor ausgerüstet. Als Trägergas diente Stickstoff. Die Injektortemperatur betrug 100 °C und die Säulentemperatur war auf 50 °C eingestellt. Die Messung wurde isotherm durchgeführt. Der Brückenstrom des Wärmeleitfähigkeitsdetektors betrug 85 mA, die Temperatur des Detektors 100 °C. 10 µl der Gasprobe wurde splitlos injiziert. Die Eichung für Wasserstoff, Methan und Kohlendioxid erfolgte mit Gasstandards der Fa. Messer-Griesheim (Düsseldorf).

Als Substrat für methanogene Archaeen wurde ein Gemisch aus Acetat, Formiat, Trimethylamin und Methanol (je 10 mM) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Atmosphäre mit Wasserstoff angereichert. Die Bestimmung der Zellzahl von Methanogenen erfolgte nicht in Tiefagarshakes sondern in Flüssigkultur, damit das gebildete Methan ungehindert in die Gasphase diffundieren konnte.

2.6 Isolierung der Organismen

Die Kultivierung der Organismen erfolgte in der Regel in einem sulfidreduzierten, bicarbonat-gepufferten Mineralmedium, dem die jeweiligen Substrate für eine physiologische Gruppe zugegeben wurden. Der Einsatz des Redoxindikators Resazurin ermöglichte die Kontrolle des Redoxpotentials im Medium. Die Kulturen wurden nach der Hungate-Technik mit einem Gasgemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid begast (Hungate 1969). Die Anreicherung und Isolierung der Organismen erfolgte in Tiefagarverdünnungsröhrchen. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette ließen sich einzelne Kolonien aus diesen Tiefagarröhrchen picken und anoxisch in eine weitere Verdünnungsreihe überführen. Auf diese Weise war es möglich, auch sehr sauerstoffempfindliche Organismen zu isolieren. Insgesamt wurden 7 verschiedene Kombinationen von C-Quellen und Elektronenakzeptoren eingesetzt, mit denen unterschiedliche Vertreter der Reaktorpopulation erfasst werden sollten (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Isolierung mit verschiedenen Substraten

| Substrate | physiologische Gruppe |
|---|----------------------------|
| Cellulose (1 %), Melasseschlempe (10 %) | hydrolysierende Organismen |
| Glucose, Ethanol, Lactat | Gärer |
| SRB-MIX Formiat, Acetat, Butyrat (je 20 mM) Propionat, Benzoat Ethanol Lactat (je 10 mM) Sulfat als Elektronenakzeptor | Sulfatreduzierer |
| Trimethoxybenzoat | Homoacetogene |

2.7 Molekularbiologische Methoden

Die Reaktorpopulation und die daraus gewonnenen Reinkulturen wurden zusätzlich mit Hilfe molekularbiologischer Methoden charakterisiert. Zu diesen molekularbiologischen Methoden gehören zum einen die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, und zum anderen die phylogenetische Einordnung der Isolate mit Hilfe der Sequenzdaten des 16S rRNA-Gens.

2.7.1. In situ Hybridisierung

Mit Hilfe der in situ Hybridisierung lassen sich Aussagen über die Populationszusammensetzung (Amann und Schleifer 1995) und, in eingeschränktem Umfang, über die Aktivität von Einzelzellen in einem System machen (Poulsen et al.

1993). Bei der in situ Hybridisierung binden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide an komplementäre Zielstrukturen innerhalb der ribosomalen RNA der Zelle. Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axioplan, ausgestattet mit 100 W) lassen sich die so markierten Einzelzellen detektieren und ihre physiologische Aktivität abschätzen. Durch die geeignete Wahl der Oligonukleotide ist es möglich, eine Population auf allen phylogenetischen Ebenen zu untersuchen.

Fixieren der Zellen

Die Fixierung diente zur Vorbereitung der Zellen auf die Hybridisierung. Proben aus dem Reaktor wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (2 min, 10.000 x g) und in einer 3,7 % Formaldehydlösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation zentrifugiert, und das Pellet wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 100 – 500 µl 1 x PBS resuspendiert und mit der gleichen Menge Ethanol (96 %) versetzt.

Alternativ wurde mit Ethanol fixiert. Diese Vorgehensweise wird für Gram positive Zellen empfohlen (Beimfohr et al. 1993). Hierfür wurden die Proben aus dem Reaktor abzentrifugiert, mit Ethanol (70 %) versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 – 500 µl 1 x PBS resuspendiert und mit der gleichen Menge konzentriertem Ethanol versetzt. Die Lagerung der fixierten Zellen erfolgte bei -20 °C.

Hybridisierung

Für die Untersuchung der Reaktorpopulation wurden ausschließlich Cy3-markierte Oligonukleotidsonden eingesetzt. Der Einsatz von grünen Fluorochromen war nicht möglich, da die Reaktormatrix eine grünliche Autofluoreszenz aufwies, die das Sondersignal überlagerte. Eine nichtselektive Gegenfärbung mit DAPI ermöglichte die Bestimmung des Anteils verschiedener phylogenetischer Gruppen an der Reaktorpopulation.

Es wurde ein Ansatz gewählt, bei dem zuerst mit domänenspezifischen Sonden hybridisiert wurde, um einen Überblick über die Biozönose im Reaktor zu erhalten. Danach folgten detaillierte Untersuchungen mit Sonden, die spezifisch einzelne Gattungen hybridisierten. Die eingesetzten Oligonukleotidsonden sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.8: Eingesetzte Oligonukleotidsonden für die in situ Hybridisierung

| Zielorganismen | Sonde | Referenz |
|--|-----------------|--------------------------|
| Alle Organismen | Univ1392 | (Stahl et al. 1988) |
| Archaeen | ARCH915 | (Stahl und Amann 1991) |
| Euryarchaeota | EURY499 | (Burggraf et al. 1994) |
| Crenarchaeota | Cren498 | |
| <i>Methanosarcinaceae</i> | MSMX860 | |
| <i>Methanosarcina</i> spec. | MS821 | |
| <i>Methanosaeta</i> spec. | MX825 | (Raskin et al. 1994b) |
| <i>Methanomicrobiales</i> | MG1200 | |
| <i>Methanobacteriaceae</i> | MB310 | |
| Bacteria | EUB338 | (Stahl et al. 1988) |
| Gram positiv, hoher G+C-Gehalt | HGC69 | (Roller et al. 1994) |
| <i>Proteobacteria</i> | | |
| α - <i>Proteobacteria</i> | ALF1b | |
| β - <i>Proteobacteria</i> | BET42a | (Manz et al. 1992) |
| γ - <i>Proteobacteria</i> | GAM42a | |
| δ - <i>Proteobacteria</i> | SRB385 | (Amann et al. 1990) |
| | SRB385Db | (Rabus et al. 1996) |
| | DSV1292 | |
| <i>Desulfovibrio</i> spp. | DSV698 | (Manz et al. 1998) |
| <i>Desulfosarcina</i> spec. | DSS658 | |
| <i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides</i> | CFB 319 a/b | (Manz et al. 1996) |
| Gram positiv, niedriger G+C-Gehalt | LGC354 a-c | (Meier et al. 1999) |
| Cluster I | Clost I | (Weber 2000) |
| <i>Clostridium butyricum</i> | Cby1022 | (Bockelmann et al. 2000) |
| Cluster III | Clost III | |
| Cluster IV | Clost IV | |
| | Clost XIVa | (Weber 2000) |
| Cluster XIV | ClostXIVa-c | |
| | ClostXIVa-amino | |
| obligat syntrophe Organismen | MPOB | (Harmsen et al. 1996a) |
| | SYB701 | (Sekiguchi et al. 1999) |

2.7.2. Phylogenetische Einordnung der Isolate über vergleichende 16S rDNA

Analyse

Die phylogenetische Einordnung der Isolate erfolgte über einen Sequenzvergleich der 16S rDNA der Isolate aus dem Reaktor mit bereits publizierten Sequenzen in der Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die 16S rDNA ist ein geeigneter Marker für eine

phylogenetische Einordnung von Bakterien, da für diese Untersuchung ein ausreichend großer Datensatz vorhanden ist.

Zellaufschluss und DNA-Isolierung

Die Lysis von Bakterien wurde anfangs nach der Lysozym/SDS-Methode (Marmur 1961) durchgeführt. 1 ml Zellsuspension einer Reinkultur wurde zentrifugiert (10.000 x g, 10 min) und das Pellet wurde mit Lysispuffer (0,15 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 20 µl Lysozym (10 mg/ml in Lysispuffer) und 2 µl frisch angesetzter Proteinase K (20 mg/ml) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 40 µl 25 % SDS dazugegeben und weitere 10 min bei 60 °C inkubiert.

Die Isolierung der DNA aus dem Zellaufschluss erfolgte mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch. Das Zellysate wurde mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1 vol/vol) versetzt und gründlich vermischt. Anschließend wurde bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß erneut mit Phenol/Chloroform gewaschen. Insgesamt wurde dieser Extraktionsschritt dreimal wiederholt. Die Fällung der DNA aus der wässrigen Phase erfolgte mit 180 µl 3 M Natriumacetat und 500 µl eiskaltem Ethanol. Die ausgefallene DNA wurde bei 10.000 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

Verschiedene Isolate ließen sich mit dieser Methode nur schwer aufschließen. Daher wurde alternativ mit dem FastPrep-Gerät (Qbiogene) gearbeitet. Hierbei wird der Zellaufschluss mechanisch erreicht und die Ausbeute und Qualität der DNA war zufriedenstellend. Zellaufschluss und DNA-Isolierung erfolgten nach Vorgabe des Herstellers.

DNA-Quantifizierung

Die DNA-Ausbeute wurde photometrisch bestimmt. DNA wurde über die Absorption bei 260 nm quantifiziert (Sambrook et al. 1989). Da diese Messung empfindlich auf pH-Schwankungen und auf den Salzgehalt des eingesetzten Lösungsmittels reagiert, wurde die DNA in Na₂HPO₄ (3 mM, pH 8,5) verdünnt (Wilfinger et al. 1997). Die Qualität der DNA wurde über den Quotienten der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm ermittelt. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass

in einigen Fällen eine Absorption bei 260 nm nicht unbedingt auf das Vorhandensein von DNA zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Nachweis in einem Agarosegel (E-gel 1,2 %, Fa. Invitrogen, Groningen, NL) durchgeführt. Die DNA wurde im Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und durch Fluoreszenz im UV-Licht (260 nm) nachgewiesen.

Amplifikation der 16S rDNA

Zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens wurde die PCR-Technik verwendet. Als Primer dienten dabei pro Ansatz 20 pmol der universellen Primer 616V (5'-AGA GTT TGA TC/TA/C TGG CTC AG-3') und 1492R (5'-CGG C/TTA CCT TGT TAC GAC-3'). Die PCR-Ansätze enthielten jeweils 200 µM jedes Desoxynukleotids (A,T,G,C), zwischen 1,5 und 4,5 mM MgCl₂, 1 % (vol/vol) Dimethylsulfoxid, PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, pH 8,0), etwa 100 ng genomische DNA und 2,5 U Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim oder Promega, Madison, USA). Die PCR wurde in einem Personal Cycler (Fa. Biometra, Göttingen) durchgeführt. Dabei wurde die Polymerase erst nach einem ersten 2-minütigen Denaturierungsschritt bei 96 °C zugegeben. Es wurden insgesamt 35 Zyklen bei 94 °C für 45 s, 55 °C für 2 min und 72 °C für 3 min mit einem Zeitinkrement von 5 s pro Zyklus durchgeführt. Eine abschließende 10-minütige Inkubation bei 72 °C erlaubte die vollständige Polymerisation der Amplifikate. Ein Amplifikat wurde nur dann weiter verwendet, wenn in der Negativkontrolle, der keine DNA zugesetzt wurde, keine Banden zu sehen waren. PCR-Amplifikate wurden vor der Sequenzierung über ein Reinigungskit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) nach Vorgabe des Herstellers von Resten genomischer DNA, Primern und Nukleotiden abgetrennt.

Kontrolle der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in einem Agarosegel (E-gel 1,2 %, Fa. Invitrogen) überprüft. Als Größenmarker wurden 2,5 µl DNA-Längenstandard III (Fa. Boehringer Mannheim) mit 2 µl Gel-Ladepuffer und 7,5 µl TAE-Puffer gemischt. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 75 V. Die DNA-Banden wurden durch Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 260 nm unter einem Transilluminator (Fröbel Laborbedarf) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (Polaroid).

Cyclesequencing

Das Cyclesequencing wurde mit dem Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems) vorgenommen. Dieses Kit enthält neben unmarkierten Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die einen Kettenabbruch der PCR bewirken, wenn sie in den Nukleotidstrang eingebaut werden. Die verschiedenen Nukleotide waren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da der Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide statistisch erfolgte, kam es an jeder Stelle im Nukleotidstrang zu einem Kettenabbruch. Dadurch entstanden DNA-Stränge, die aufgrund ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten. Die im Cyclesequencing entstandenen Nukleotidstränge waren terminal markiert und ließen sich nach einer elektrophoretischen Trennung photometrisch nachweisen.

Beim Cyclesequencing wurden 4 µl des Big Dye Kits mit 5 µl PCR-Produkt (DNA-Gehalt 50 ng/µl) gemischt und 1 µl des Primers (Konzentration 1 pM) zugegeben (Medlin et al. 1988). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Oligonukleotidsequenzen und Positionen der eingesetzten Primer

| Primer | Richtung | Oligonukleotidsequenzen (5'-3') | Positionen ^a |
|--------|-----------|---------------------------------|-------------------------|
| 616V | vorwärts | AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG | 8-28 |
| 610R | rückwärts | ACC GCG GCT GCT GGC AC | 515-531 |
| 610V | vorwärts | GTG CCA GCA GCC GCG GT | 515-531 |
| 699R | rückwärts | RGG GTT GCG CTC GTT | 1099-1114 |
| 1492Rb | rückwärts | CGG YTA CCT TGT TAC GAC | 1492-1507 |

^a *E.coli* Nummerierung nach (Brosius et al. 1981)

Die Sequenzierreaktionen wurden in einem Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) unter folgenden Reaktionsbedingungen vorgenommen:

1. Schritt: 2 Minuten Denaturierung bei 96 °C
2. Schritt: 35 Zyklen
 - 10 Sekunden 96 °C
 - 5 Sekunden 50 °C
 - 4 Minuten 60 °C
3. Schritt: Nachdem das Programm durchlaufen war, wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und die Temperatur konstant gehalten

Nach dem Cyclesequencing wurden die nicht umgesetzten Terminatoren durch Ethanol-fällung abgetrennt. Dazu wurden die Sequenzieransätze mit 85 µl Wasser, 275 µl Ethanol und 10 µl Natriumacetat (3 M) versetzt. Dextranblau (5 µl) wurde

eingesetzt, um die DNA-Pellets erkennen zu können. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 20 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde ein zweites Mal mit 250 µl Ethanol (70 %) gewaschen.

Sequenzierung der 16S rDNA

Die Sequenzierung der 16S rDNA erfolgte bei verschiedenen Dienstleistern (Fa. MWG Biotec, München; SeqLab, Göttingen, Sequenzierservice Meixner, Berlin). Zusätzlich wurde auf einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) sequenziert. Zur Vorbereitung der Analyse wurden die getrockneten PCR-Produkte aus der Cycle sequencing Reaktion mit 25 µl TSR-Reagenz (PE Applied Biosystems) versetzt und bei 95 °C denaturiert. Nach dem Denaturierungsschritt wurden die Proben auf Eis gestellt und bis zur Analyse kalt gelagert. Die Sequenzierung erfolgte unter folgenden Parametern:

Kapillarsäule : 30 cm, ID 50 µm
Polymer : POP6 (PE Applied Biosystems)
Spannung : 15 kV

Die terminal markierten DNA-Stränge wurden bei den Wellenlängen 540 nm (markiertes Guanin), 570 nm (markiertes Adenin), 600 nm (markiertes Thymin) und 620 nm (markiertes Cytosin) detektiert.

Phylogenetische Einordnung der Isolate

Die phylogenetische Einordnung der Isolate erfolgte über einen Abgleich mit bekannten 16S rDNA-Sequenzen aus verschiedenen Quellen. Zuerst mussten die Teilsequenzen einer 16S rDNA zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt werden. Dazu wurde das Programm CAP (Contig Assembly Program) eingesetzt und das Ergebnis manuell korrigiert. Die erhaltene Vollsequenz wurde anschließend über eine BLAST-Suche mit bekannten Sequenzen aus der GenBank Sequence Database verglichen (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Zusätzlich wurde die Sequenz in den Datensatz des ARB-Programms eingeordnet. Wenn in der GenBank Sequenzen gefunden wurden, die nicht in der Datenbank des ARB-Programms vorhanden waren, wurden diese vor der phylogenetischen Einordnung in die Datenbank geladen. Die Einordnung der Sequenz in die

entsprechende phylogenetische Gruppe erfolgte anhand der Primär- und der Sekundärstruktur der ribosomalen DNA. Dazu wurden die jeweils homologen Nukleotidpositionen in Spalten angeordnet. Der automatische Sequenzvergleich wurde überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Distanz-Matrices der angepassten Sequenzen wurden nach der Methode von Jukes und Cantor erstellt (Jukes und Cantor 1969). Phylogenetische Bäume wurden nach der neighbour joining Methode von Saitou und Nei berechnet (Saitou und Nei 1987).

2.8 Populationsbiologische Untersuchungen

Aus den gewonnenen Daten der Isolierung und phylogenetischen Zuordnung der Isolate wurden Parameter abgeleitet, die als Schätzer für die Beschreibung der mikrobiellen Population dienen können. Die Artenzahl (species richness, S) wurde mit verschiedenen Methoden berechnet, um einen Anhaltspunkt für die Effizienz der Kultivierung zu bekommen.

$$\text{Chao1: } S = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2} \quad (\text{Chao 1984})$$

$$\text{Chao2: } S = S_{obs} + \frac{Q_1^2}{Q_2} \quad (\text{Chao 1987})$$

$$\text{Jack Knife1: } S = S_{obs} + Q_1 \left(\frac{m-1}{m} \right) \quad (\text{Burnham und Overton 1978; Burnham und Overton 1979})$$

$$\text{Jack Knife 2: } S = S_{obs} + \left[\frac{Q_1(2m-3)}{m} - \frac{Q_2(m-2)^2}{m(m-1)} \right] \quad (\text{Smith und van Belle 1984})$$

mit:

- S = geschätzte Artenzahl
- S_{obs} = Zahl der beobachteten Arten in allen Proben
- F_1 = Zahl der Arten mit nur einem Vertreter in den gepoolten Proben
- F_2 = Zahl der Arten mit nur zwei Vertretern in den gepoolten Proben
- Q_1 = Zahl der Arten die nur in einer Probe auftreten
- Q_2 = Zahl der Arten, die nur in zwei Proben auftreten
- m = Anzahl der Proben

Als Probe wurde ein Kultivierungsansatz mit einer definierten Kohlenstoffquelle definiert. Alle aus diesen Ansätzen gewonnenen Isolate wurden dieser Probe zugerechnet. Die Berechnung der Werte für die Artenzahl wurde mit dem Programm BioDiversityPro durchgeführt (McAleece 1997). Die genannten Formeln errechnen eine Sättigungskurve, in der die Artenzahl gegen die Probenzahl oder alternativ gegen die Individuenzahl aufgetragen wird. Nach einer Kurvenanpassung der gewonnenen Daten lässt sich durch eine Extrapolation die Artenzahl abschätzen, die bei einer häufigeren Beprobung hätte erzielt werden können.

Durch den Einsatz unterschiedlicher selektiver Medien wurde in den einzelnen Probenahmen nur jeweils ein Teil der Population erfasst. Durch einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Ansätze (Zahl der unterschiedlichen Spezies, Zahl der Reinkulturen) ließ sich die Effizienz der gewählten Kultivierungsbedingungen bezüglich der Kultivierung von Mikroorganismen aus dem untersuchten System vergleichen. Dazu wurde die Rarefaction-Methode eingesetzt, die von Sanders entwickelt und von Hurlbert modifiziert wurde (Hurlbert 1971; Sanders 1968). Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$E(S) = \sum \left\{ 1 - \left[\frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \right\}$$

mit :

- E(S) = geschätzte Zahl der Arten in der Probe
- n = standardisierte Probengröße
- N = Anzahl der Individuen in einer Probe
- N_i = Anzahl der Individuen der Art *i* in der Probe

Da populationsbiologische Abschätzungen für diese Studie ursprünglich nicht geplant waren, wurde bei der Isolierung der Bakterien eine möglichst hohe Diversität angestrebt. Das bedeutet, dass die Kolonien nicht statistisch ausgewählt wurden, sondern bei der Isolierung auf unterschiedliche Koloniemorphologien geachtet wurde. Weil die Anzahl unterschiedlicher Koloniemorphologien aber begrenzt war, wurden häufig Kolonien mit gleichem Morphotyp ausgewählt.

2.9 Physiologische Untersuchungen

Mit ausgewählten Organismen wurden physiologische Untersuchungen durchgeführt. Diese Untersuchungen umfassten den Abbau substituierter Aromaten und die Aufnahme von Gärspektren mit Hilfe einer HPLC (Waters, Milford, USA). Gemessen wurden kurzkettige Fettsäuren, Di- und Tricarbonsäuren. Die Auftrennung der

Substanzen erfolgte mit einer Aminex HPX 87 H-Säule (BioRad, München). Die Säule hatte eine Länge von 300 mm und einen inneren Durchmesser von 7,8 mm. Vorgesaltet war eine Cation H Guard Säule (BioRad, München). Als Laufmittel diente 5 mM entgaste Schwefelsäure mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die Detektion der Substanzen erfolgte über einen Photodiodenarraydetektor bei 210 nm. Mit dieser Methode konnten Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Citrat, cis-Aconitat, Lactat, Oxalat, Malat, Succinat, Fumarat, und Pyruvat qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

Das Ziel der Untersuchungen war, eine mikrobiologische Charakterisierung eines anaeroben Bioreaktors zur Behandlung von Melasseschlempe durchzuführen und anschließend die gewonnenen Ergebnisse auf eine mögliche Verwertung für die Optimierung der Reaktorsteuerung zu prüfen. Zuerst wurde die mikrobielle Biozönose mit molekularbiologischen Methoden und klassischen mikrobiologischen Methoden untersucht. Danach wurden Untersuchungen zum möglichen Einsatz mikrobiologischer Parameter bei der Reaktorsteuerung und Prozessoptimierung durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden gleichzeitig verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen an den Reaktoren durchgeführt. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse dieser Experimente in einem eigenen Kapitel vorgestellt. Es wurden ausschließlich in situ Hybridisierungen eingesetzt, weil die Ergebnisse dieser Untersuchungen innerhalb weniger Stunden zur Verfügung standen.

3.1 Mikroskopische Untersuchungen

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden eingesetzt, um die Biozönose direkt zu beobachten und um erste Rückschlüsse auf die Aktivität der Zellen gewinnen zu können. Besonderes Augenmerk wurde auf das Auftreten von Teilungsstadien, die Beweglichkeit der Zellen und das Auftreten von Sporen gelegt.

Im lichtmikroskopischen Bild ließen sich vereinzelt Eukaryonten im Reaktor nachweisen. Diese Organismen traten vor allem in der Anfahrphase des Reaktors auf. Hierbei handelte es sich um Hefen und Flagellaten, die nicht weiter bestimmt wurden. Die Bakterien ließen sich im lichtmikroskopischen Bild taxonomisch oder phylogenetisch nur sehr eingeschränkt einordnen. Es konnten unterschiedliche Zellmorphologien beobachtet werden. Coccen, Diplococcen, gerade und gekrümmte Stäbchen, filamentöse Strukturen und große Zellaggregate traten auf. Verschiedene Zellen mit unterschiedlichen Morphologien waren beweglich, aber der größte Teil der Zellen war in Flocken eingebettet. Sporen traten bei verschiedenen Zellen auf und unterschieden sich bezüglich Form und Lage in der Mutterzelle. Die unterschiedlichen Phänotypen ließen auf eine hohe Diversität im Reaktor schließen. Da rein lichtmikroskopische Methoden keine weitere Differenzierung der Reaktorbiozönose zuließen, wurde versucht, mit Färbemethoden mehr Informationen zu gewinnen. Der Einsatz der Gramfärbung zur weiteren Charakterisierung der

Reaktorbiozönose war nicht erfolgreich. Die Ergebnisse waren indifferent und nicht reproduzierbar. Darüber hinaus war es durch die Eigenfärbung der Melasseschlempe, die Flockenbildung und die Einlagerung amorpher Substanzen nicht möglich, ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten (Abbildung 3.1). Deshalb wurden fluoreszenzbasierende Methoden getestet.

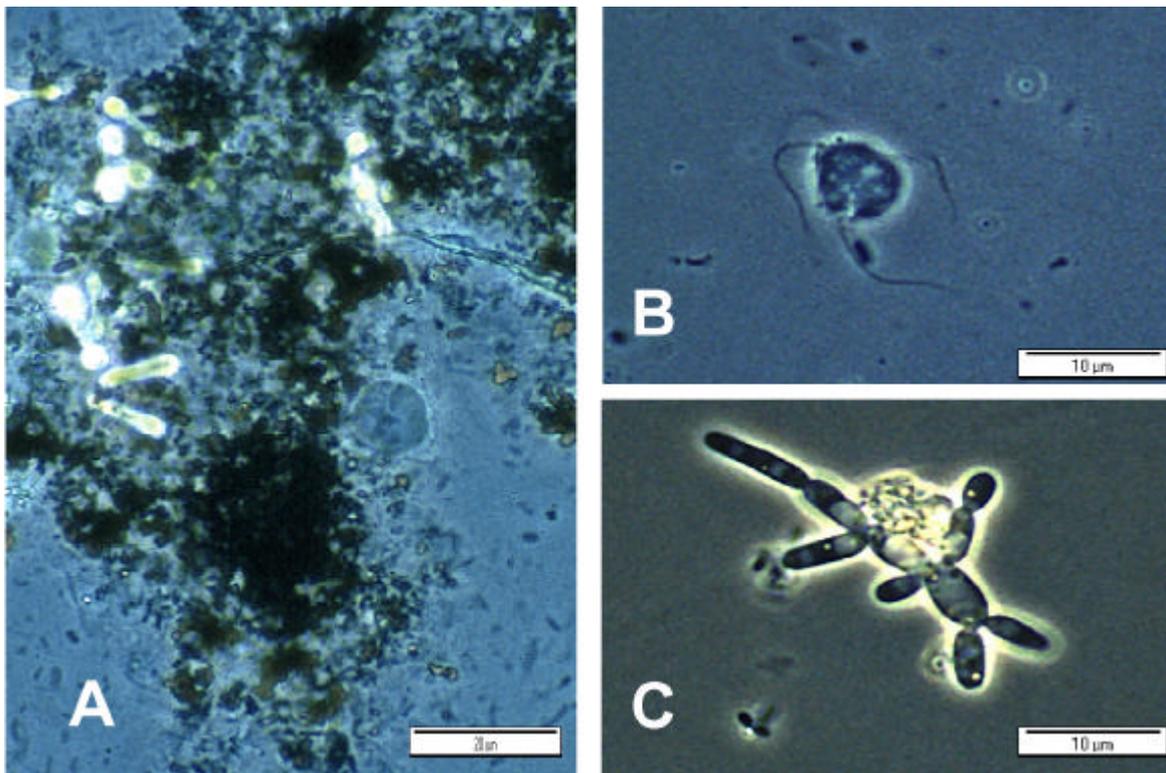


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Reaktorbiozönose. Die Zellen sind häufig zusammen mit amorphen Substanzen in Flocken eingelagert (A). Eukaryonten wie Flagellaten (B) und Hefen (C) konnten beobachtet werden.

Autotrophe Archaeen ließen sich durch Anregung des Cofaktors F_{420} mit Licht einer Wellenlänge von 420 nm nachweisen. Es konnten unterschiedliche Morphotypen, wie kurze Stäbchen, lange gebogene Stäbchen, Coccen und große Agglomerate beobachtet werden. Die Agglomerate ließen sich auch im Durchlicht eindeutig identifizieren und waren oft in Flocken eingebettet (Abbildung 3.2). Diese spezielle Wuchsform konnte überwiegend in nativem Reaktormaterial nachgewiesen werden. In jungen Anreicherungskulturen mit Methanol, Trimethylamin, Acetat, Formiat und H_2/CO_2 wurden diese Agglomerate nur vereinzelt beobachtet. Hier traten in der Regel Coccen und verschiedene Morphotypen stäbchenförmiger Organismen auf. In alten Anreicherungskulturen (2 – 3 Monate) konnten wieder Zellagglomerate gefunden werden.

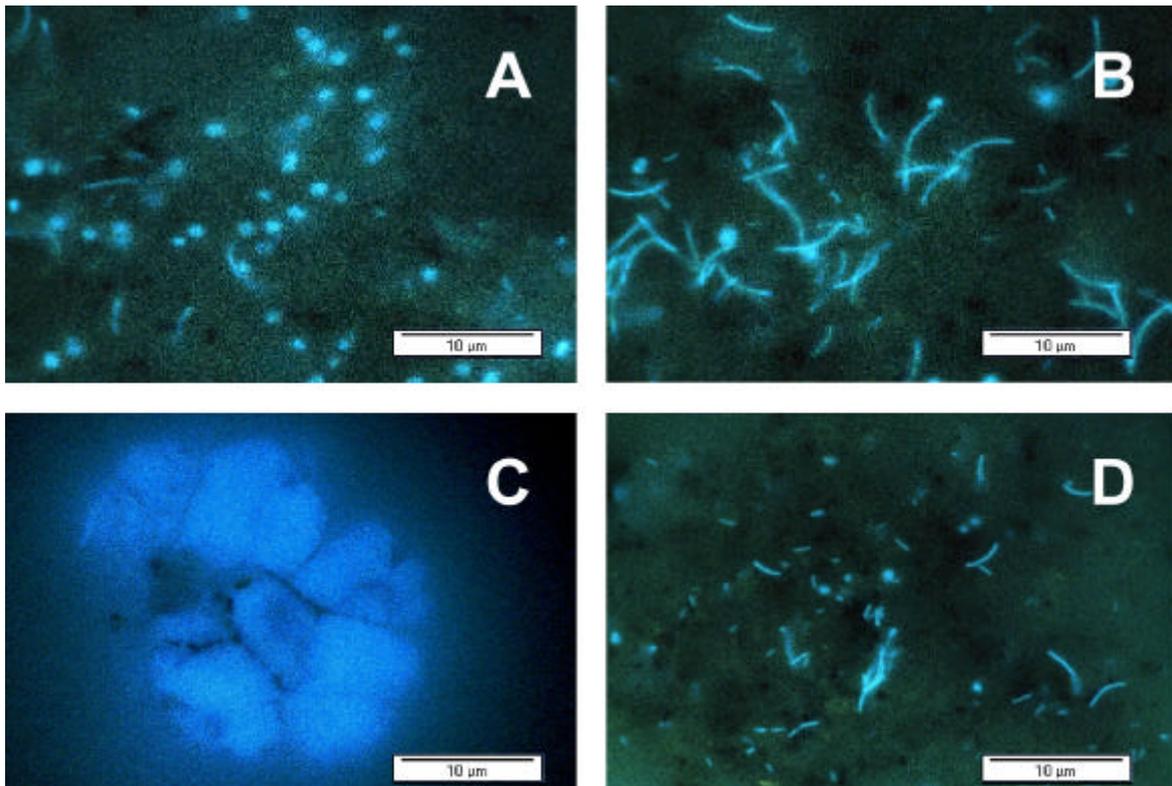


Abbildung 3.2: Autofluoreszenz von methanogenen Archaeen nach Anregung mit ultraviolettem Licht (λ 420 nm). Es lassen sich unterschiedliche Zellmorphologien erkennen, die eine vorläufige taxonomische Zuordnung erlauben. Bild A und Bild C zeigen unterschiedliche Morphotypen von *Methanosarcina* sp (Coccen und Zellagglomerate). Bild B zeigt lange gebogene Stäbchen von *Methanospirillum* sp. Bild D zeigt kurze gerade Stäbchen von *Methanobacterium* sp.

3.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde eingesetzt, um einen Überblick über die Populationszusammensetzung im Reaktor zu erhalten. Für eine aussagekräftige Einschätzung der Möglichkeiten der in situ Hybridisierung wurden zuerst gruppenspezifischen Sonden eingesetzt. In weiteren Untersuchungen wurden spezifische Sonden eingesetzt, um gezielt Vertreter verschiedener phylogenetischer Gruppen anzusprechen.

3.2.1. Allgemeine Hybridisierbarkeit

Mit Hilfe der universellen Sonde (UNIV1392), beziehungsweise domänenspezifischer Sonden (EUB338 und ARCH915) wurde untersucht, welcher Anteil der Population für die in situ Hybridisierung zugänglich war.

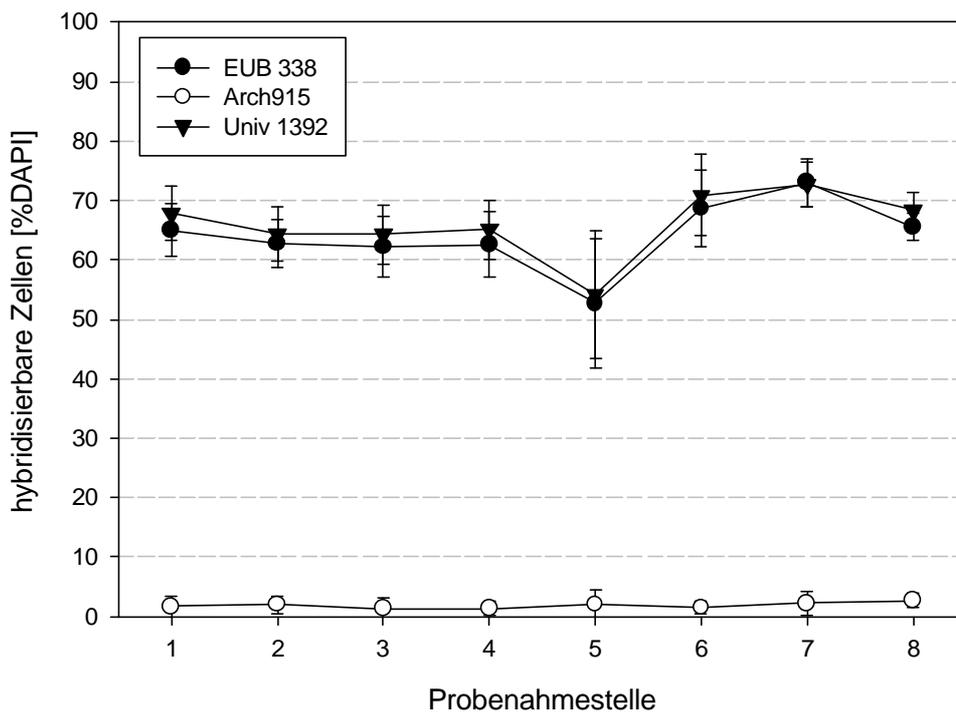


Abbildung 3.3: Anteil der Domänen Bacteria (EUB338) und Archaea (ARCH915) an der hybridisierbaren Gesamtpopulation (UNIV1392)

Eine quantitative Auswertung der Sondensignale im Vergleich zu unspezifischen DAPI-Signalen zeigte, dass an allen Probenahmestellen durchschnittlich zwischen 60 und 75% der Gesamtzellzahl durch in situ Hybridisierung erfasst werden konnten (Abbildung 3.3). Die allgemeine Hybridisierbarkeit (UNIV1392) war dabei in der ersten Reaktorstufe niedriger und lag im Durchschnitt bei 63 %. In der zweiten Reaktorstufe ließen sich etwa 70 % der Gesamtzellzahl mit universellen Sonden hybridisieren. An Probenahmestelle 5, der ersten Probenahmestelle in der zweiten Stufe des Reaktors, war die Hybridisierbarkeit der Zellen schlechter als an allen anderen Probenahmestellen. Nur etwa 55 % der mit DAPI detektierbaren Zellen ließ sich mit der Sonde UNIV1392 hybridisieren und die Signalstärke war deutlich schlechter als an den anderen Probenahmestellen.

Die Zahl der Bakterien, die mit der Sonde EUB338 hybridisierten, lag nur geringfügig unter den Zahlen der Zellen, die mit der universellen Sonde hybridisierten. Die Werte lagen im ersten Reaktorabschnitt bei durchschnittlich 60 % und im zweiten Reaktorabschnitt bei durchschnittlich 68 %. Auch bei diesen Hybridisierungen konnte ein Einbruch der Werte bei Probenahmestelle 5 beobachtet werden. Die Werte fielen auf 52 %, erreichten aber an Probenahmestelle 6 bereits wieder Werte von 68 %

(Abbildung 3.3). Die Sonde EUB338 erfasst nicht alle Organismen in der Domäne Bacteria. Verschiedene Gruppen der *Planctomycetales* und der *Verrucomicrobiales* werden von dieser Sonde nicht abgedeckt. Deshalb wurden modifizierte Sonden entwickelt, mit denen die Domäne Bacteria vollständig erfasst werden kann (Daims et al. 1999). Durch den Einsatz dieser Sonden sollte geprüft werden, ob die EUB338-Sonde für die Hybridisierung der bakteriellen Reaktorpopulation im untersuchten System ausreicht oder ob die Sonden EUB338 II und EUB338 III zusätzlich für die Hybridisierung herangezogen werden müssen.

Der zusätzliche Einsatz der Sonden EUB338 II und EUB338 III resultierte nicht in einer Zunahme der Zahl hybridisierbarer Zellen. Die Domäne Bacteria ließ sich im untersuchten System vollständig mit der Sonde EUB338 erfassen.

Vereinzelt konnten Zellen im mikroskopischen Bild gefunden werden, die zwar mit der Sonde UNIV1392 hybridisierten, nicht aber mit der Sonde EUB338. Der Anteil dieser Zellen war aber durchgehend gering. Eine Hybridisierung mit einer domänenspezifischen Sonde für Archaeen (ARCH915) zeigte, dass die Morphotypen, die mit der EUB338-Sonde nicht hybridisierten von dieser Sonde erfasst wurden. Durchschnittlich konnten etwa 2 % der Gesamtzellzahl mit der Sonde ARCH915 hybridisiert werden.

Obwohl bis zu 70 % der Gesamtzellzahl durch die in situ Hybridisierung erfasst werden konnte, ließen sich verschiedene Zellen weder mit den domänenspezifischen Sonden (EUB338, ARCH915) noch mit der universellen Sonde (UNIV1392) hybridisieren. Probleme bei in situ Hybridisierungen können durch unspezifische Sonden, durch zu geringe Konzentrationen von Ribosomen in den Zellen oder durch Penetrationsprobleme entstehen (Amann und Schleifer 1995).

Abbildung 3.4 zeigt eine Flocke aus dem Reaktor, die mit der Sonde EUB338, hybridisiert wurde. Bildteil A (links) zeigt das Phasenkontrastbild, Bildteil B (rechts) zeigt die Epifluoreszenzaufnahme nach der Hybridisierung. Am unteren linken Rand der Flocke liegen zwei Zellen, die sich gerade geteilt haben. Obwohl es sich offensichtlich um Zellen der gleichen Art handelt, wurde nur eine Zelle hybridisiert.

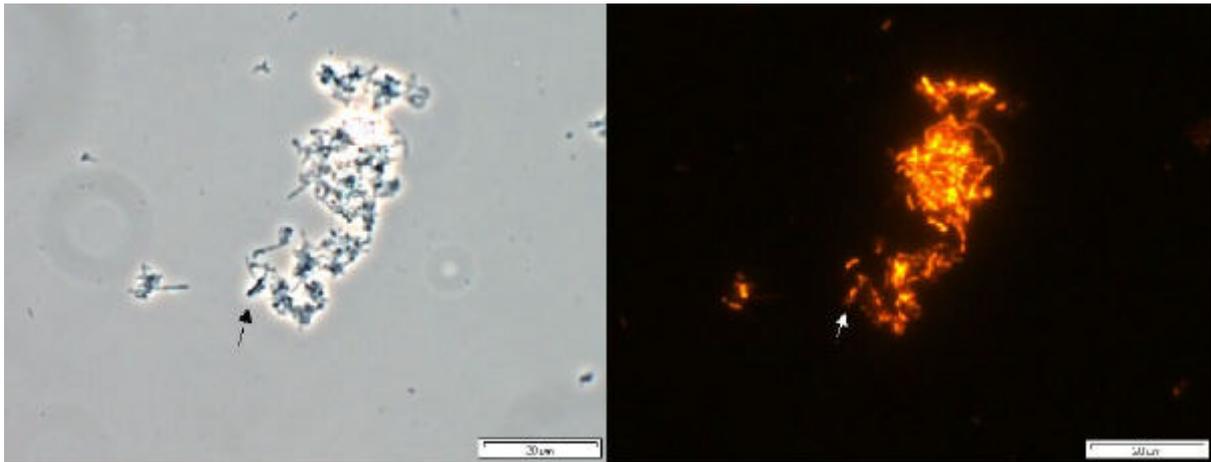


Abbildung 3.4: Reaktormaterial im Phasenkontrastbild (A) und im Epifluoreszenzbild (B). Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde EUB338, einzelne Zellen werden nicht hybridisiert.

Penetrationsprobleme treten in der Regel bei komplexen Zellwandstrukturen auf. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Fixierungsmethoden auf die Hybridisierbarkeit zu untersuchen, wurde Reaktormaterial einmal mit Formaldehyd und einmal mit Ethanol fixiert und anschließend mit der EUB338-Sonde hybridisiert. Die positiven Hybridisierungssignale wurden mikroskopisch ausgezählt und zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt. Diese beiden Messreihen wurden statistisch mit Hilfe des t-Tests miteinander verglichen. Die Voraussetzungen für den t-Test (Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen) wurden im Vorfeld geprüft. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen konnte nicht festgestellt werden. Somit war ein Einfluss unterschiedlicher Fixierungsmethoden auf die Hybridisierbarkeit der Zellen im untersuchten System nicht nachzuweisen.

3.2.2. Gram positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt

Gram positive Organismen mit hohem G+C-Gehalt wurden durch den Einsatz der Sonde HGC69 nachgewiesen. Sie traten über die gesamte Reaktorlänge auf, waren aber nie bestandsbildend. Mit dieser Sonde ließen sich hauptsächlich coccoide Zellen hybridisieren. Andere Zellmorphologien konnten mit dieser Sonde nicht nachgewiesen werden. Diese Zellen waren oft in Flocken eingebettet und traten so selten auf, dass eine quantitative Auswertung nicht möglich war. Der geschätzte Anteil dieser Gruppe lag deutlich unter 0,01 %.

3.2.3. Gram Positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt

Die Vertreter der Gram positiven Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt wurden mit den Sonden LGC354 A-C hybridisiert. Diese Organismen ließen sich an allen Probenahmestellen in hoher Zahl nachweisen. Es traten verschiedene Zellmorphologien auf (coccoide Zellen, gerade und gekrümmte Stäbchen, pleomorphe Zellen). Die Vertreter dieser Gruppe war besonders an den Probenahmestellen 1 – 3 dominant und erreichte einen Anteil von über 40 % an der Gesamtzellzahl. An den anderen Probenahmestellen lag der Anteil der Gram positiven Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt zwischen 25 % und 40 %, wobei die Zahlen an den Probenahmestellen 6 - 8 leicht anstiegen (Abbildung 3.5).

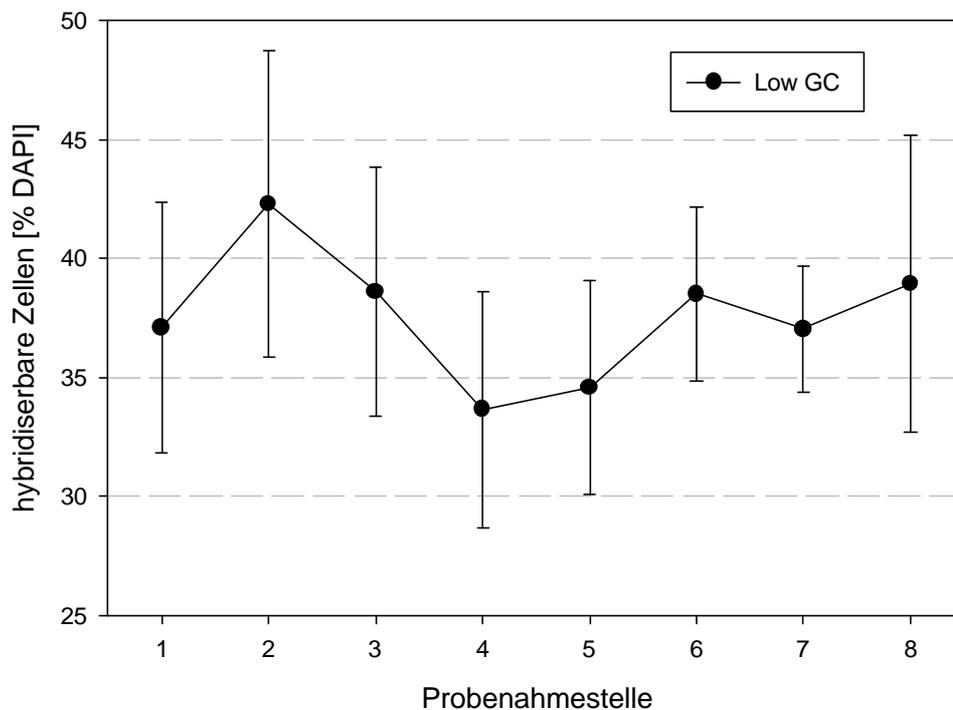


Abbildung 3.5: Verteilung Gram positiver Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt (low G+C) im Reaktor

3.2.4. *Cytophaga Flavobacteria Bacteroides* Gruppe

Das Phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) wurde mit den Sonden CF319a/b und Bac303 untersucht. Vertreter dieses Phylums ließen sich besonders im ersten Reaktorabschnitt an den Probenahmestellen 1 – 4 nachweisen. Hier machte diese Gruppe bis zu 20% der mit DAPI detektierbaren Zellen aus. Nach einem Höchstwert an Probenahmestelle 3 sanken die Zahlen wieder ab. Im zweiten Reaktorabschnitt konnten deutlich weniger Vertreter dieses Phylums nachgewiesen

werden (Abbildung 3.6). Die Morphologien der hybridisierten Zellen waren coccoid bis stäbchenförmig. Filamentöse Strukturen konnten nicht detektiert werden.

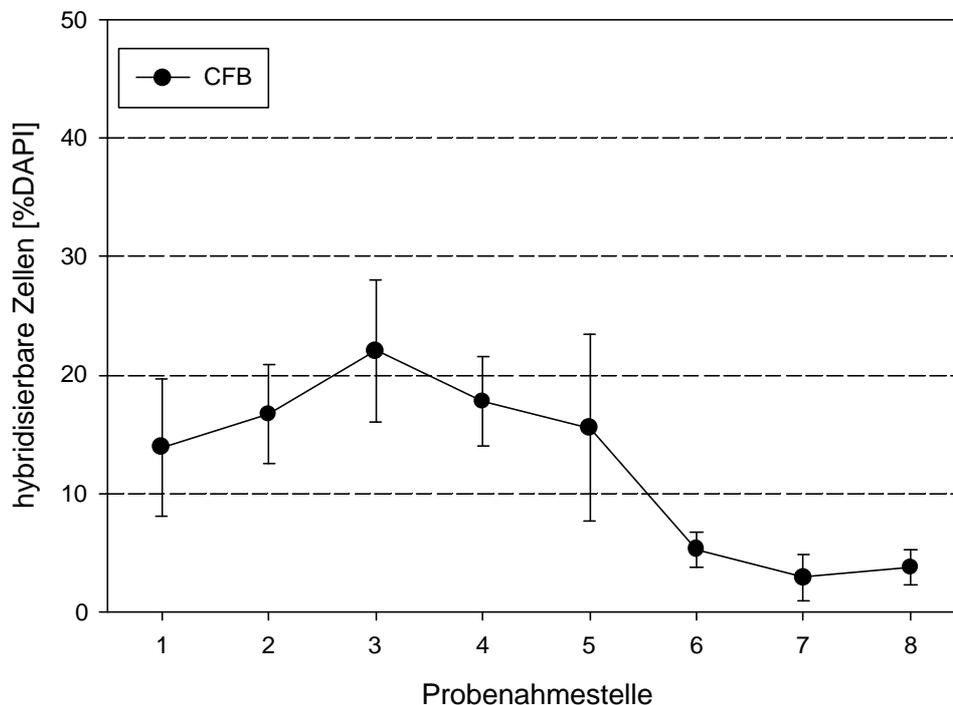


Abbildung 3.6: Verteilung von Vertretern des Phylums *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) im Reaktor

3.2.5. *Proteobacteria*

Die Hybridisierung mit spezifischen Sonden für die Untergruppen der *Proteobacteria* (α -, β -, γ -*Proteobacteria*, sulfatreduzierende Bakterien) ergab, dass die Sulfatreduzierer die dominierende Gruppe der *Proteobacteria* waren. Die Vertreter der anderen Gruppen traten nur vereinzelt auf und ließen sich nur im vorderen Reaktorabschnitt detektieren. Die sulfatreduzierenden Bakterien waren am stärksten im mittleren Reaktorabschnitt vertreten. Ihr Anteil an der mit DAPI detektierbaren Gesamtzellzahl betrug an Probenahmestelle 4 fast 25 %. Der Anteil der Sulfatreduzierer an der Gesamtzellzahl lag etwas höher als der Anteil des Phylums CFB. Im Gegensatz zur Verteilung der CFB sank der Anteil der SRB aber im hinteren Reaktorabschnitt nicht deutlich ab, sondern blieb bei Werten zwischen 10 % und 15 % der mit DAPI detektierbaren Zellen (Abbildung 3.7). Eine genauere Untersuchung mit gattungsspezifischen Sonden für die Familien *Desulfovibrionaceae* (DSV698 und DSV1292) und *Desulfobacteriaceae* (DSMA488, DSBO224, DSB985, Sonde 221, DSS658, DBB660) zeigte, dass die Zellen ausschließlich mit Sonden für

die Gattung *Desulfovibrio* hybridisierten. Während bei einer Hybridisierung mit der Sonde SRB338db Zellen mit verschiedenen Morphologien hybridisiert wurden, ließ sich beim Einsatz der gattungsspezifischen Sonden (Tabelle 2.8) nur noch eine Zellmorphologie (Vibrionen) detektieren.

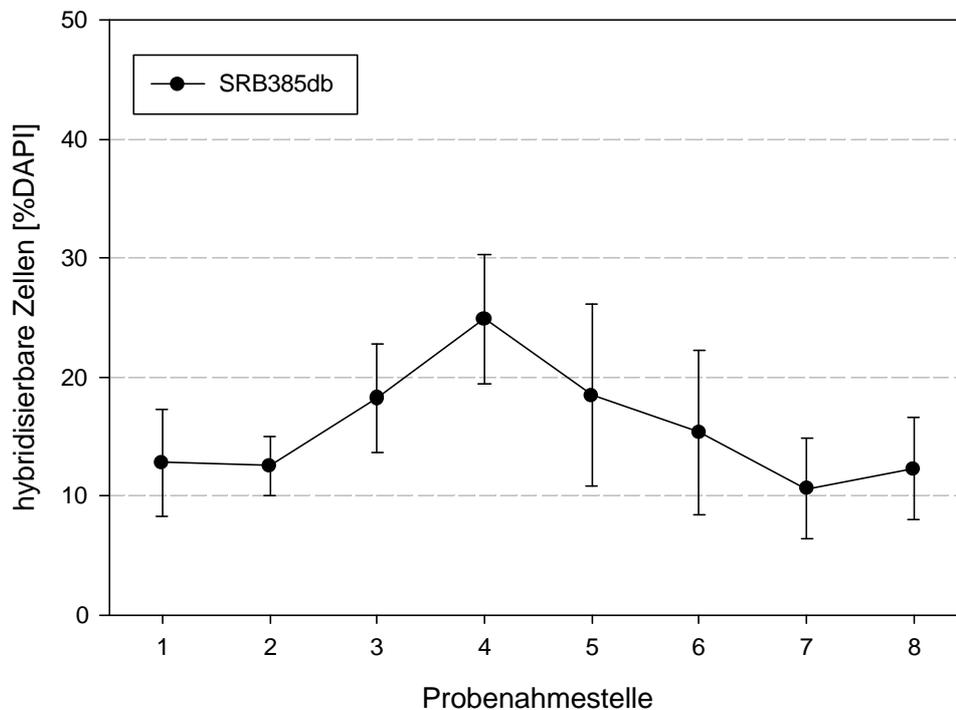


Abbildung 3.7: Verteilung von Vertretern der α -Proteobacteria im Reaktor, ermittelt mit der Sonde SRB385db

3.2.6. Archaeen

Die Hybridisierung der Reaktorpopulation mit Sonden für Archaeen (ARCH915) und mit gattungsspezifischen Sonden für verschiedene Methanogene ergab, dass methanogene Archaeen über die gesamte Reaktorlänge nachweisbar waren. Der Anteil der Archaeen an der mit DAPI detektierbaren Gesamtpopulation lag dabei zwischen 1 % und 3 %. Der Anteil der Archaeen stieg über die Reaktorlänge leicht an und erreichte an Probenahmestelle 8 den höchsten Wert. Hier wurden 2,5 % der mit DAPI detektierbaren Zellzahl als Archaeen identifiziert (Abbildung 3.9).

Eine Hybridisierung mit Sonden für die Subdomänen *Euryarchaeota* (Eury499) und *Crenarchaeota* (Cren498) zeigte, dass ausschließlich mit der *Euryarchaeota*-spezifischen Sonde Zellen detektiert werden konnten. *Crenarchaeota* ließen sich nicht nachweisen. Positive Hybridisierungssignale ließen sich mit den spezifischen Sonden für die Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* und

Methanosarcinales erzielen (Abbildung 3.8). Bei der Hybridisierung mit Sonden für die Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales* konnten nur coccoide Zellen, Sarcinen und große Zellagglomerate nachgewiesen werden. Vertreter der Gattung *Methanosarcina* sind acetoklastische Methanogene und können Acetat zu Methan und CO₂ umwandeln. Ein weiterer Vertreter der acetoklastischen Methanogenen, *Methanosaeta* sp., konnte im Reaktor nicht über in situ Hybridisierung nachgewiesen werden. Auch in Anreicherungskulturen mit Acetat als C-Quelle konnte *Methanosaeta* sp. nur vereinzelt und in sehr geringen Zellzahlen gefunden werden.

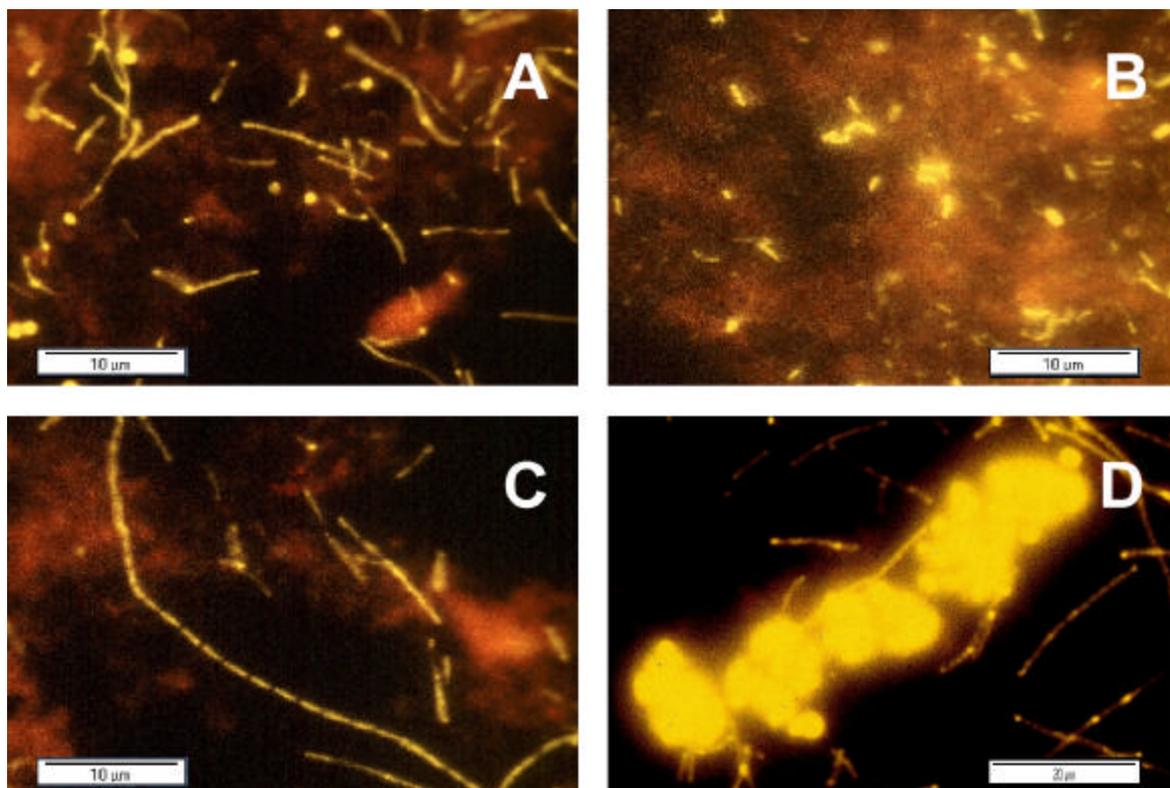


Abbildung 3.8: Hybridisierungen mit Sonden für methanogene Archaeen zeigten das Auftreten unterschiedlicher Zellmorphologien. Es konnten lange gebogene Stäbchen (A), kurze Stäbchen (B), Zellketten (C) und Zellagglomerate (D) nachgewiesen werden.

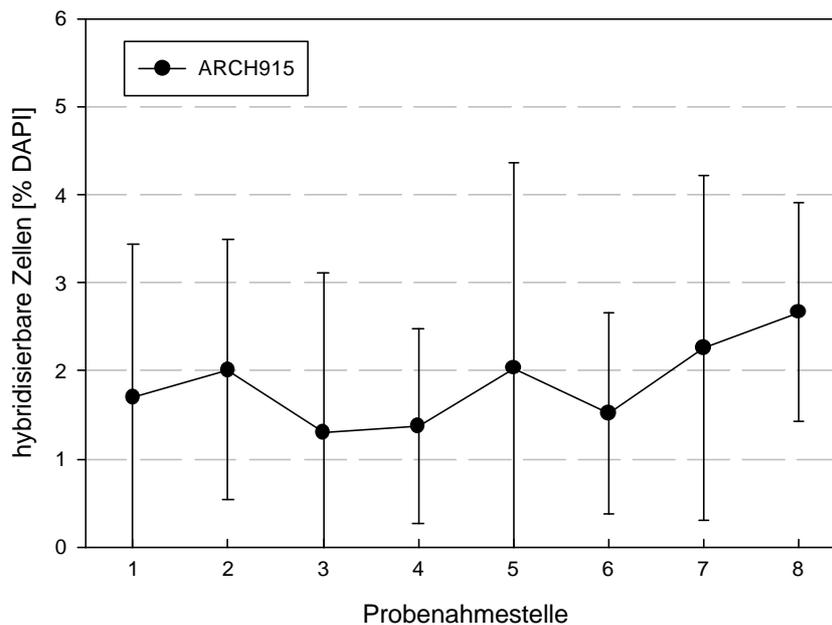


Abbildung 3.9: Verteilung der Domäne Archaea im Reaktor, ermittelt mit der Sonde ARCH915.

3.3 Most Probable Number (MPN)-Untersuchungen

Die MPN-Ansätze sollten einen Überblick über die Kultivierbarkeit der Zellen im Reaktor geben und waren gleichzeitig der Ausgangspunkt für die Isolierung der Organismen. Dabei wurden durch die Wahl unterschiedlicher Substrate verschiedene physiologische Gruppen angesprochen. Bei diesen Untersuchungen handelt es sich um Schätzungen der wahrscheinlichen Zellzahl anhand von statistischen Tabellen. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden drei MPN-Experimente durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse schwankten an den einzelnen Probenahmestellen nur wenig und lagen innerhalb einer Größenordnung. Änderungen im Profil der Verteilung einzelner physiologischer Gruppen traten nicht auf.

3.3.1. Bestimmung der Zahl kultivierbarer Zellen

Die Bestimmung der kultivierbaren Zellen wurde mit Melasseschlempe als Substrat durchgeführt. Dabei wurde einzig die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bewertet. Als Bezugsgröße wurde die Gesamtzellzahl über eine DAPI Anfärbung bestimmt und mit der Zahl der koloniebildenden Einheiten ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 3.10 zeigt die Verteilung der kultivierbaren Zellen im Reaktor im Vergleich zur Gesamtzellzahl, die über eine mikroskopische Zählung auf einer Membran ermittelt wurde.

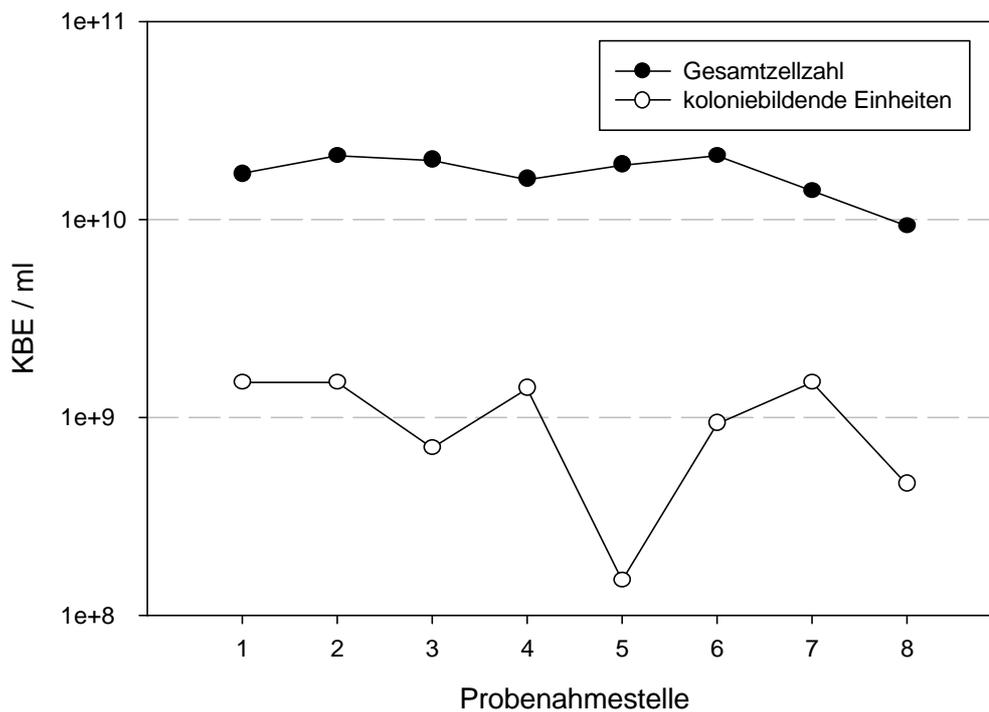


Abbildung 3.10: Verteilung der Anzahl kultivierbarer Zellen im Reaktor

Die Gesamtzellzahl war relativ gleichmäßig über die Reaktorlänge verteilt. Sie lag zwischen $9,3 \times 10^9$ und $2,1 \times 10^{10}$ Zellen/ml mit durchschnittlichen Werten von $1,7 \times 10^{10}$ Zellen/ml. Die niedrigsten Werte wurden an Probenahmestelle 8 bestimmt. Die Zahl der kultivierbaren Zellen lag mit durchschnittlich 1×10^9 Zellen/ml etwa eine Größenordnung unter der Gesamtzellzahl. An Probenahmestelle 5, der ersten Probenahmestelle in der zweiten Stufe des Reaktors sank die Zahl der kultivierbaren Zellen um fast eine Größenordnung auf $4,6 \times 10^8$ Zellen/ml. An den Probenahmestellen 6 und 7 stieg die Zahl der kultivierbaren Zellen wieder auf Werte über 1×10^9 Zellen/ml. An Probenahmestelle 8 fiel die Zahl der kultivierbaren Zellen deutlich unter 1×10^9 Zellen/ml (Abbildung 3.10).

Mit Melasseschlempe als Substrat ließen sich etwa 10 % der Zellen im Reaktor kultivieren. Mit Ausnahme von Probenahmestelle 5 war die Verteilung der kultivierbaren Zellen über die Reaktorlänge gleichmäßig.

3.3.2. Bestimmung der Zahl kultivierbarer sulfatreduzierender Bakterien

Sulfatreduzierende Bakterien wurden im MPN-Ansatz durch den Nachweis der biogenen Sulfidproduktion detektiert. Als Substrat wurde ein Gemisch verschiedener C-Quellen angeboten. Sulfat wurde als Elektronenakzeptor eingesetzt. Zum Nachweis der biogenen Sulfidbildung wurde Natriumsulfid als Reduktionsmittel durch Titan-(III)-citrat ersetzt.

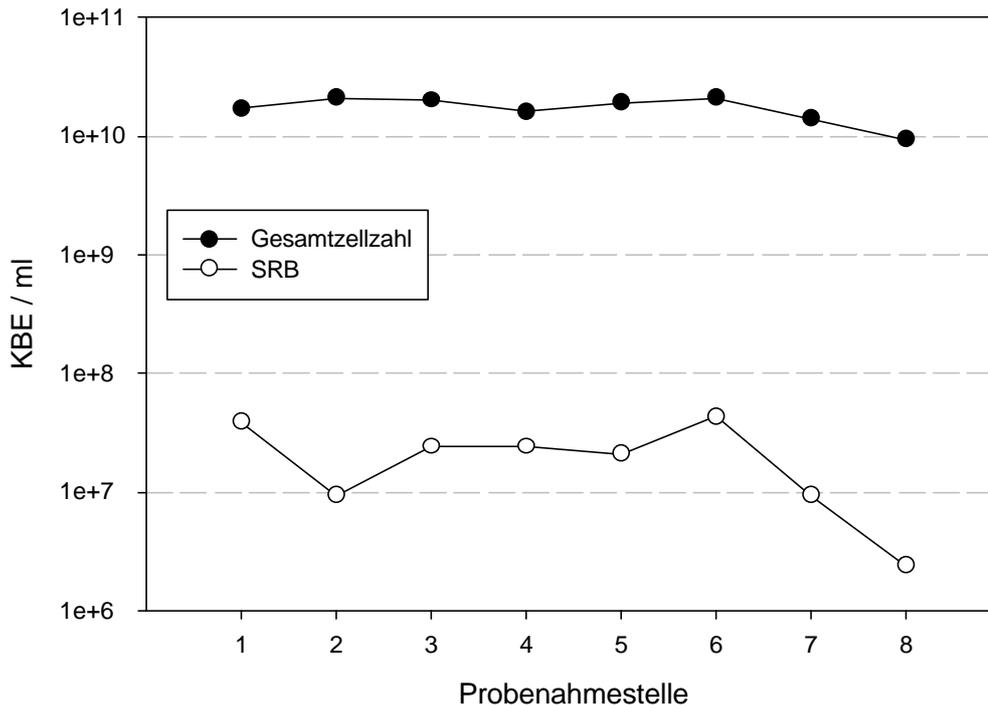


Abbildung 3.11: Verteilung der Anzahl der kultivierbaren SRB im Reaktor

Die MPN-Schätzung ergab, dass sich mit dem gewählten Ansatz etwa 2×10^7 Zellen/ml kultivieren ließen. Die höchsten Zellzahlen kultivierbarer Zellen wurden an der Probenahmestelle 6 gefunden. Aus dieser Probe ließen sich mehr als 4×10^7 Zellen/ml kultivieren. Ein Einbruch der koloniebildenden Einheiten an der Probenahmestelle 5, wie sie bei der Abschätzung der Gesamtzellzahl gemessen wurde, konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 3.11). Ab Probenahmestelle 6 nahmen die Zahlen der kultivierbaren Sulfatreduzierer deutlich ab und erreichten mit ca. 5×10^6 Zellen/ml ein Minimum an Probenahmestelle 8. Die eingesetzten C-Quellen wurden auch von nicht sulfidogenen, gärenden Organismen verwertet. Aus diesem Grund wurden nur die Kolonien als positiv gewertet, bei denen eine Schwarzfärbung auftrat. Die nicht sulfidogenen Organismen wurden allerdings in die Isolierung einbezogen und werden an anderer Stelle diskutiert.

3.3.3. Bestimmung der Zahl kultivierbarer homoacetogener Bakterien

Homoacetogene Bakterien konnten durch die Bildung eines farbigen Komplexes zwischen Titan(III) und einem Stoffwechselprodukt beim Abbau von methoxylierten Aromaten nachgewiesen werden. Als Substrat wurde Trimethoxybenzoat eingesetzt. Kolonien, die während der Inkubation eine eindeutige Gelbfärbung zeigten, wurden als homoacetogene Organismen eingeordnet.

Die Zellzahlen der kultivierbaren homoacetogenen Bakterien lagen nur unwesentlich unter denen der Sulfatreduzierer. Auch hier war die Verteilung über die Reaktorlänge relativ gleichmäßig. Zum Auslauf des Reaktors nahmen die Zahlen der kultivierbaren Homoacetogenen aber nicht ab und lagen an Probenahmestelle 8 über den Zahlen der Sulfatreduzierer (Abbildung 3.12). Auch in diesem Ansatz konnten Kolonien beobachtet werden, bei denen keine Gelbfärbung auftrat. Diese Zellen wurden nicht in die Bestimmung der kultivierbaren Keimzahl homoacetogener Bakterien einbezogen.

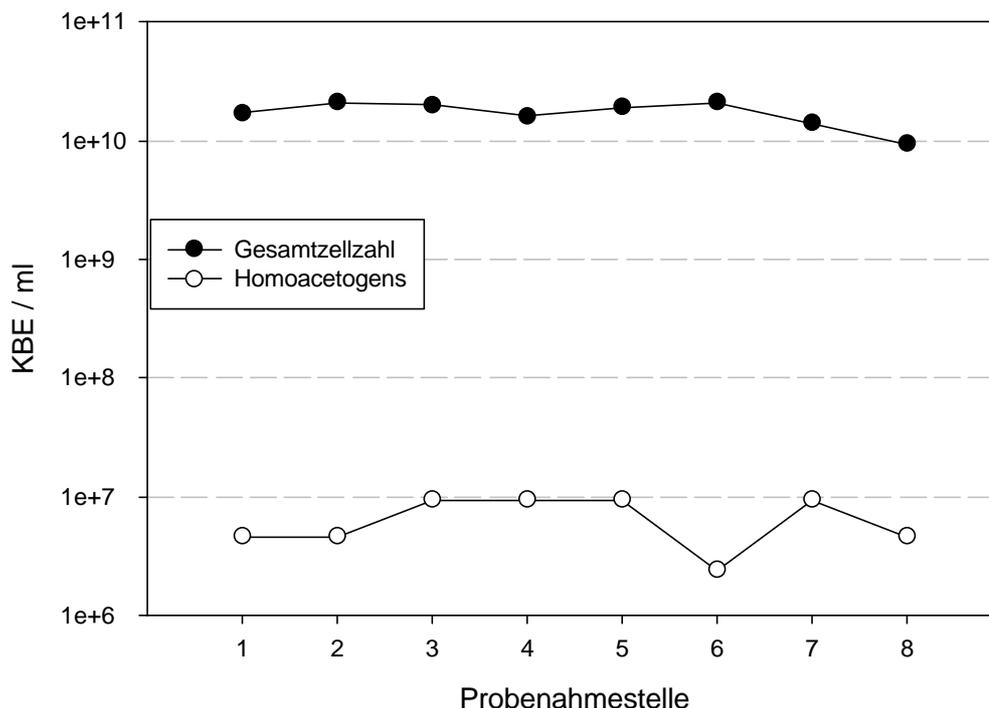


Abbildung 3.12: Verteilung der Anzahl kultivierbarer homoacetogener Bakterien im Reaktor

3.4 Bestimmung der Zahl physiologisch aktiver methanogener Archaeen

Die MPN-Bestimmung methanogener Organismen wurde in Flüssigkultur durchgeführt und der Nachweis physiologisch aktiver methanogener Archaeen erfolgte durch den gaschromatographischen Nachweis von Methan.

Über die gesamte Reaktorlänge ließen sich physiologisch aktive Methanogene nachweisen, wobei die Zellzahlen der Methanogenen über die Reaktorlänge anstiegen. An Probenahmestelle 1 wurden mit $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml die niedrigsten Zellzahlen gemessen. An Probenahmestelle 8, dem Abfluss des Reaktors, konnten fast 80 mal mehr physiologisch aktive Methanogene nachgewiesen werden als an Probenahmestelle 1 (Abbildung 3.13). Im zweiten Reaktorabschnitt (Probenahmestelle 5–8) lagen die Zellzahlen der physiologisch aktiven Methanogenen deutlich höher als im ersten Reaktorabschnitt und stiegen auf 5 % der kultivierbaren Zellen.

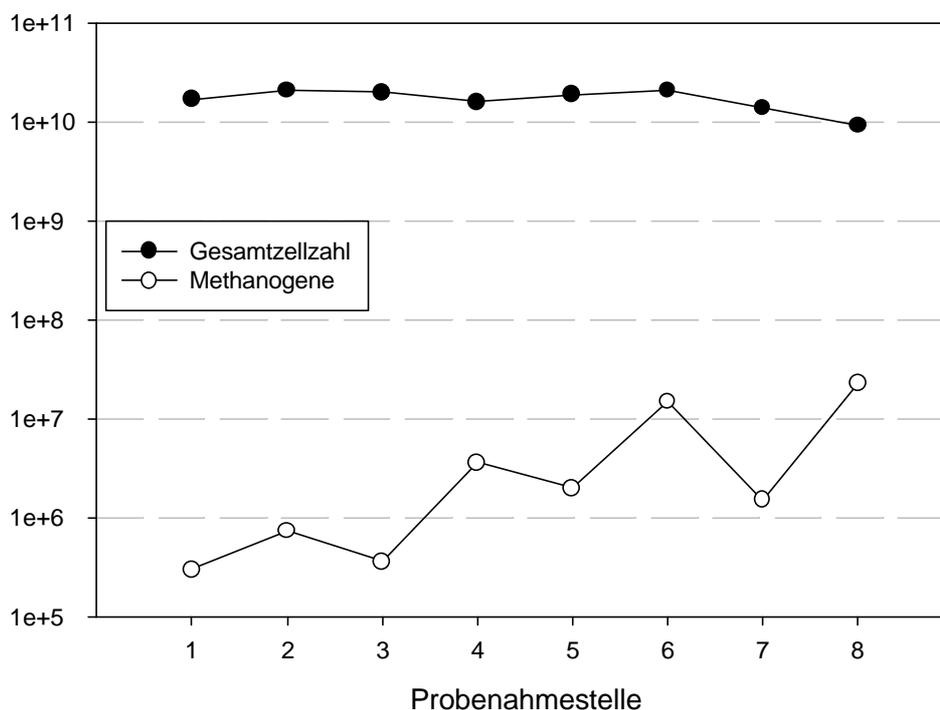


Abbildung 3.13: Verteilung der Anzahl physiologischer methanogener Archaeen im Reaktor

3.5 Isolierung

Die Isolierung war ein zentraler Teil der Arbeit und wurde mit den Zellzahlbestimmungen aus den MPN-Tests gekoppelt. Unterschiedliche Koloniemorphologien wurden aus den jeweils höchsten Verdünnungen mit positivem Signal ausgewählt und isoliert. Damit wurde gewährleistet, dass die isolierten Organismen im Reaktor in zahlenmäßig relevanten Größenordnungen auftraten. Die Isolierung aus den MPN Tests ermöglichte eine erste Einordnung der Isolate in physiologische Gruppen (Gärer, sulfatreduzierende Bakterien, homoacetogene Bakterien). Zusätzlich zu den MPN-Ansätzen wurden weitere selektive Medien mit Einzelsubstraten (Glucose, Lactat, Ethanol) angesetzt, aus denen Reinkulturen

gewonnen wurden. Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit und der daraus hervorgegangenen Studien- bzw. Diplomarbeit 182 Stämme isoliert werden, die sich 58 verschiedenen Arten aus 15 Gattungen zuordnen ließen. Die Isolate werden im Folgenden geordnet nach ihrer phylogenetischen Zugehörigkeit vorgestellt. Eine Tabelle mit allen Isolaten und den Substraten, mit denen die einzelnen Organismen isoliert werden konnten, findet sich im Anhang (Tabelle B im Anhang). Abbildung 3.14 zeigt eine Übersicht über die Zahl der Isolate aus verschiedenen phylogenetischen Gruppen, die aus dem Reaktor isoliert werden konnten. Über die Hälfte der Isolate ließ sich nach der neuen taxonomischen Einordnung im „Bergey’s Manual[®] of Systematic Bacteriology“ in die Ordnung *Clostridiales* einordnen (Garrity et al. 2001). Da diese Einteilung aber noch nicht in den aktuellen ARB-Datensatz eingeflossen war, erfolgte die Einordnung der Isolate nach (Collins et al. 1994).

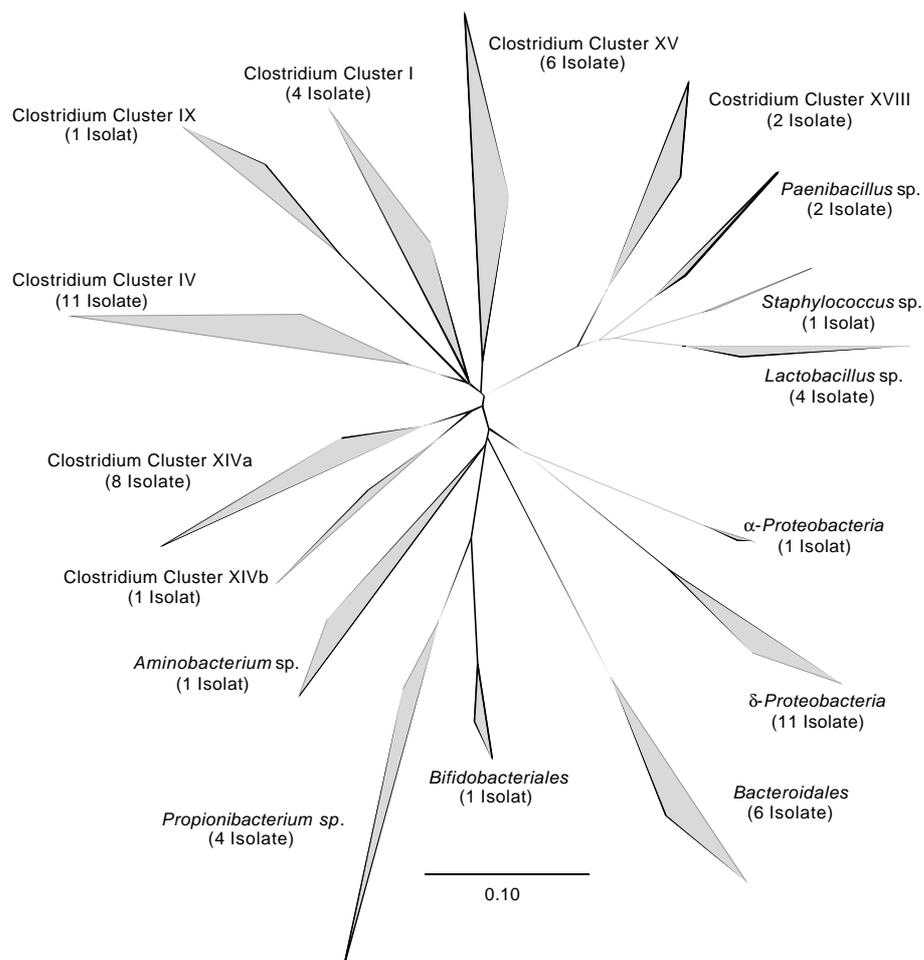


Abbildung 3.14: Phylogenetische Einordnung der Isolate auf der Basis der 16S rDNA-Homologie. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %

3.5.1. Clostridiales

Insgesamt ließen sich 33 Isolate in die Ordnung *Clostridiales* einordnen. Unter diesen Isolaten waren Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Acidaminococcus*, *Eubacterium* und *Acetobacterium*. Die Gattung *Clostridium* besteht aus anaeroben, Gram positiven Bakterien, die thermoresistente Endosporen bilden und nicht zur dissimilatorischen Sulfatreduktion befähigt sind. Aufgrund dieser wenig restriktiven Charakteristika ist diese Gattung sehr groß und weist eine große phänotypische und genotypische Diversität auf (Hippe et al. 1991). Die Isolate wurden nach der Einordnung von (Collins et al. 1994) gruppiert und werden entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Clustern vorgestellt.

Cluster I formt die größte Gruppe der Clostridien und beinhaltet den Typstamm der Gattung, *C. butyricum*. Diese Gruppe ist phänotypisch divers und umfasst saccharolytische und peptolytische Organismen. Vier Isolate fielen in dieses Cluster (Abbildung 3.15). Isolat TMB 1 wurde auf RCM-Agar im Anaerobtopf isoliert. Der nächste Verwandte war *C. tyrobutyricum* mit einer Sequenzhomologie von über 95 %. Die Zellen dieses Isolats waren stäbchenförmig, mit Längen von bis zu 7 µm. Die Sporen lagen subterminal und haben die Mutterzelle nicht merklich aufgetrieben. Beweglichkeit konnte nicht beobachtet werden (Kaesler 1999).

Isolat 61 und TMB2 wurden unabhängig voneinander isoliert und weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie von fast 100 % auf. Isolat 61 wurde auf Melasseschlempe und auf Glucose isoliert, Isolat TMB2 wurde auf RCM-Agar (DIFCO) im Rahmen einer Diplomarbeit isoliert (Kaesler 1999) Der nächste Verwandte dieser beiden Isolate war *C. butyricum*. Die Homologie der 16S rDNA zwischen *C. butyricum* und den Isolaten 61 und TMB2 lag bei 99 %. Die Zellen der Isolate waren stäbchenförmig mit einer Länge von bis zu 10 µm. Zum Teil lagen die Zellen in langen Ketten vor. Die ovalen Sporen lagen terminal bis subterminal und haben die Mutterzelle nicht merklich aufgetrieben. Die Zellen waren beweglich.

Die nächsten Verwandten von Isolat 14 waren nicht kultivierte Organismen, von denen nur Gensequenzen vorliegen. Klon SJA-163 stammte aus einem anaeroben Reaktor zur Behandlung von trichlorbenzolhaltigen Abwässern (von Wintzingerode 1999). Die Sequenzhomologie zwischen Isolat 14 und Klon SJA-163 betrug aber nur 90 %. Die Zellen von Isolat 14 waren 2 – 4 µm lang und 1 µm breit. Beweglichkeit oder Sporenbildung konnten nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

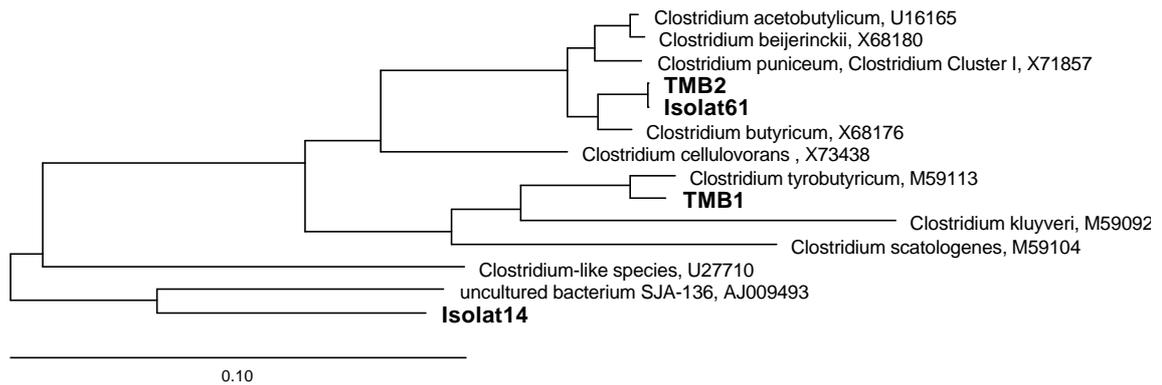


Abbildung 3.15: Phylogenetische Einordnung der Isolate in das Cluster I der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Cluster IV ist phänotypisch heterogen und umfasst sowohl mesophile wie auch thermophile Organismen. Neben Vertretern der Gattung *Clostridium* wurden auch andere Gattungen in dieses Cluster eingeordnet (Abbildung 3.16).

Fünf Isolate konnten der Gattung *Ruminococcus* zugeordnet werden. Die Isolierung dieser Organismen erfolgte, wenn nicht anders angegeben mit Melasseschlempe oder Glucose als Substrat (Tabelle B im Anhang). Alle Isolate hatten die gleiche Zellmorphologie. Die Zellen hatten einen Durchmesser von 1 – 3 µm. Aktive Bewegung wurde nicht beobachtet.

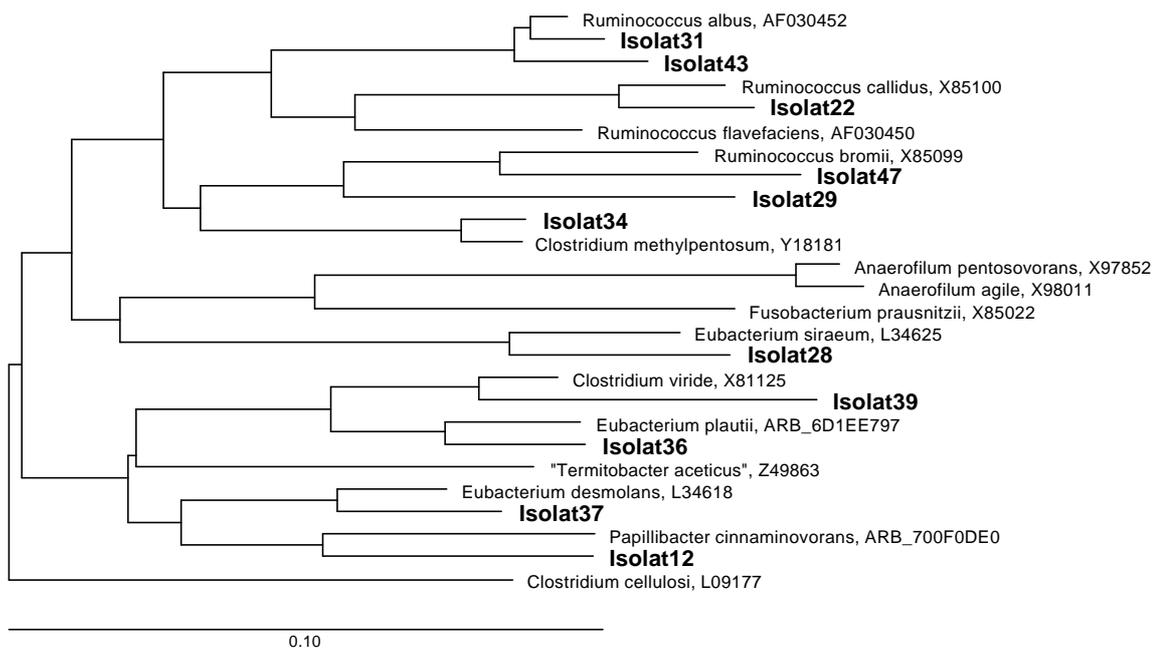


Abbildung 3.16: Phylogenetische Einordnung der Isolate in das Cluster IV der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Isolat 31 und Isolat 43 waren miteinander verwandt. Isolat 43 konnte aus Ansätzen, in denen Melasseschlempe, Glucose oder SRB-Mix als Substrat eingesetzt wurde, isoliert werden. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA von Isolat 31 und Isolat 43 lag bei 96 %. Der nächste Verwandte dieser Isolate war *R. albus* (Sequenzhomologie 98 %). Der nächste Verwandte von Isolat 22 war *R. callidus* mit einer Sequenzhomologie von 98 %. Die Isolate 29 und 47 waren mit *R. bromii* verwandt. Isolat 29 wurde je einmal auf Melasse und Glucose isoliert, Isolat 47 wurde nur ein einziges Mal mit Melasseschlempe isoliert. Die Sequenzhomologie zwischen den Isolaten 29 und 47 und *R. bromii* betrug aber nur 94 % (Isolat 47) beziehungsweise 90 % (Isolat 29).

Drei Isolate waren mit Vertretern der Gattung *Eubacterium* verwandt. Die Zellmorphologie der Isolate war ähnlich. Die leicht gebogenen Stäbchen waren 1 - 10 µm lang. Der nächste Verwandte von Isolat 28 war *E. siraeum*. Isolat 28 ließ sich nur ein einziges Mal mit Melasseschlempe als Substrat isolieren. In Flüssigkultur mit Melasseschlempe als Substrat waren die Zellen dieses Isolats leicht gebogene Stäbchen von 1 µm Länge. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA von Isolat 28 und *E. siraeum* betrug 93 %. *E. plautii* war der nächste Verwandte von Isolat 36 (Sequenzhomologie 98 %). Isolat 36 konnte mit Melasseschlempe und mit Glucose isoliert werden. Der letzte Vertreter der Gattung *Eubacterium* im Cluster IV der Clostridien war Isolat 37. Dieses Isolat war mit *E. desmolans* verwandt und ließ sich nur mit Melasseschlempe als Substrat kultivieren. Die Sequenzhomologie zwischen der 16S rDNA von *E. desmolans* und Isolat 37 betrug 97 %.

Zwei Isolate waren mit Vertretern der Gattung *Clostridium* verwandt. Der nächste Verwandte von Isolat 34 war *C. methylpentosum*. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA betrug 99 %. Isolat 34 konnte nur aus Ansätzen mit Melasseschlempe als Substrat isoliert werden. Die Zellen waren 2 – 4 µm lang. Beweglichkeit oder Sporenbildung konnten nicht beobachtet werden. *C. methylpentosum* wurde aus dem Intestinaltrakt isoliert und vergärt nur Pentosen (Himelbloom und Canale-Parola 1989). Der nächste Verwandte von Isolat 39 war *C. viride*. Dieser Organismus kann verschiedene Fettsäuren (5-Aminovaleriat, 5-Hydroxyvaleriat, Vinylacetat, Crotonat) zu Acetat, Propionat, Butyrat, und Valeriat metabolisieren (Buckel et al. 1994). Isolat 39 konnte nur einmal mit Melasseschlempe als Substrat isoliert werden.

Isolat 12 wurde mit Melasseschlempe als Substrat isoliert. Der nächste Verwandte war *Papilibacter cinnaminovorans*. Dieser Organismus ist in der Lage, die aliphatische Seitenkette der Zimtsäure abzubauen (Defnoun et al. 2000). Die Sequenzhomologie der 16S rDNA von Isolat 12 und *P. cinnaminovorans* betrug 91 %.

Ein Isolat konnte in **Cluster IX** eingeordnet werden. In diesem Cluster finden sich verschiedene Sporenbildner wie *Sporomusa* sp. und *Dendrosporobacter quercicolus* (Abbildung 3.17). Isolat 17 konnte nur einmal mit Melasseschlempe als Substrat isoliert werden. Der nächste Verwandte war *Acidaminococcus fermentans* mit einer Sequenzhomologie von 92 %. Die Zellen von Isolat 17 waren coccoid. Diplococci traten auf. Eine aktive Zellbewegung konnte nicht beobachtet werden.

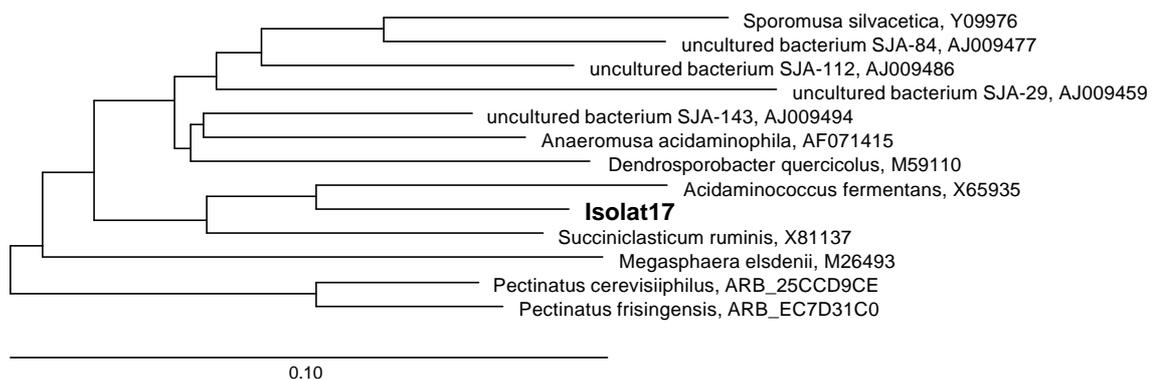


Abbildung 3.17: Phylogenetische Einordnung von Isolat 17 in das Cluster IX der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Cluster XIV zeigt eine deutliche innere Struktur, die eine Aufteilung in zwei Subcluster (XIVa und XIVb) rechtfertigt (Collins et al. 1994). Acht Isolate fielen in Subcluster XIVa und ein Isolat ordnete sich in Subcluster XIVb ein (Abbildung 3.18). Von den acht Isolaten im Subcluster XIVa sind vier Isolate mit Vertretern der Gattung *Ruminococcus* verwandt, der Rest ist mit Vertretern der Gattung *Clostridium* verwandt.

Isolat 18 steht in enger Verwandtschaft zu *C. celerecrescens* und *C. sphenoides*. Die Übereinstimmung der Sequenz der 16S rDNA beträgt 98,6 % (*C. celerecrescens*) beziehungsweise 97,8 % (*C. sphenoides*). Isolat 18 wurde sowohl aus Ansätzen mit Melasseschlempe wie auch aus einem Ansatz mit Cellulose als Substrat isoliert. In Flüssigkultur mit Melasseschlempe als Substrat bildete Isolat 18 bewegliche Stäbchen mit Längen von 1 – 5 µm.

Isolat 32 konnte dreimal auf Melasseschlempe isoliert werden und zeigte hohe Sequenzhomologien zu *C. aerotolerans* und *C. xylanolyticum*. Die Homologie zu diesen Arten betrug über 97 %. Isolat 42 war mit *C. clostridiiformis* verwandt. Die Sequenzhomologie war allerdings nicht sehr hoch (93 %). Die Zellen von Isolat 42 waren stäbchenförmig. Die Länge betrug 2 – 5 µm. Beweglichkeit oder Sporulation konnte nicht beobachtet werden. Isolat TMB39 wurde sowohl auf Melasseschlempe wie auch auf Trimethoxybenzoat isoliert. Der nächste Verwandte war *Sporobacterium olearium*, der aus einem Anaerobreaktor zur Behandlung von Abwässern aus der Olivenölproduktion isoliert wurde (Mechichi et al. 1999). TMB39 bildete leicht gekrümmte Zellen mit terminal liegenden runden Sporen, welche die Mutterzelle deutlich auftrieben. TMB39 konnte Trimethoxybenzoat unter Spaltung des aromatischen Ringsystems vollständig zu Acetat und Butyrat verstoffwechseln (Kaesler 1999).

Die weiteren Isolate im Subcluster XIVa waren mit Vertretern der Gattung *Ruminococcus* verwandt. Alle Isolate hatten eine vergleichbare Zellmorphologie. Die Isolate bildeten Coccen mit einem Durchmesser von 1 – 3 µm. Isolat 27 wurde auf Melasseschlempe und aus einem Ansatz mit SRB-Mix als Substrat isoliert (Tabelle B im Anhang). Der nächste Verwandte von Isolat 27 war das homoacetogene Bakterium *R. hydrogenotrophicus* (Bernalier et al. 1996). Die Sequenzhomologie lag bei 97 %. Isolat 41 war mit *R. gnavus* verwandt. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA betrug 98 %. Isolat 41 konnte mit Melasseschlempe oder Glucose als Substrat isoliert werden. Der nächste Verwandte von Isolat 49 war eine nicht weiter spezifizierte Art, die aus dem Pansen von Rindern isoliert wurde (Rieu-Lesme et al. 1996){Schleifer 1986 7492 /id}. Die Sequenzhomologie lag bei 98 %. Isolat 49 konnte nur einmal mit Melasseschlempe isoliert werden.

Der nächste Verwandte von Isolat 9 war *Eubacterium rectale*. Die Sequenzhomologie betrug 92 %. Die Zellen maßen 0,5 – 1 µm x 2 – 4 µm, eine aktive Bewegung wurde nicht beobachtet.

Isolat 23, mit dem nächsten Verwandten *C. propionicum*, wurde in das Subcluster XIVb eingeordnet. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA lag bei 90 %. Isolat 23 konnte nur einmal mit Melasseschlempe als Substrat isoliert werden (Tabelle B im Anhang).

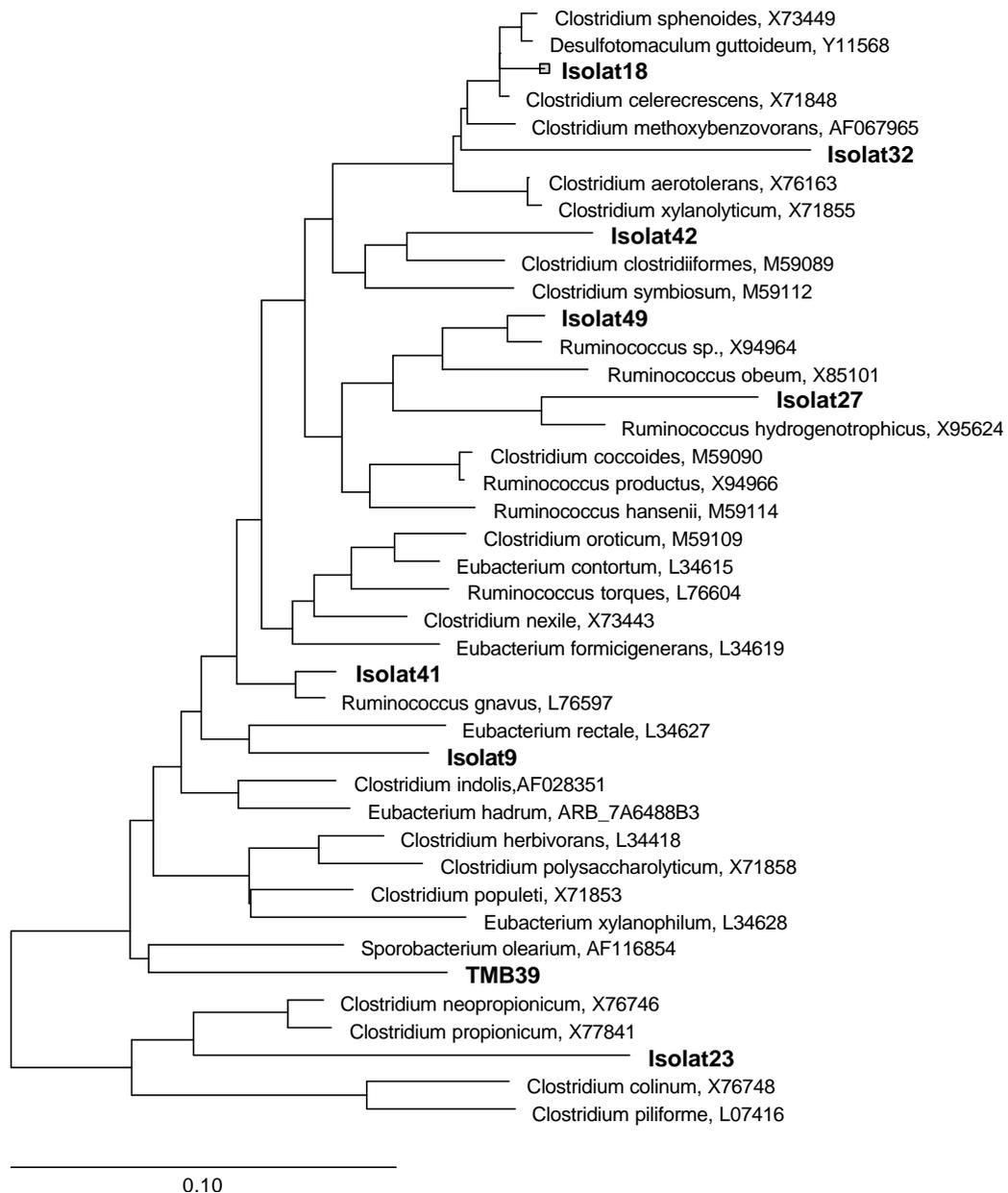


Abbildung 3.18: Phylogenetische Einordnung der Isolate in das Cluster XIV der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %. Isolat 23 gehört dem Subcluster XIVb an, die anderen Isolate fallen in das Subcluster XIVa.

Sechs Isolate konnten dem **Cluster XV** zugeordnet werden (Abbildung 3.19). Die Isolate 20 und 60 konnten jeweils nur ein einziges Mal isoliert werden. Der nächste Verwandte von Isolat 20 war „*Clostridium aminobutyricum*“. Diese Gattung ist nicht valid beschrieben. Die Sequenzhomologie lag bei 99 %. Die stäbchenförmigen Zellen waren 2 µm lang und 0,5 µm breit. Zellbewegung oder Sporenbildung konnten nicht beobachtet werden. Der nächste Verwandte von Isolat 60 war *Eubacterium brachy*.

Hier lag die Sequenzhomologie bei 97 %. Die Zellen von Isolat 60 waren stäbchenförmig mit einer Länge von 2 – 5 µm Länge und einer Breite von 1 µm. Aktive Zellbewegung konnte nicht beobachtet werden. Isolat TMB19 und TMB3 wurden im Rahmen einer Diplomarbeit mit Trimethoxybenzoat isoliert (Kaesler 1999). Die Zellen waren 2 – 7 µm lange Stäbchen mit einer Breite von 1 µm. Eine aktive Zellbewegung konnte nicht beobachtet werden. Die Homologie der 16S rDNA beider Isolate lag bei 98 %. Die nächsten Verwandten waren *E. limosum* und *E. callanderi* mit einer Sequenzhomologie von 98 %. *E. limosum* und *E. callanderi* sind in der Lage, autotroph zu wachsen oder Methoxygruppen zu verwerten (Genthner et al. 1981; Mountfort et al. 1988).

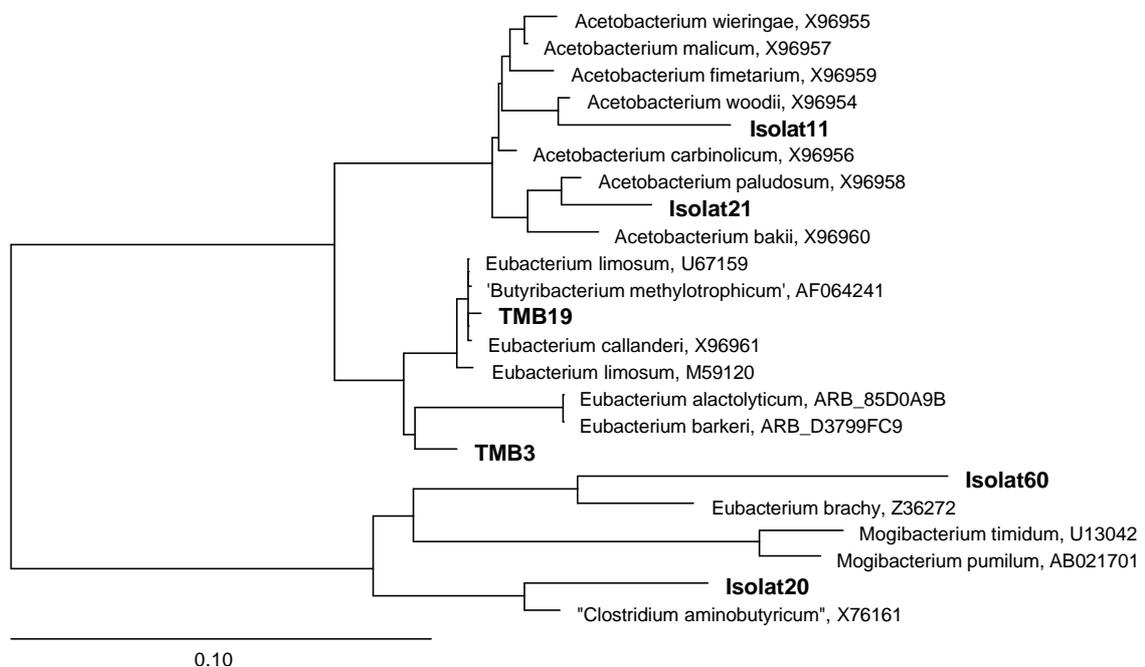


Abbildung 3.19: Phylogenetische Einordnung der Isolate in das Cluster XV der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Die Gattung *Acetobacterium* besteht aus homoacetogenen stäbchenförmigen Bakterien, die in der Lage sind, Kohlendioxid als Elektronensenke zu nutzen (Balch et al. 1977; Schink und Bomar 1991). Zwei Isolate konnten dieser Gattung zugeordnet werden. Beide Isolate hatten eine vergleichbare Kolonie- und Zellmorphologie. Die Kolonien waren im Tiefagarshake diskusförmig mit glattem Rand. Die Zellen waren stäbchenförmig mit einer Länge von 1 – 3 µm und einem Durchmesser von 0,5 – 1 µm. Isolat 11 war mit *Acetobacterium woodii* verwandt und konnte auf Melasseschlempe und Glucose isoliert werden. Die Homologie der 16S

rDNA von Isolat 11 und *A. woodii* betrug über 99 %. Isolat 21 stand in enger Verwandtschaft zu *A. paludosum* und konnte nur auf Melasseschlempe isoliert werden. Die Sequenzhomologie von Isolat 21 und *A. paludosum* betrug fast 100 %. *A. paludosum* wurde ursprünglich aus kalten Habitaten isoliert (Kotsyurbenko et al. 1995).

Cluster XVIII war nur mit zwei Isolaten vertreten (Abbildung 3.20). Isolat 16 wurde mit Melasseschlempe als Substrat isoliert. Der nächste Verwandte war *Clostridium spiroforme* mit einer Sequenzhomologie von über 99 %. Die Zellen dieses Isolats waren stark gebogene Stäbchen. Zum Teil war die Krümmung so stark, dass sich ein Ring bildete. Weitere Verwandte waren *C. ramosum* und *C. cocleatum*. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA betrug in beiden Fällen mehr als 96 %. Die nächsten Verwandten von Isolat 16 wurden aus dem Darm von Menschen und Tieren isoliert (Kaneuchi et al. 1979). Der zweite Vertreter in Cluster XVIII war Isolat 53. Dieses Isolat konnte aus Ansätzen mit Melasseschlempe oder mit Glucose gewonnen werden. Der nächste Verwandte war *Eubacterium cylindroides*, aber die Sequenzhomologie betrug nur 90 %. Die Zellen von Isolat 53 waren leicht gebogene Stäbchen mit einer Länge von 2 – 7 µm.

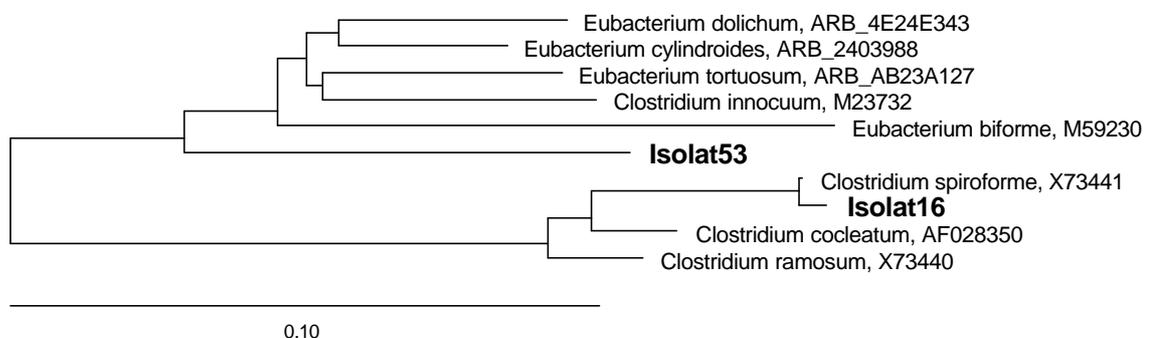


Abbildung 3.20: Phylogenetische Einordnung der Isolate 16 und 53 in das Cluster XVIII der Gattung *Clostridium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

3.5.2. *Bacteroides*

Die Gattung *Bacteroides* umfasst unbewegliche, Gram negative Stäbchen. Substrate sind Kohlenhydrate, Peptone und Stoffwechselprodukte anderer Organismen. Die Produkte des Stoffwechsels sind Succinat, Acetat, Formiat, Lactat und Propionat. Butyrat ist in der Regel kein Hauptprodukt bei der Vergärung von Kohlenhydraten und tritt gewöhnlich zusammen mit Isobutyrat und Isovaleriat auf (Shah 1991).

Sechs Isolate konnten dieser Gattung zugeordnet werden (Abbildung 3.21). Die Zellmorphologie der Isolate unterschied sich nicht voneinander. Die Zellen waren zwischen 1 µm und 8 µm lang und maßen etwa 1 µm im Durchmesser. Die Zellen traten in Flüssigkultur einzeln oder in Zellpaaren auf. Gelegentlich konnten Ketten von Zellen beobachtet werden. Aktive Bewegung wurde nicht beobachtet.

Isolat 2 und Isolat 5 konnten auf Melasseschlempe oder Glucose isoliert werden und waren eng miteinander verwandt. Der nächste Verwandte war *Bacteroides uniformis* mit einer Sequenzhomologie von 99 %. *B. uniformis* wird von der DSMZ in die Risikoklasse 2 eingeordnet. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen an diesen Isolaten durchgeführt.

Isolat 26 wurde auf Melasseschlempe isoliert und zeigte einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *B. acidifaciens* (98 %), einem Organismus, der aus dem Darm von Mäusen isoliert wurde (Miyamoto und Itoh 2000). Isolat 30 wuchs auf Melasseschlempe und Glucose und konnte *B. vulgatus* zugeordnet werden (Sequenzhomologie 97 %). Der nächste Verwandte von Isolat 33 war *B. splanchnicus* mit einer Sequenzhomologie von über 99 %. Isolat 33 wurde nur einmal auf Melasseschlempe isoliert. Isolat 40 wurde sowohl auf Melasseschlempe als auch auf Glucose isoliert und konnte in die Nähe von nicht weiter definierten *Bacteroides* Arten eingeordnet werden konnte. Diese nächsten Verwandten von Isolat 40 wurden aus dem Pansen von Rindern isoliert.

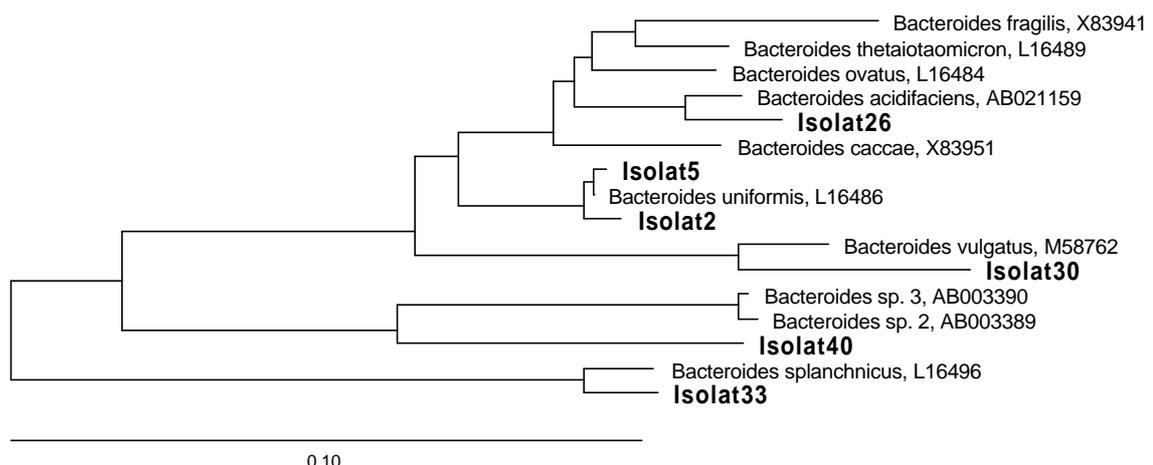


Abbildung 3.21: Phylogenetische Einordnung der Isolate in die Gattung *Bacteroides*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

3.5.3. *Lactobacillus*

Die Gattung *Lactobacillus* besteht aus Gram positiven, Katalase negativen Stäbchen, die keine Endsporen bilden. Sie sind in der Regel nicht beweglich und vergären Glucose entweder homofermentativ oder heterofermentativ zu Lactat und anderen organischen Säuren (Hammes et al. 1991). Ein Kennzeichen für die Lactobacillen ist der Bedarf an Supplinen. Die meisten Vertreter benötigen verschiedene Vitamine, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine. Vier Isolate konnten der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden (Abbildung 3.22). Alle Stämme wurden mit Melasseschlempe als Substrat isoliert.

Vier Isolate konnten der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden. Isolat 7 war eng mit *Lactobacillus pentosus* und *L. plantarum* verwandt. Die Sequenzhomologie lag bei über 99 %. Der nächste Verwandte von Isolat 8 war *L. agilis* mit einer Sequenzhomologie von 90 %. Isolat 25 fällt in eine Gruppe von Lactobacillen, die untereinander eine hohe Sequenzhomologie zeigen. Der nächste Verwandte ist *L. aviarius* mit einer Sequenzhomologie von über 97 %. Dieser Organismus ist aus dem Darm von Hühnern isoliert worden (Fujisawa et al. 1984). Isolat 44 ist eng mit *L. lindneri* verwandt. Die Sequenzhomologie beträgt etwa 98 %.

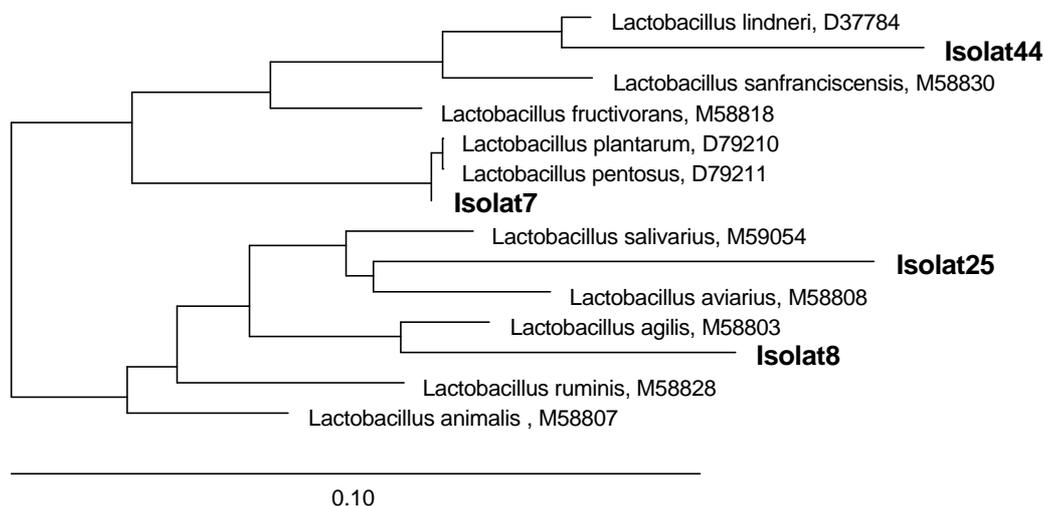


Abbildung 3.22: Phylogenetische Einordnung der Isolate in die Gattung *Lactobacillus*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

3.5.4. *Propionibacterium*

Vertreter der Gattung *Propionibacterium* sind Gram positive, pleomorphe Stäbchen. Sie sind nicht beweglich und bilden keine Sporen. Propionibakterien sind chemoorganotroph und bilden bei der Vergärung von Kohlenhydraten große Mengen von

Propionat und Acetat. Die Nebenprodukte der Gärung können Isovaleriat, Formiat, Succinat, Lactat und CO₂ sein. Propionibakterien leben anaerob, sind aber Katalase positiv und manche Arten sind aerotolerant. Vier Isolate konnten der Gattung *Propionibacterium* zugeordnet werden (Abbildung 3.23).

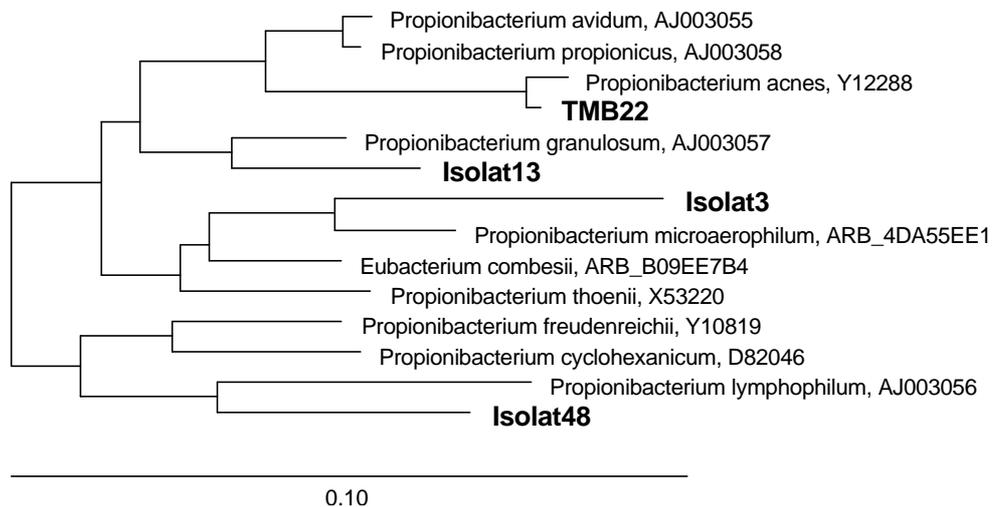


Abbildung 3.23: Phylogenetische Einordnung der Isolate in die Gattung *Propionibacterium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Die Isolate 3, 13 und 48 wiesen eine vergleichbare Kolonie- und Zellmorphologie auf. Die Kolonien waren im Tiefagar linsenförmig mit glattem Rand, die Zellen waren 1 - 3 µm lang und etwa 0,5 - 1 µm breit. Unregelmäßige Zellformen konnten beobachtet werden. Isolat 3 wurde aus dem Reaktor und aus dem Vorratstank der Anlage isoliert. Die Kultivierung erfolgte mit Melasseschlempe. Der nächste Verwandte war *Propionibacterium microaerophilum* mit einer Sequenzhomologie von 94 %. *P. microaerophilum* wurde aus einer Anlage zur Behandlung von Abwässern einer Olivenölmühle isoliert (Koussemon et al. 2001).

Isolat 13 konnte mit Melasseschlempe oder Glucose isoliert werden und war mit *P. granulosum* verwandt. Die Übereinstimmung der 16S rDNA lag über 96 %. Der nächste Verwandte von Isolat 48 war *P. lymphophilum*. Die Sequenzhomologie lag aber nur bei etwa 93%. Isolat 48 wurde nur einmal mit Melasseschlempe isoliert. Das Isolat TMB 22 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit in einer Flüssigkultur mit Trimethoxybenzoat als Substrat angereichert und anschließend auf RCM (DIFCO) Agar im Anaerobtopf isoliert (Kaesler 1999). Dieser Organismus ordnet sich bei *Propionibacterium acnes* ein und zeigte eine Sequenzhomologie von fast 100 %. Die nächsten Verwandten der Isolate 13, 48 und TMB22 sind nach Angaben der

Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) alle in die Risikogruppe 2 eingeordnet. Aus diesem Grund erfolgten keine physiologischen Untersuchungen an diesen Isolaten.

3.5.5. *Proteobacteria*

Das Phylum *Proteobacteria* war im Reaktor fast ausschließlich durch Vertreter der Unterklasse der δ -*Proteobacteria* repräsentiert. Im Rahmen des Projektes wurde eine Studienarbeit vergeben, in der die Rolle der Gram negativen sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) im Reaktor untersucht wurde (Dörries 1999). Die Anreicherung und Isolierung der Sulfatreduzierer erfolgte mit einem Substratgemisch (**Tabelle 2.6**). Elf Reinkulturen wurden in dieser Studienarbeit isoliert, bei denen aber nur zwei unterschiedliche Koloniemorphologien auftraten. Die Vertreter des ersten Morphotyps (9 Isolate) bildeten braune, linsenförmige Kolonien mit glattem Rand. Der andere Morphotyp (2 Isolate) bildete braune Kolonien mit diffusem Rand. Alle Isolate hatten darüber hinaus eine vergleichbare, vibroide Zellmorphologie. Die Zellen waren 2 - 3 μm lang und hatten einen Durchmesser von 1 μm . Die Zellen waren mobil. Alle Isolate wuchsen auf Lactat als alleiniger C-Quelle und ließen sich mit spezifischen Sonden für *Desulfovibrionaceae* hybridisieren (DSV698, DSV1292).

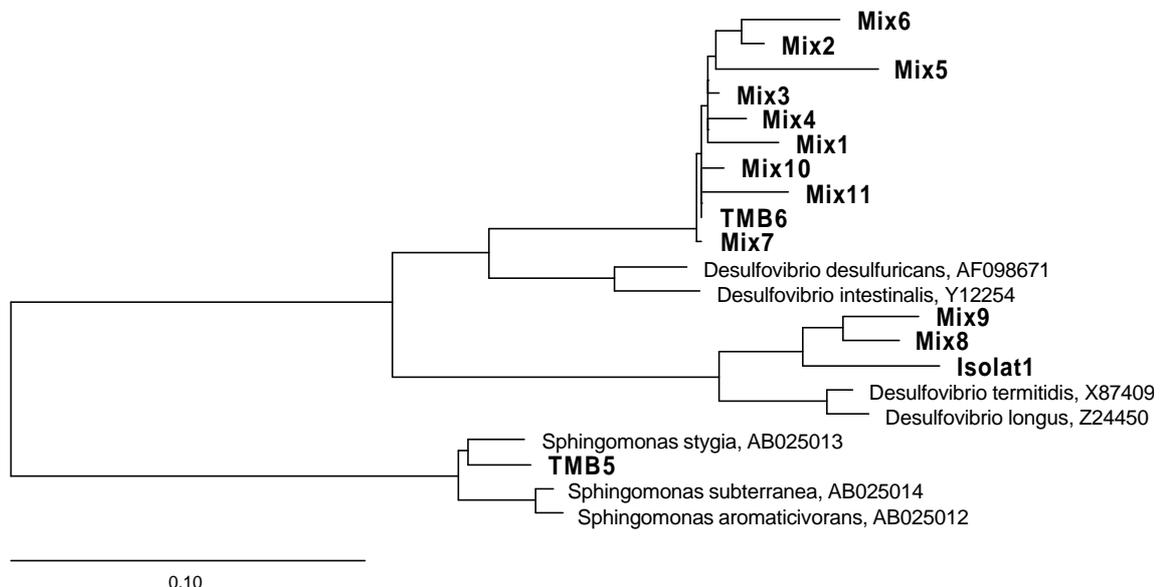


Abbildung 3.24: Phylogenetische Einordnung der Isolate in das Phylum *Proteobacteria*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

Parallel zu dieser Studienarbeit durchgeführte Isolierungen mit anderen Substraten brachten sechs weitere Isolate mit vergleichbarer Zell- und Koloniemorphologie. Diese Isolate wurden entweder mit Melasseschlempe ohne weitere Zugabe von Sulfat oder mit Lactat oder Ethanol als Kohlenstoffquelle und Sulfat als Elektronenakzeptor isoliert. Isolat TMB6 wurde im Anaerobtopf mit RCM-Agar (Difco) isoliert.

Die Sequenzierung der 16S rDNA der Isolate ergab, dass sich die 16S rRNA-Gene der Isolate MIX 1 – MIX 7, MIX 10, MIX 11 und TMB6AT nur unwesentlich unterschieden. Die Sequenzhomologie lag deutlich über 97 % und lag damit innerhalb der Sequenziergenauigkeit. Aufgrund der gleichen Kolonie- und Zellmorphologie war anzunehmen, dass es sich bei diesen Isolaten um Vertreter einer Art handelte. Der nächste Verwandte war *Desulfovibrio desulfuricans* mit einer Sequenzhomologie von 95 %. Die Isolate MIX 8 und MIX 9, sowie Isolat 1 unterschieden sich aufgrund ihrer Koloniemorphologie von den anderen Isolaten. Der Sequenzunterschied zwischen den 16S rRNA-Genen der Isolate MIX 8, MIX 9 und Isolat 1 lag ebenfalls deutlich unter 3 %. Die nächsten Verwandten dieser Isolate waren *D. termitidis* (Sequenzhomologie 97,3 %) und *D. longus* (Sequenzhomologie 96,2 %) (Abbildung 3.24).

Die Isolierung von sulfatreduzierenden Bakterien wurde während der Projektlaufzeit mit unterschiedlichen Isolierungsstrategien und zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. In allen Fällen konnten aber nur die beiden genannten Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* isoliert werden.

Ein Isolat konnte der Unterklasse der α -*Proteobacteria* zugeordnet werden (Abbildung 3.24). Die Zellen von Isolat TMB5 waren 2 – 5 μm lang und 1 μm breit. Aktive Zellbewegung konnte nicht beobachtet werden. Isolat TMB5 war eng mit *Sphingomonas subterranea* (Sequenzhomologie 97,2 %) und *S. aromaticivorans* (Sequenzhomologie 96,5 %) verwandt. Diese Organismen wurden aus tiefen Sedimenten isoliert und können aerob ein breites Spektrum substituierter Aromaten abbauen (Balkwill et al. 1997). Die Isolierung von TMB5 erfolgte auf Trimethoxybenzoat im Rahmen einer Diplomarbeit (Kaesler 1999).

3.5.6. *Paenibacillus*

Zwei Isolate konnten der Gattung *Paenibacillus* zugeordnet werden (Abbildung 3.25). Isolat 35 wurde viermal mit Melasseschlempe und einmal mit Glucose als Substrat isoliert. Die nächsten Verwandten waren *Paenibacillus* sp. G296 und

Paenibacillus sp. 7-5. Beide Organismen sind aquatischen Ursprungs und wurden aus kalten Habitaten isoliert. Isolat G296 wurde aus Lake Vostok isoliert und Isolat 7-5 ist marinen Ursprungs. Die Sequenzhomologie lag bei 96,5 % (Organismus 7-5), beziehungsweise bei 94,5 % (Organismus G296). Isolat 52 konnte ebenfalls mit Melasseschlempe oder Glucose isoliert werden. Die nächsten Verwandten von Isolat 53 waren *Paenibacillus* sp. TRO4 und eine nicht weiter bezeichnete *Paenibacillus* Art. Organismus TRO4 zeigt eine Sequenzhomologie von 98,2 % und wurde von Pflanzenmaterial isoliert (Berge et al. 2000).

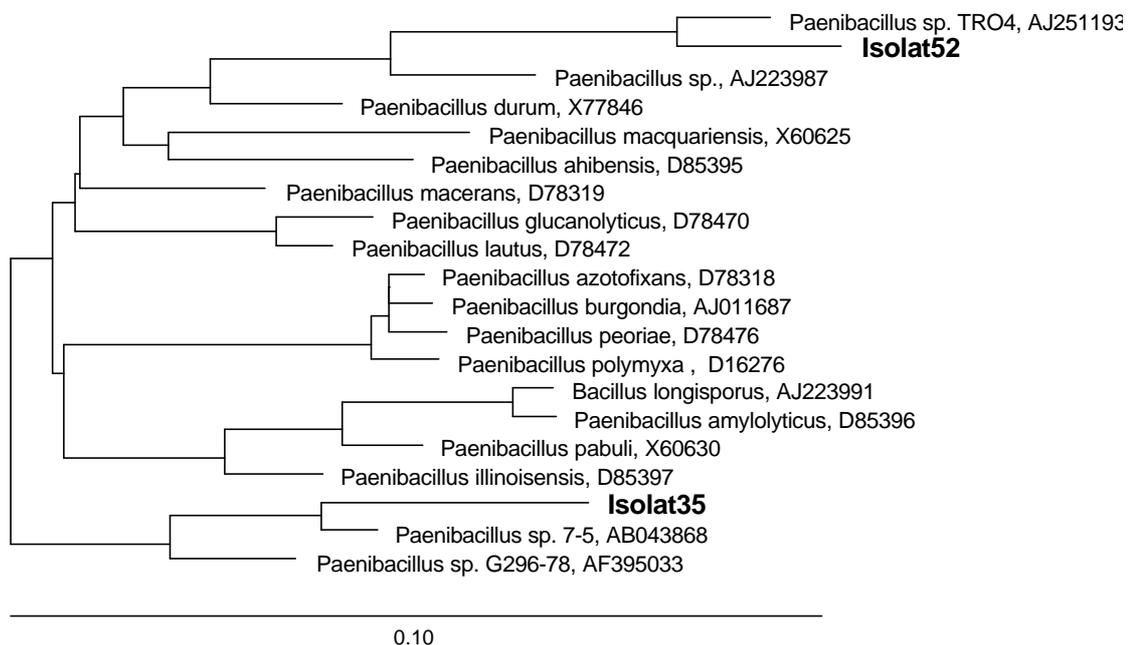


Abbildung 3.25: Phylogenetische Einordnung der Isolate 35 und 52 in die Gattung *Paenibacillus*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

3.5.7. *Aminobacterium*

Ein Isolat konnte der Gattung *Aminobacterium* zugeordnet werden (Baena et al. 2000). Isolat 24 war mit *Aminobacterium colombiense* verwandt, zeigte aber eine Sequenzhomologie von weniger als 90 % (Abbildung 3.26). Isolat 24 wurde auf Melasseschlempe isoliert und wuchs nur sehr langsam. Es handelte sich hierbei um stäbchenförmige Organismen mit einer Länge von 2 – 3 µm. Der Durchmesser betrug etwa 0,5 µm. Aktive Zellbewegung oder Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

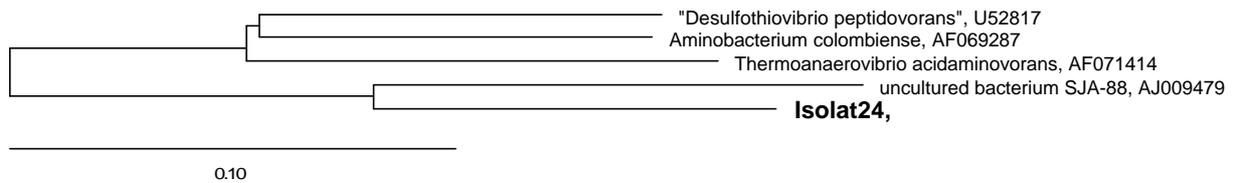


Abbildung 3.26: Phylogenetische Einordnung von Isolat 24. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %.

3.5.8. *Staphylococcus*

Isolat 15 wurde mit Melasseschlempe als Substrat isoliert und konnte der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet werden. Der nächste Verwandte ist *Staphylococcus epidermidis* mit einer Sequenzhomologie von 97 % (Abbildung 3.27). Da dieser Organismus der Gefährdungsklasse 2 (DSMZ) zugeordnet wird, wurden keine weiteren Untersuchungen an diesem Isolat durchgeführt.

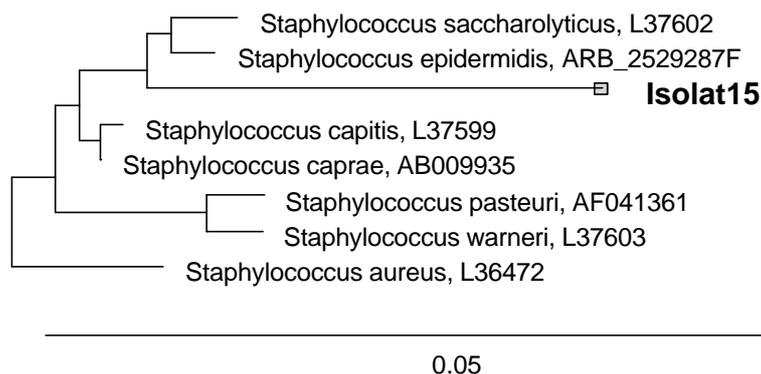


Abbildung 3.27: Phylogenetische Einordnung von Isolat 15 in die Gattung *Staphylococcus*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 5 %.

3.5.9. *Bifidobacterium*

Ein Isolat konnte der Gattung *Bifidobacterium* zugeordnet werden. Die Gattung *Bifidobacterium* umfasst Gram positive unbewegliche Stäbchen, die oft ein pleomorphes Erscheinungsbild haben. Bei der Vergärung von Glucose entsteht Lactat und Acetat. (Biavati et al. 1991) Isolat 10 wurde auf Melasse isoliert und steht in enger Verwandtschaft zu *Bifidobacterium lactis* (Abbildung 3.28). Die Sequenzhomologie betrug über 98 %. Die Zellen von Isolat 10 waren unregelmäßig geformte Stäbchen mit einer Länge von 3 – 8 µm. Aktive Zellbewegung konnte nicht beobachtet werden.

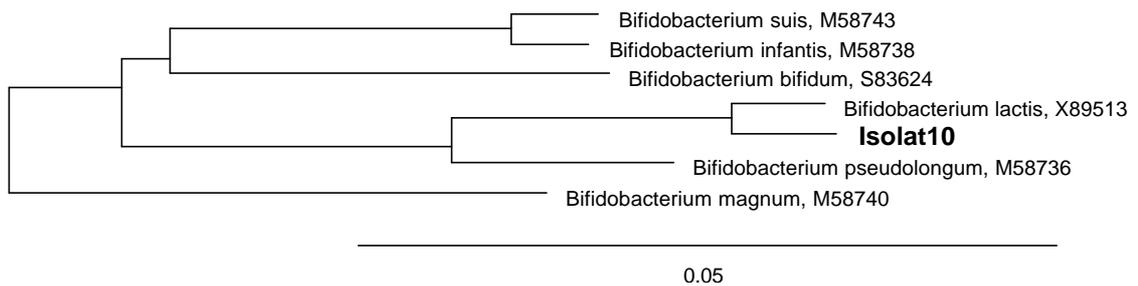


Abbildung 3.28: Phylogenetische Einordnung der Isolate in die Gattung *Bifidobacterium*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 5 %.

3.6 Abschätzung der Artenzahl (S)

Durch den Einsatz unterschiedlicher Kohlenstoffquellen konnten 182 Reinkulturen isoliert werden, die sich 58 unterschiedlichen Spezies zuordnen ließen.

Vier verschiedene Verfahren wurden eingesetzt, um eine Abschätzung der tatsächlichen Artenzahl, die durch die eingesetzten Kultivierungsverfahren isoliert werden kann, vorzunehmen (Abbildung 3.29). Die Ergebnisse schwanken dabei je nach verwendeter Formel zwischen 79 und 194 Arten (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Geschätzte Artenzahl (S) im Vergleich zur Zahl der Isolate

| Schätzer | S (geschätzt) | Anteil der isolierten Organismen an der geschätzten Artenzahl (S) |
|--------------|---------------|---|
| Chao 1 | 194 | 29,8 % |
| Chao 2 | 79 | 73,4 % |
| Jack-Knife 1 | 80 | 72,5 % |
| Jack-Knife 2 | 88 | 65,9 % |

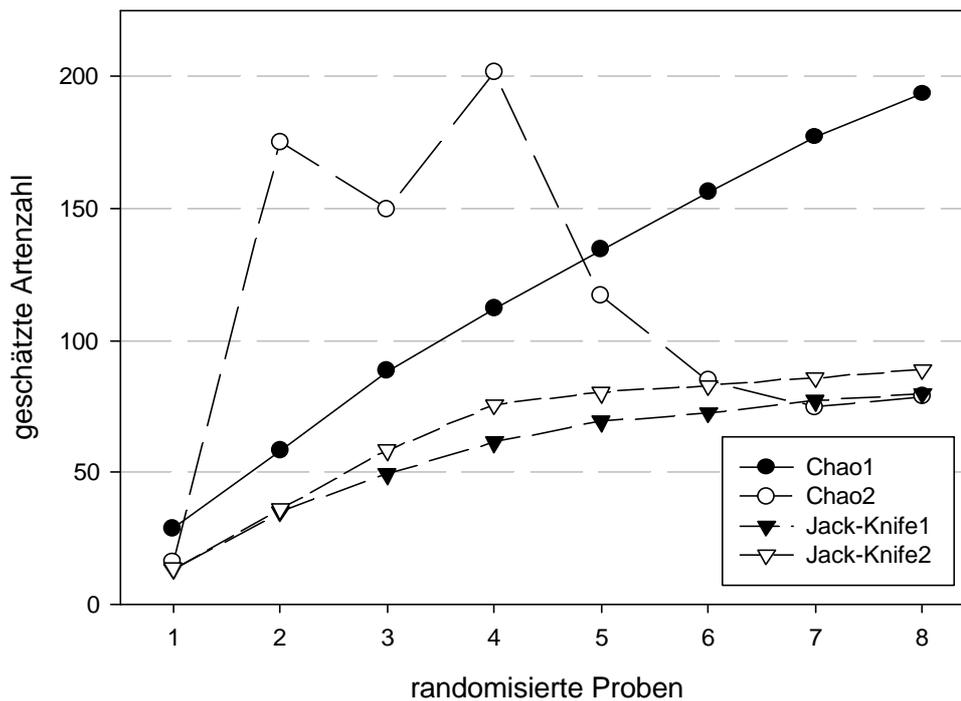


Abbildung 3.29: Abschätzung der Artenzahl (S) mit verschiedenen Methoden.

Die Abschätzung der Artenzahl nach *Chao1* zeigte, dass die geschätzte kumulative Artenkurve sehr steil war und nur wenig abflachte. Die geschätzte Artenzahl lag bei 194 Arten. Eine Abschätzung nach *Chao2* ergab eine Kurve, die zuerst steil anstieg, danach aber wieder abfiel und gegen Werte von etwa 80 Arten lief. Dieser Wert konnte auch mit der *Jack-Knife1*-Methode erreicht werden. Die Kurve zeigte hier einen gleichmäßigen Anstieg und eine deutliche Abflachung. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Kurve, die mit der *Jack-Knife2*-Methode berechnet wurde. Die Werte lagen allerdings etwas höher. Mit dieser Methode ließ sich eine Artenzahl von 89 Arten schätzen. Basierend auf diesen Daten lässt sich die Effizienz der kultivierungsabhängigen Diversitätsabschätzung berechnen. 58 unterschiedliche Arten konnten mit den gewählten Methoden isoliert werden. Das entspricht einem Anteil von 30 % - 73 % der geschätzten Artendiversität (Tabelle 3.1).

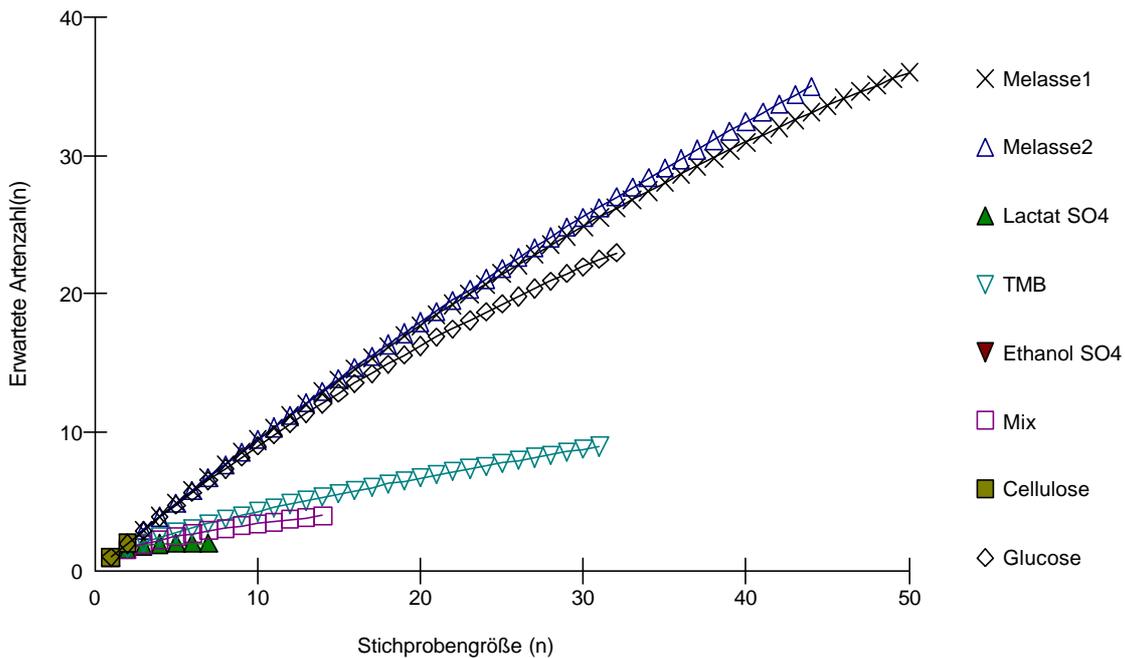


Abbildung 3.30: Kumulative Artenkurve für die unterschiedlichen Kultivierungsansätze

Aus den verschiedenen selektiven Kultivierungsansätzen konnten unterschiedlich viele Reinkulturen und unterschiedlich viele verschiedene Arten isoliert werden. Für eine Beurteilung der Effizienz der verschiedenen Kultivierungsansätze wurden die einzelnen Ansätze miteinander verglichen. Dazu wurden die Arten und die gewonnenen Reinkulturen eines Ansatzes in einer kumulativen Artenkurve gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.30). Die daraus resultierenden Kurven können direkt miteinander verglichen werden, weil bei allen Ansätzen mit der gleichen Methode isoliert wurde. Je steiler eine Kurve ist, desto diverser ist die Population in der entsprechenden Probe.

Der Vergleich der unterschiedlichen Ansätze zeigt, dass die größte Kultivierungseffizienz bei den Ansätzen erreicht wurde, bei denen Melasseschlempe als Substrat eingesetzt wurde. Hier konnten 36 beziehungsweise in einem zweiten Ansatz 35 verschiedene Arten isoliert werden. 21 dieser Arten wurden ausschließlich auf Melasseschlempe isoliert. Der Ansatz mit Glucose als Substrat resultierte ebenfalls in einer hohen Anzahl unterschiedlicher Arten. Es konnten 23 verschiedene Spezies aus diesem Ansatz isoliert werden, aber alle Isolate konnten auch auf einem der anderen Substrate isoliert werden. Mit Trimethoxybenzoat konnten neun verschiedene Arten isoliert werden. Sieben dieser Arten wurden nur in diesem Ansatz isoliert. Vier Isolate konnten mit dem SRB-Mix als Substrat isoliert werden,

von denen ein Isolat ausschließlich mit diesem Substrat isoliert wurde. Der Einsatz von spezifischen Einzelsubstraten (Lactat und Ethanol, beide mit Sulfat als Elektronenakzeptor, Cellulose) resultierte hingegen nur in der Isolierung weniger verschiedener Arten. Darüber hinaus konnten die Isolate aus diesen Ansätzen auch mit anderen Substraten isoliert werden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Vergleich verschiedener Substrate bezüglich der Kultivierungseffizienz

| Ansatz | Substrat | Zahl der Arten | ausschließlich auf diesem Substrat isoliert |
|--------|-------------------------|----------------|---|
| 1 | Melasse | 36 | 21 |
| 2 | Melasse | 35 | 21 |
| 3 | Lactat+SO ₄ | 1 | 0 |
| 4 | Ethanol+SO ₄ | 1 | 0 |
| 5 | Mix | 4 | 0 |
| 6 | TMB | 9 | 3 |
| 7 | Cellulose | 2 | 0 |
| 8 | Glucose | 21 | 0 |

3.7 Physiologische Charakterisierung der Isolate

Die phylogenetische Einordnung der Isolate lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die physiologischen Kapazitäten der Bakterien zu. Aus diesem Grund wurde die Bildung von Stoffwechselprodukten mit einer HPLC gemessen. Es wurden nicht alle Organismen physiologisch untersucht. Bakterien, die von der DSMZ in die Risikoklasse 2 eingeordnet wurden, konnten nicht weiter untersucht werden. Eine quantitative Messung war in vielen Fällen nicht möglich, weil viele Isolate nur mit Melasseschlempe wuchsen. Die Melasseschlempe enthielt bereits ein undefiniertes Gemisch möglicher Substrate und Produkte, so dass in einigen Fällen nur die Hauptprodukte des Stoffwechsels gemessen werden konnten. Die Messung der organischen Säuren erfolgte mit Hilfe eines Photodiodenarray-Detektors bei einer Wellenlänge von 210 nm. Bei diesen Wellenlängen absorbierten aber auch viele Bestandteile der Melasseschlempe (aromatische Moleküle) und es kam zu einem schlechten Signal - Rausch Verhältnis. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen ist im Anhang zu finden (Tabelle A im Anhang).

Die hydrolysierenden Bakterien sind eine Untergruppe der gärenden Organismen und konnten nicht über HPLC-Untersuchungen identifiziert werden. Isolat 18 (*Clostridium celerecrescens*) und Isolat 31 (*Ruminococcus albus*) wurden aus Ansätzen mit Cellulose als Substrat isoliert. Daher wurden diese Organismen den hydrolytischen Organismen zugeordnet. Die Mehrzahl der Isolate gehörte zur Gruppe der Gärer.

Lactat wurde bei den Isolaten 7, 8, 25 (*Lactobacillus* sp.) und bei Isolat 10 (*Bifidobacterium* sp.) als Hauptprodukt des Stoffwechsels nachgewiesen. Bei Isolat 7 konnte Acetat in geringen Mengen gemessen werden und bei Isolat 8 konnte Ethanol in geringen Mengen nachgewiesen werden. Bei Isolat 10 konnte Acetat als Nebenprodukt des Stoffwechsels gemessen werden. Bei Vertretern der Gattung *Clostridium* (Isolate 18, 32 und 42), *Eubacterium* (Isolat 53), *Ruminococcus* (Isolat 29) und *Paenibacillus* (Isolat 35) konnte Lactat als Stoffwechselprodukt gemessen werden. Bei diesen Isolaten trat Lactat aber nicht als Hauptprodukt des Stoffwechsels auf.

Ethanol konnte bei den Gattungen *Clostridium* (Isolate 18, 32 und 42), *Ruminococcus* (Isolat 29), *Bacteroides* (Isolat 30) und bei *Lactobacillus* (Isolat 8) als Stoffwechselprodukt nachgewiesen werden.

Propionat war das Hauptprodukt bei der Vergärung von Melasseschlempe bei Isolat 3 (*Propionibacterium microaerophilum*) und bei Isolat 23 (*Clostridium propionicum*). In beiden Fällen konnte Acetat als weiteres Stoffwechselprodukt eindeutig nachgewiesen werden. Bei Isolat 14 (SJA-136), Isolat 18 (*C. celerecrescens*), Isolat 29 (*Ruminococcus* sp.) und Isolat 35 (*Paenibacillus* sp.) konnte Propionat in geringen Mengen als Stoffwechselprodukt nachgewiesen werden.

Butyrat war das Hauptprodukt des Stoffwechsels von Isolat 14 (SJA-136), Isolat 53 (*Eubacterium cylindroides*) und den Isolaten 61 und TMB2 (*Clostridium butyricum*). Bei Isolat 14 konnte neben Butyrat auch die Produktion von Acetat und Propionat nachgewiesen werden. Isolat 53 produzierte bei der Vergärung von Glucose neben Butyrat auch Acetat und Ethanol als Nebenprodukte. Darüber hinaus ließ sich Succinat in geringen Konzentrationen nachweisen. Die Isolate 61 und TMB2 produzierten neben Butyrat auch Acetat. Das Isolat TMB39 war in der Lage Trimethoxybenzoat unter Spaltung des aromatischen Rings zu Butyrat und Acetat zu vergären.

Acetat wurde von der Mehrzahl der untersuchten Organismen gebildet. Bei Isolat 1 (*Desulfovibrio termitidis*) und Isolat MIX1 (*D. desulfuricans*) war Acetat das alleinige Stoffwechselprodukt bei der Verwertung von Lactat. Dabei kam es zur Produktion von H_2S , das sich gaschromatographisch nachweisen ließ. Isolat 11 (*Acetobacterium woodii*) konnte Glucose vollständig zu Acetat umsetzen. Weitere Stoffwechselprodukte konnten nicht nachgewiesen werden. Beim Wachstum auf Melasseschlempe bildeten Isolat 16 (*Clostridium spiroforme*), Isolat 21 (*Acetobacterium paludosum*) und Isolat 27 (*Ruminococcus hydrogenotrophicus*) große Mengen Acetat. Andere Stoffwechselprodukte traten nur in geringen Konzentrationen auf und ließen sich auf die komplexe Zusammensetzung der Melasseschlempe zurückführen. Isolat TMB39 (*Sporobacterium olearium*) produzierte beim vollständigen Abbau von Trimethoxybenzoat Acetat und Butyrat.

Bei Isolat 3 (*Propionibacterium microaerophilum*) und bei Isolat 23 (*Clostridium propionicum*) trat Acetat beim Wachstum auf Melasseschlempe als Stoffwechselprodukt neben Propionat auf. Isolat 12 (*Papillibacter cinnaminovorans*) produzierte beim Wachstum auf Melasseschlempe geringe Mengen von Acetat. Da dieser Organismus nur sehr langsam wuchs und nur geringe Zelldichten erreichte, waren die Ergebnisse der physiologischen Untersuchung unsicher. Weitere Produkte konnten bei Messungen mit Melasseschlempe als Substrat nicht eindeutig als Stoffwechselprodukte von Isolat 12 identifiziert werden. Isolat 53 (*Eubacterium cylindroides*) produzierte beim Wachstum auf Glucose neben dem Hauptprodukt Butyrat auch Acetat und Ethanol. Succinat konnte zusätzlich in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Formiat konnte nur bei zwei Isolaten als Stoffwechselprodukt nachgewiesen werden. Isolat 35 (*Paenibacillus* sp.) und Isolat 42 (*Clostridium clostridiiformis*) produzierten Formiat in geringen Mengen.

Succinat wurde als Stoffwechselprodukt bei drei Isolaten in geringen Mengen nachgewiesen. Isolat 29 (*Ruminococcus* sp.), Isolat 32 (*Clostridium aerotolerans*) und Isolat 53 (*Eubacterium cylindroides*) produzierten bei der Vergärung von Glucose nachweisbare Spuren von Succinat.

3.8 Evaluierung mikrobiologischer Parameter für einen Einsatz bei der Reaktorsteuerung

Ein Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Evaluierung mikrobiologischer Parameter für einen Einsatz bei der Steuerung anaerober Reaktorsysteme. Für einen

sinnvollen Einsatz mikrobiologischer Methoden müssen die Ergebnisse von Untersuchungen in relativ kurzer Zeit zur Verfügung stehen und Änderungen im Reaktor direkt und ohne zeitliche Verschiebung anzeigen. Die Ergebnisse von molekularbiologischen Methoden wie der Fluoreszenz in situ Hybridisierung stehen innerhalb weniger Stunden zur Verfügung und sind daher besser als die zeitaufwendigen Kultivierungen für eine schnelle Charakterisierung der Reaktorbiozönose geeignet.

Anhand verschiedener Experimente am Reaktor wurde das Ansprechverhalten der in situ Hybridisierung untersucht. Durch Abschalten der Substratzufuhr wurde die Reaktorpopulation einer Substratlimitierung ausgesetzt. Mit Hilfe der in situ Hybridisierung wurde die Reaktion verschiedener Populationen auf den Substratmangel über einen Zeitraum von einem Monat verfolgt. Nach vier Wochen wurde wieder Substrat zugegeben und beobachtet, wie schnell die Zellen auf die Aufhebung der Mangelsituation reagierten (Abbildung 3.31). Diese Messungen wurden an der Versuchsanlage (27 l Volumen) durchgeführt. Die Probenahme erfolgte in der versäuernden Stufe an der Probenahmestellen 3 und in der methanogenen Stufe an der Probenahmestelle 6, jeweils in der Mitte des Reaktors.

Die Zellzahl im Reaktor reagierte auf das Ende der Substratzufuhr mit einer langsamen, aber messbaren Abnahme. Die Werte fielen von etwa 2×10^{10} Zellen/ml in dreißig Tagen um eine Größenordnung auf einen Wert von $1,5 \times 10^9$ Zellen/ml. Nach Beginn der Substratzufuhr stiegen die Zellzahlen dann innerhalb einer Woche wieder auf Werte von $2,6 \times 10^{10}$ Zellen/ml. Diese Werte lagen fast 25 % über den Ausgangswerten.

Die Hybridisierung der Reaktorpopulation mit der EUB 338 Sonde ergab, dass die Zahl der hybridisierbaren Zellen nach dem Abschalten der Substratzufuhr über einen Zeitraum von etwa 10 Tagen gleichmäßig von etwa 35 % auf ca. 5 % der mit DAPI detektierbaren Zellen abnahm und sich danach auf einem gleichbleibenden Niveau von etwa 3 - 5 % einpendelte. Über einen Zeitraum von zwei Wochen ließ sich keine weitere Abnahme der Zahl der hybridisierbaren Zellen feststellen. Nach Beginn der Substratzugabe stieg die Zahl der hybridisierbaren Zellen innerhalb von 5 Tagen auf über 45 % im ersten Reaktor und auf ca. 30 % im zweiten Reaktor.

Sulfatreduzierende Bakterien reagierten auf ein Abschalten der Substratzufuhr ebenfalls mit einer Abnahme der Zahlen hybridisierbarer Zellen. Die Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien, die sich über in situ Hybridisierung erfassen ließen, sank kontinuierlich von ca. 5 % auf Werte deutlich unter 1 % der Gesamtzellzahl. Dabei

konnten keine Unterschiede zwischen Reaktor 1 und Reaktor 2 festgestellt werden. Nachdem die Substratzufuhr wieder einschaltet wurde, stiegen die Zahlen der detektierbaren Sulfatreduzierer in beiden Reaktoren innerhalb von 20 Tagen auf etwa 10 % der Gesamtzellzahl. Damit lagen die Zellzahlen der aktiven sulfatreduzierenden Bakterien nach dem Experiment fast doppelt so hoch wie vor dem Experiment

Bakterien des Phylums *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* reagierten wie die sulfatreduzierenden Bakterien auf ein Abschalten der Substratzufuhr. Die Zahl der hybridisierbaren Zellen fiel von über 12 % kontinuierlich auf Werte von unter 3 % der mit DAPI detektierbaren Zellen. Danach war keine weitere Abnahme der Zahlen messbar. Nach Beginn der Substratzufuhr stieg die Zahl der hybridisierbaren Zellen stark an und erreichte in Reaktor 1 innerhalb von 5 Tagen Werte von bis zu 25 % der mit DAPI detektierbaren Zellen. Der Anstieg der Zahl hybridisierbarer Zellen war auch in Reaktor 2 messbar. Hier stiegen die Zahlen allerdings nur auf maximal 10 % der Gesamtzellzahl.

Archaeen reagierten im untersuchten Zeitraum nicht merklich auf das Ende der Substratzufuhr. Die Zahlen lagen konstant zwischen 1 % und 5 % der Gesamtzellzahl. Ein Unterschied der Zellzahlen zwischen Reaktor 1 und Reaktor 2 war nicht messbar. Der Beginn der Substratzufuhr wirkte sich erst mit deutlicher Verzögerung auf die Archaeen aus. Ein messbarer Effekt trat erst zwei Wochen nach dem erneuten Beginn der Substratzufuhr ein. Die Zellzahlen der Archaeen stiegen deutlich an und erreichten Werte von fast 10 % in Reaktor 1. In Reaktor 2 ließ sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der Zellzahl aktiver Methanogener feststellen. Die Werte erreichten hier 7 % und lagen damit dreimal so hoch wie vor Beginn des Experiments.

Alle physiologischen Gruppen, mit Ausnahme der Archaeen, zeigten ein vergleichbares Verhalten bei veränderter Substratzufuhr. Nach Ausschalten der Substratzufuhr ging die Zahl der hybridisierbaren Zellen langsam auf einen Schwellenwert zurück und fiel im Folgenden nicht unter diesen Wert. Nachdem die Substratzufuhr wieder eingeschaltet war, stieg die Zahl der hybridisierbaren Zellen schnell wieder an. Dabei wurden Werte erreicht, die deutlich über den Anfangswerten lagen.

Bei allen Experimenten zeigte sich ein asymmetrisches Verhalten mit einer langsamen Abnahme der Zahlen hybridisierbarer Zellen, wenn die Substratzufuhr

abgestellt wurde und einer schnellen Zunahme beim erneuten Start der Substratzufuhr.

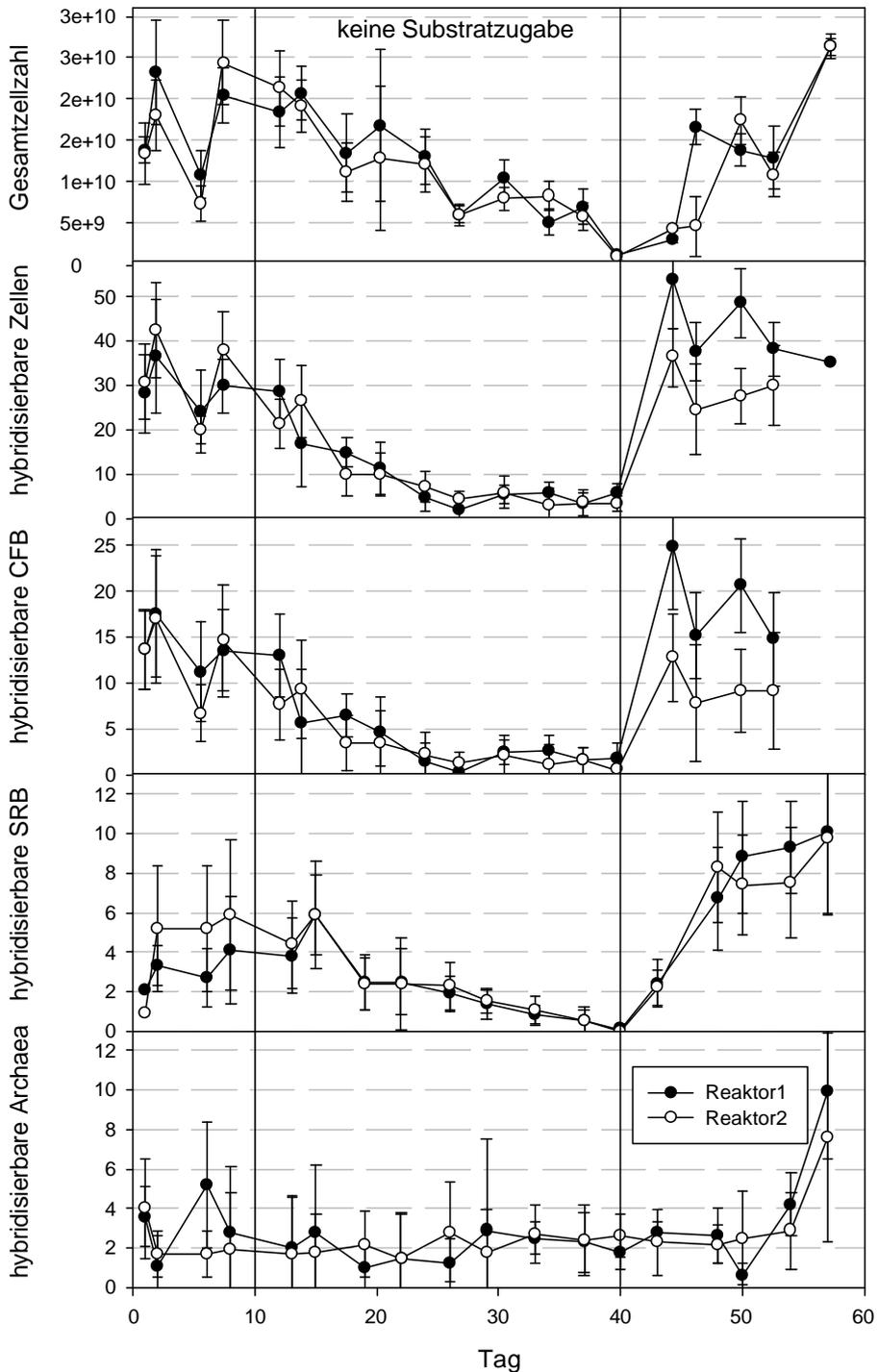


Abbildung 3.31: Reaktion verschiedener physiologischer Gruppen bei veränderter Substratzufuhr. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte über mikroskopische Zählung, die Hybridisierungen wurden mit den Sonden EUB338 (hybridisierbare Zellen), SRB385db (sulfatreduzierende Bakterien), CF319ab und BAC303 (CFB-Cluster) und ARCH915 (methanogene Archaeen) durchgeführt.

Ein direkter Vergleich mikrobiologischer Parameter (Hybridisierungssignale, EUB338) mit verfahrenstechnischen Parametern (Biogasproduktion) zeigte, dass die verfahrenstechnischen Summenparameter deutlich schneller eine Verschlechterung der Reaktorleistung anzeigen. Innerhalb von 24 Stunden nach Abschalten des Substratstroms fiel die Biogasproduktion auf 10 % des Ausgangswertes und kam innerhalb von drei Tagen vollständig zum Erliegen. Hybridisierungen mit der EUB338-Sonde ergaben, dass die Zahl der hybridisierbaren Zellen deutlich langsamer abnahm. Erst nach 9 Tagen (216 Stunden) konnte keine weitere Abnahme der Zahl der hybridisierbaren Zellen mehr festgestellt werden (Abbildung 3.32). Dabei zeigten immer noch 5 % der Gesamtpopulation gute bis sehr gute Hybridisierungssignale.

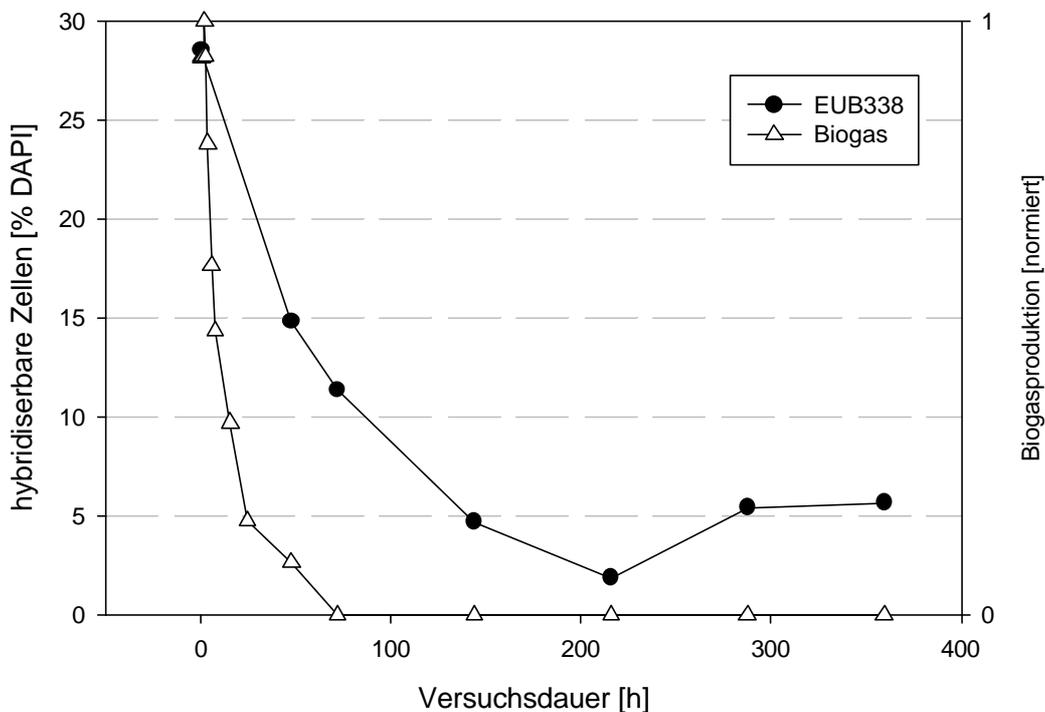


Abbildung 3.32: Vergleich der hybridisierbaren EUB und des Biogasvolumenstroms für ein Abfahrexperiment.

In einem Experiment zur Wiederinbetriebnahme des Anaerobreaktors wurden die Zahl der mit der Sonde EUB338 hybridisierbaren Zellen und der Biogasvolumenstrom aufgenommen. Bei diesem Experiment gab es eine deutlich engere Verknüpfung zwischen verfahrenstechnischen und mikrobiologischen Parametern. Die Zahl der hybridisierbaren Zellen erreichte wie der Biogasvolumenstrom nach dem dritten Tag (72 Stunden) das Maximum (Abbildung 3.33). Die in situ

Hybridisierung ist also nur mit Einschränkungen für die Überwachung des Reaktorzustandes geeignet. Negative Effekte auf die Reaktorleistung spiegeln sich erst spät in der Zahl hybridisierbarer Zellen wieder. An dieser Stelle reagieren verfahrenstechnische Summenparameter wie die Biogasproduktion deutlich schneller auf Veränderungen des Reaktorzustandes.

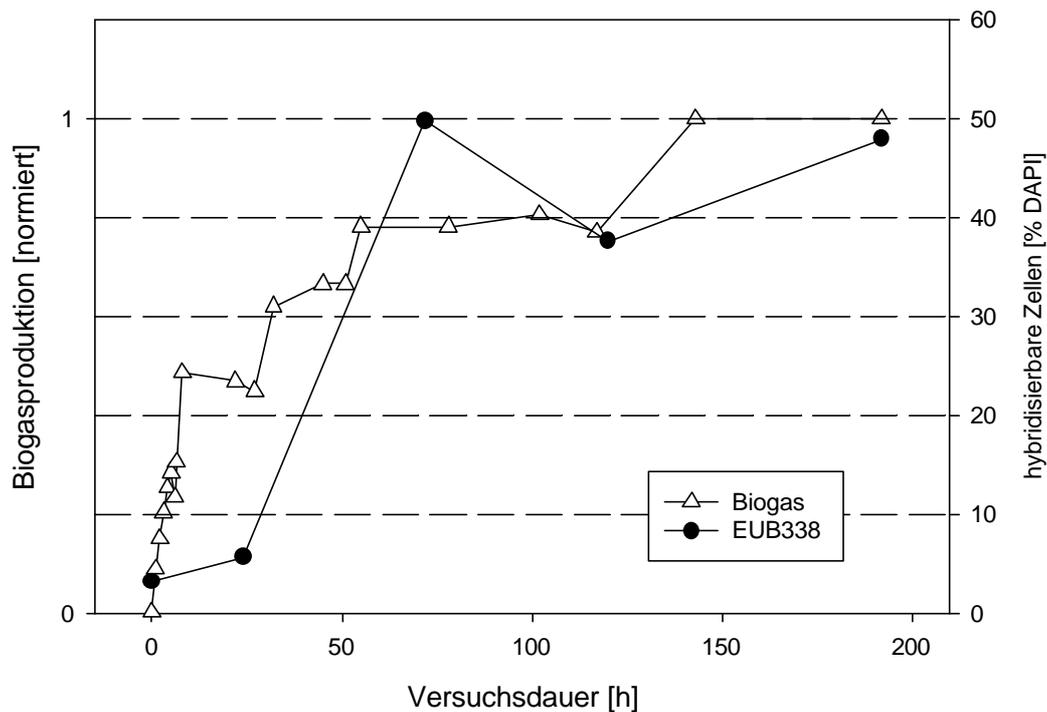


Abbildung 3.33: Vergleich des Biogasvolumenstroms mit der Zahl der hybridisierbaren Zellen während eines Anfahrperiments.

3.9 Einsatz mikrobiologischer Verfahren bei der Reaktorsteuerung

Obwohl sich bei der Evaluierung mikrobiologischer Verfahren für den Einsatz in der Reaktorsteuerung gezeigt hatte, dass die in situ Hybridisierung nur eingeschränkt nutzbar ist, war es möglich, diese Methode erfolgreich zur Diagnose von Reaktorzuständen einzusetzen und den Erfolg eingeleiteter Maßnahmen zu dokumentieren. Anhand zweier Fallbeispiele sollen die Möglichkeiten mikrobiologischer Methoden demonstriert werden.

3.9.1. Gezielte Beeinflussung der Bakterienpopulation in der Anfahrphase

Beim untersuchten Reaktor kam es während der Anfahrphase nur zu unbefriedigenden Abbauraten. Verfahrenstechnische Maßnahmen wie die Reduzierung des CSB-Eingangswertes zeigten keinen Einfluss auf die Reaktorleistung. Eine

Hybridisierung mit der EUB338-Sonde ergab, dass der überwiegende Teil der Population nur schwache Signale zeigte. Deshalb wurde eine geringe physiologische Aktivität der Reaktorpopulation angenommen. Als Ursache für diese reduzierte physiologische Aktivität wurde eine Substratlimitierung oder eine Hemmung vermutet. Zur Stimulierung der Stoffwechselaktivität wurde für 16 Stunden ein synthetisches Abwasser zugefüttert, das Glucose, Lactat und Ethanol enthielt.

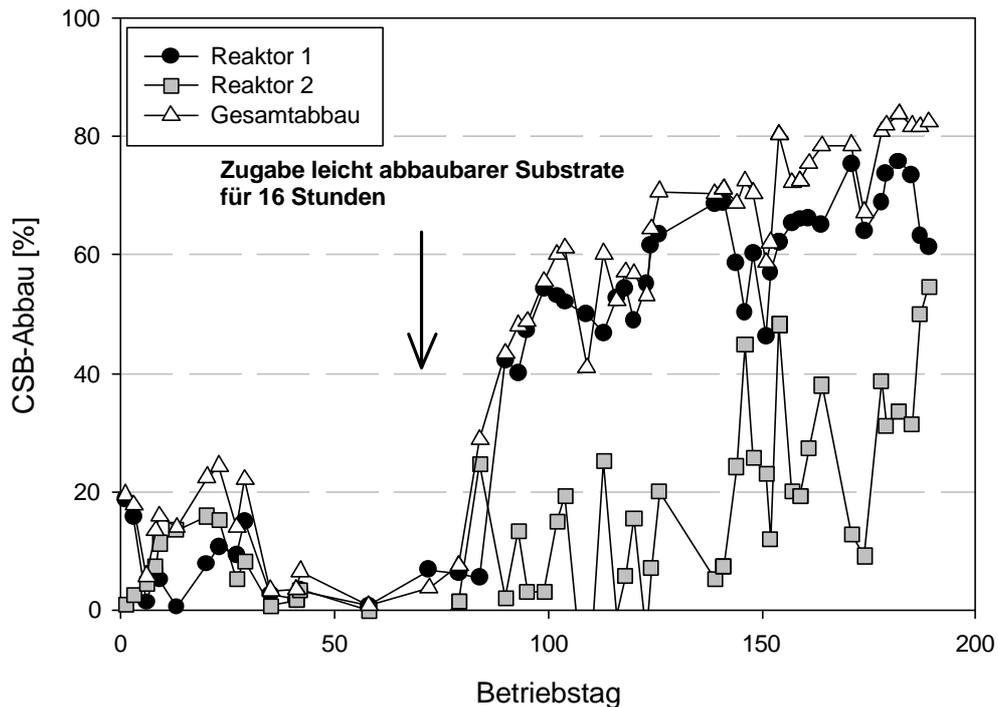


Abbildung 3.34: Darstellung des Anfahrverhaltens der Versuchsanlage anhand des CSB-Abbaugrades.

Innerhalb dieser Zeit hatten die Organismen auf diese Maßnahme reagiert. Die Hybridisierungssignale waren nach dieser Maßnahme deutlich stärker als vor der Anfütterung. Der prozentuale Anteil der mit der Sonde EUB338 hybridisierbaren Zellen an der Gesamtpopulation verdreifachte sich innerhalb von 16 Stunden (Tabelle 3.3). Die Auswirkungen auf den zweiten Reaktor waren nicht so stark ausgeprägt, aber auch in diesem Reaktor ließen sich deutlich verbesserte Sondensignale feststellen.

Tabelle 3.3: Anteil der hybridisierbaren Zellen an der Gesamtzellzahl während eines Anfahrexperiments

| hybridisierbare Zellen [% DAPI] | Zeit nach der Anfütterung [h] | | |
|------------------------------------|-------------------------------|--------|--------|
| | 0 | 4 | 16 |
| Reaktor 1 | 15 ± 3 | 14 ± 5 | 45 ± 7 |
| Reaktor 2 | 12 ± 4 | 13 ± 4 | 18 ± 5 |

Auch bei den verfahrenstechnischen Parametern ließ sich die Stimulierung der Population nachweisen. Der Abbaugrad stieg von 10 % auf etwa 60 % und blieb auch nach Beenden der Zufütterung auf diesem Niveau (Abbildung 3.34). In der Folgezeit konnte trotz Erhöhung der CSB-Zulaufkonzentration von 15 g/l auf 25 g/l eine weitere Steigerung des Abbaugrades auf über 80 % erreicht werden.

3.9.2. Reinstallation einer physiologischen Gruppe

Der anaerobe Abbau kann nur dann vollständig ablaufen, wenn alle physiologischen Gruppen im Reaktor auftreten und physiologisch aktiv sind. Dies kann innerhalb kurzer Zeit durch die in situ Hybridisierung untersucht werden. Diese Methode kann einen wichtigen Beitrag bei der Diagnose des Reaktorzustands sowie bei der Entwicklung und Überwachung von gezielten Maßnahmen zur Lösung auftretender Probleme leisten.

Die Laboranlage wurde mit Material aus der Versuchsanlage angeimpft und mit einem CSB von 15 g/l angefahren. Im Verlauf der Anfahrphase akkumulierten kurzkettige Fettsäuren als Produkte der acidogenen Population im Reaktor (Abbildung 3.35). Der anaerobe Abbau fand nur bis zum Acetat statt und Methan konnte nicht im Biogas nachgewiesen werden. Als Konsequenz fiel der pH-Wert auf pH 4,5. Bei diesen pH-Werten liegen die Fettsäuren vorwiegend undissoziiert vor und können in dieser Form die Zellmembran passieren. Im Cytoplasma liegt der pH-Wert in der Regel deutlich höher und die undissoziierten Fettsäuren gehen spontan in die dissoziierte Form über. Dadurch kommt es zu einer Entkopplung von Stoffwechselaktivität und ATP-Generation, da der Protonengradient über der Zellmembran abgebaut wird. Es war also anzunehmen, dass die methanogene Population durch die Akkumulation der Fettsäuren entweder gehemmt oder geschädigt war.

Eine Erhöhung der Verweilzeit, ein Absenken der Fettsäurekonzentration und eine Regulierung des pH-Wertes auf 7 zeigten keinen Effekt auf die Leistungsfähigkeit des Reaktors, so dass eine einfache Hemmung ausgeschlossen werden konnte und von einer Schädigung der methanogenen Population ausgegangen werden musste. Mikrobiologische Untersuchungen bestätigten diese Vermutung. Weder durch in situ Hybridisierung noch durch die Anregung des Cofaktors F_{420} ließen sich Methanogene im Reaktor nachweisen. Darüber hinaus war es nicht möglich, in einer Anreicherungskultur mit Material aus diesem Reaktor Methanogene nachzuweisen. Es war also davon auszugehen, dass die Schädigung der methanogenen Population irreversibel war.

Als Maßnahme zur Lösung dieses Problems wurde eine methanogene Population neu in den Reaktor installiert. Dazu wurden zuerst die toxischen Konzentrationen der Fettsäuren und der niedrige pH-Wert aufgehoben, indem der Reaktor mit frischer Melasseschlempe gespült wurde. Anschließend wurde die Laboranlage mit einer methanogenen Anreicherungskultur, die aus der Versuchsanlage gewonnen worden war, angeimpft und pH-optimiert angefahren. Innerhalb von sechs Wochen fielen die Konzentrationen aller Fettsäuren, mit Ausnahme von Propionat, deutlich und der pH-Wert blieb stabil (Abbildung 3.35). Methan konnte im Biogas nachgewiesen werden und ein CSB-Abbau fand statt. Im Reaktor konnten aktive Methanogene mit Hilfe der in situ Hybridisierung nachgewiesen werden .

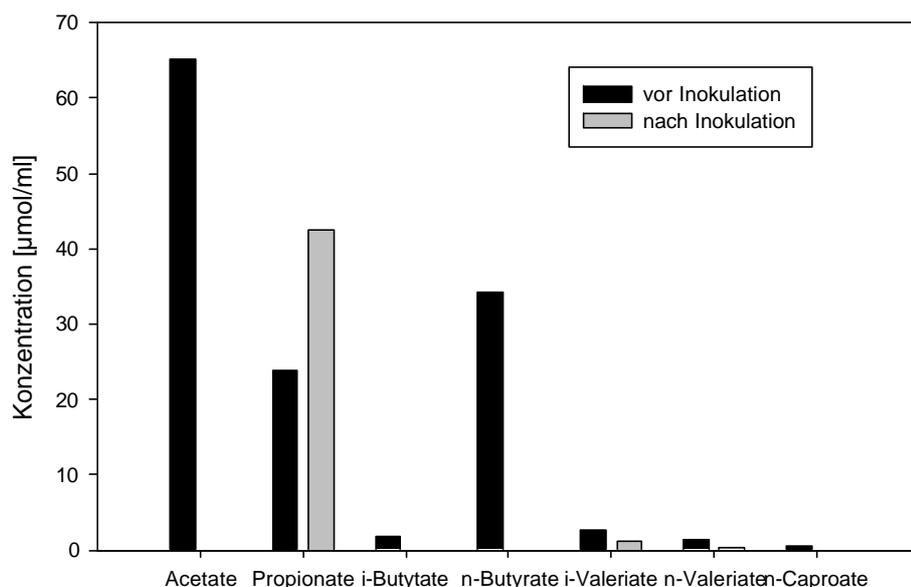


Abbildung 3.35: Fettsäurespektrum im Reaktor vor und nach Animpfung mit Methanogenen.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines Anaerobreaktors zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe. Dabei wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, um die mikrobielle Biozönose und die Stoffwechselprozesse im Reaktor zu beschreiben. Zusätzlich wurden verfahrenstechnische Experimente mikrobiologisch begleitet, um das Potential mikrobiologischer Verfahren für den Einsatz bei der Reaktorsteuerung abzuschätzen. In der folgenden Diskussion werden die eingesetzten Methoden bewertet und die gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

4.1 Bewertung der eingesetzten Methoden zur Beschreibung des Reaktors

Die Biozönose wurde mit kultivierungsunabhängigen und mit kultivierungsabhängigen Methoden beschrieben. Mikroskopische Methoden wurden mit molekularbiologischen Methoden wie der in situ Hybridisierung ergänzt, um innerhalb kurzer Zeit einen Überblick über die Zusammensetzung der Population zu erlangen. Durch MPN-Untersuchungen wurde die Verteilung verschiedener physiologischer Gruppen im Reaktor untersucht. Diese MPN-Untersuchungen dienten gleichzeitig als Ausgangspunkt für die Isolierung der Organismen. An den Isolaten wurden physiologische Untersuchungen durchgeführt, mit denen auf die Funktion der Organismen im Reaktor geschlossen werden konnte.

4.1.1. Beschreibung der Biozönose mit lichtmikroskopische Methoden

Lichtmikroskopische Untersuchungen sind aufgrund der geringen morphologischen Diversität der Bakterien in ihrer Aussagekraft limitiert. Während bei vielen Eukaryonten aufgrund verschiedener morphologischer Merkmale eine taxonomische Einordnung vorgenommen werden kann, ist die Zellmorphologie von Bakterien und Archaeen, mit wenigen Ausnahmen, nicht ausreichend divers, um Rückschlüsse auf die taxonomische Zugehörigkeit der beobachteten Zellen ziehen zu können. Nur vereinzelt lassen ungewöhnliche Morphotypen erste Rückschlüsse auf eine taxonomische Einordnung zu.

So war die Zellmorphologie von Isolat 16 sehr auffällig. Eine derartig starke Krümmung, wie sie Isolat 16 aufweist, ist nur für wenige Organismen beschrieben, unter anderem für einige Arten der Gattung *Clostridium* (Himmelbloom und Canale-Parola 1989; Kaneuchi et al. 1979) und für *Rhodocyclus purpureus*, einen Vertreter

der *Rhodospirillaceae* (Pfennig 1978). Isolat 16 konnte auf der Basis der 16S rDNA-Sequenz in die Gattung *Clostridium* eingeordnet werden und war eng mit den Arten verwandt, für die diese typische Zellmorphologie beschrieben ist. Dies zeigt, dass bei Bakterien nur eine vorläufige taxonomische Einordnung aufgrund morphologischer Merkmale möglich ist. Für die Vielzahl der Arten im Reaktor ist aber selbst eine grobe taxonomische Einordnung aufgrund der hohen Artendiversität und der geringen morphologischen Diversität der Zellen nicht möglich.

Durch die Anregung des Cofaktors F_{420} war es möglich, verschiedene Morphotypen autotropher Methanogener im Reaktor zu detektieren. Der Cofaktor F_{420} dient bei Methanogenen als Elektronenüberträger bei der Reduktion von CO_2 in der Methanogenese. Dieser Cofaktor wurde inzwischen auch außerhalb der Domäne Archaeen gefunden und tritt auch bei aeroben Actinomyceten und bei Cyanobakterien auf (Daniels et al. 1985; Eker et al. 1988; Mouton und Lamonde 1984). Während des gesamten Untersuchungszeitraums war es nicht möglich, Cyanobakterien im Reaktor nachzuweisen, obwohl diese Organismen aufgrund ihres Chlorophyllgehaltes sowohl lichtmikroskopisch als auch unter Einsatz der Epifluoreszenzmikroskopie durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls leicht zu identifizieren sind. Da das Auftreten von aeroben Actinomyceten in einem anaeroben System nicht sehr wahrscheinlich ist, konnte die Fluoreszenz des Cofaktors F_{420} direkt mit dem Auftreten von autotrophen Methanogenen korreliert werden. Die Gruppe der methanogenen Archaeen ist wenig divers und teilt sich in fünf Ordnungen ein (Boone et al. 1993). Eine vorläufige taxonomische Einordnung anhand morphologischer Merkmale war daher durch die fluoreszenzunterstützte lichtmikroskopische Untersuchung möglich.

Die methanogenen Archaeen der Gattung *Methanosarcina* traten im Reaktor in Form von großen Zellagglomeraten auf. Diese Zellagglomerate waren oft in Flocken eingebettet und ließen sich lichtmikroskopisch eindeutig identifizieren. Durch den Nachweis der Autofluoreszenz des Cofaktors F_{420} konnte die lichtmikroskopische Identifizierung bestätigt werden (Abbildung 3.2). Die Tatsache, dass *Methanosarcina* sp. nicht in Form von Einzelzellen sondern als Zellagglomerat auftrat, ließ außerdem erste Rückschlüsse auf den physiologischen Status dieser Zellen zu. Bei exponentiellem Wachstum tritt *Methanosarcina* sp. in Form von Einzelzellen auf und bildet beim Übergang in die stationäre Phase Zellaggregate (Barker 1936). Diese Form wird als Überlebensstrategie bei ungünstigen

Umweltbedingungen angesehen (Maestrojuan und Boone 1991). Im Reaktor wurde *Methanosarcina* überwiegend in Zellaggregaten gefunden. In jungen Anreicherungskulturen mit Acetat oder Trimethylamin konnten fast ausschließlich Einzelzellen gefunden werden. In älteren Anreicherungskulturen traten dann wieder Zellagglomerate auf. Beide Formen waren also ineinander überföhrbar, was den Schluss nahe legt, dass die Zellen im Reaktor nicht wuchsen, sondern sich in der stationären Phase befanden. Damit war es möglich, durch lichtmikroskopische Untersuchungen erste Rückschlüsse auf den physiologischen Status der Organismen im Reaktor zu ziehen.

Da die Lichtmikroskopie nur eine eingeschränkte Aussage über die Biozönose zuließ, wurde zusätzlich versucht, mit einfachen Färbemethoden wie der Gramfärbung weitere Informationen über die Zusammensetzung der Population zu gewinnen. Die Ergebnisse dieser Experimente ließen aber keine klaren Rückschlüsse zu und waren nicht reproduzierbar. Untersuchungen an den Reinkulturen ergaben, dass ein Teil der Organismen ein Gram-variables Färbeverhalten zeigte. So ließen sich zum Beispiel die Zellen von Isolat 9 (*Eubacterium* sp.), Isolat 36 (*E. plautii*) Isolat 23 (*Clostridium propionicum*), Isolat 42 (*C. clostridiiformis*) und Isolat 17 (*Acidaminococcus* sp.) nicht eindeutig über eine Gramfärbung einordnen. Aus diesem Grund wurden die Gram-Färbungen nicht weiter fortgeführt.

Das Problem einer unzuverlässigen Gram-Färbung könnte in Zukunft durch Membranhybridisierungen mit einer gruppenspezifischen Oligonukleotidsonde für Gram positive Organismen umgangen werden (MacGregor et al. 2001). Diese Sonde wurde allerdings nicht für in situ Untersuchungen, sondern für Membranhybridisierungen entwickelt. Damit sind die Einsatzmöglichkeiten für eine detaillierte in situ Untersuchung von Mischkulturen eingeschränkt. Mögliche Anwendungsgebiete liegen aber in einem schnellen Screening von Reinkulturen und Klonbibliotheken, wenn die Gram-Färbung unzuverlässige Resultate liefert beziehungsweise nicht einsetzbar ist.

Trotz aller Einschränkungen hat die Lichtmikroskopie als einfache und schnelle Methode nach wie vor ihre Berechtigung bei der Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften. Informationen über Teile der Biozönose stehen schnell zur Verfügung, da abgesehen von der Probenahme nur wenige vorbereitende Schritte erforderlich sind. Durch den geringen präparativen Aufwand kann man räumliche

Strukturen wie Aggregate und Flocken in ihrem nativen Zustand beobachten und damit erste Rückschlüsse auf die im Reaktor ablaufenden mikrobiologische Prozesse ziehen. Die Tatsache, dass die Zellagglomerate von *Methanosarcina* sp. oft mit anderen Bakterien in Flocken eingebettet waren, kann darauf hindeuten, dass diese Organismen als wasserstoffzehrende Partner in syntrophen Prozessen dienen. Das Auftreten von Dauerstadien wie Sporen, die Beweglichkeit von Zellen oder das Vorhandensein von Speicherstoffen in den Zellen lassen Rückschlüsse auf die physiologische Aktivität der Zellen, beziehungsweise auf das Vorhandensein von Stressfaktoren zu. Durch die lichtmikroskopische Beobachtung der Reaktorbiozönose lässt sich also ein erster Eindruck über den vitalen Zustand der Zellen gewinnen, der allerdings durch den Einsatz anderer Methoden bestätigt werden sollte, bevor er in die Bewertung des Reaktorzustandes einbezogen werden kann.

4.1.2. Einsatz der Fluoreszenzin situ Hybridisierung für die Beschreibung der Biozönose

Die Möglichkeiten zur mikroskopischen Beschreibung der Reaktorpopulation konnten durch den Einsatz der Fluoreszenz in situ Hybridisierung deutlich erweitert werden. Bis zu 70 % der Reaktorpopulation ließen sich mit universellen Sonden anfärben (Abbildung 3.3). Vergleichbare Werte wurden auch in anderen technischen Systemen zur Abwasserbehandlung gefunden (Merkel et al. 1999; Plumb et al. 2001). Der hohe Anteil erfassbarer Organismen macht diese Methode zu einem geeigneten Werkzeug zur Beschreibung der mikrobiellen Population in anaeroben technischen Systemen (Amann et al. 1998). Ein weiterer Vorteil der in situ Hybridisierung ist die Möglichkeit, durch Sonden unterschiedlicher Spezifität bestimmte Teile der Population zu untersuchen. Die Spezifität der Sonden kann dabei niedrig sein und alle Organismen erfassen (Univ1392) (Giovannoni et al. 1988) oder hochspezifisch sein und eine Diskriminierung bis auf das Niveau einer Subspezies erlauben (Beimfohr et al. 1993; Salama et al. 1991). Damit lassen sich mit dieser Methode verschiedene ökologische Fragestellungen bearbeiten. Das Auftreten und die Verteilung phylogenetischer Gruppen lässt sich ebenso untersuchen wie das Auftreten einzelner Arten (Devereux et al. 1992; Harmsen et al. 1996b). Darüber hinaus kann durch den Einsatz unterschiedlich markierter Oligonukleotide die räumliche Struktur mikrobieller Biozönosen untersucht (Sekiguchi

et al. 1999) und damit auf mögliche Interaktionen zwischen den Zellen geschlossen werden.

Trotz aller Möglichkeiten treten bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung aber auch Probleme auf, die bei der Beurteilung dieser Methode berücksichtigt werden müssen. Die Signalintensität ist bei der in situ Hybridisierung direkt abhängig von der Anzahl der Ribosomen, die mit der eingesetzten Oligonukleotidsonde hybridisieren können. Bevor die Sonde an die Zielmoleküle gelangt, muss die Zellwand durchdrungen werden. Das kann bei Gram positiven Organismen mit einer mehrlagigen Mureinschicht problematisch sein. Tatsächlich konnten Penetrationsprobleme bei der in situ Hybridisierung beobachtet werden (Abbildung 3.4). Für Gram negative und Gram positive Zellen sind unterschiedliche Fixierungsprotokolle beschrieben, bei denen Gram positive Zellen mit Lysozym behandelt werden, um die Zellwand für die Oligonukleotidsonden durchlässig zu machen (Meier et al. 1999). Diese Vorgehensweise ist in Mischkulturen mit Gram positiven und Gram negativen Organismen kritisch, da es nur schwer möglich ist, einerseits die Zellwand Gram positiver Organismen ausreichend zu permeabilisieren und gleichzeitig die Integrität der Zellwände Gram negativer Zellen zu gewährleisten. Ein direkter Vergleich der Hybridisierungsergebnisse einer Probe, bei der Unterproben mit je einer der beiden Fixierungsmethoden behandelt wurden (Formaldehyd-Fixierung und Ethanol-Fixierung), erbrachte keine messbaren Unterschiede. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Behandlung der Proben mit Lysozym verzichtet.

Entscheidend für die Qualität der Ergebnisse einer in situ Hybridisierung ist außerdem die Konzentration der Ribosomen in den Zellen. Die Zahl der Ribosomen in einer Zelle hängt von ihrem physiologischen Status ab. Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase besitzen mehr Ribosomen als Zellen in der stationären Phase (Poulsen et al. 1993). In Systemen mit geringen Wachstumsraten kann daher die Detektion von Zellen mit Hilfe der in situ Hybridisierung schwierig sein. Die schon dargestellten lichtmikroskopischen Untersuchungen der Archaeen haben gezeigt, dass *Methanosarcina* sp. in Form von Zellaggregaten auftrat, was darauf hindeutet, dass *Methanosarcina* sp. im Reaktor nur langsam wuchs beziehungsweise in der stationären Phase war (Maestrojuan und Boone 1991). Daher konnte vermutet werden, dass auch andere Zellen im Reaktor nicht aktiv wuchsen, was eine Detektion mit Hilfe der in situ Hybridisierung erschwert, weil die

Signalintensität aufgrund der geringen Konzentration von Ribosomen dann nur gering ist.

Ein weiterer Faktor, der beim Einsatz der *in situ* Hybridisierung berücksichtigt werden muss, ist die Häufigkeit, mit der Vertreter einer Art oder einer Organismengruppe auftreten. Wenn das Verhältnis der Zielorganismen zu den anderen Zellen unter einen Grenzwert von $1:10^6$ fällt, wird es allein aus technischen Gründen schwierig, die Zielorganismen in der Probe zu detektieren (Amann und Schleifer 1995). Damit ist in Systemen mit hoher Diversität der Einsatz hochspezifischer Sonden zur Detektion von Einzelzellen auf der Artebene problematisch. Molekularbiologische Untersuchungen von Godon et al. (1997a) in anaeroben Abwasserreaktoren haben ergeben, dass diese Systeme hoch divers sind. Die häufigste isolierte Gensequenz wies nur einen Anteil von weniger als 5% an der gesamten Population auf und etwa 23% der Klone waren mit einem Anteil von weniger als 0,5% an der Gesamtpopulation vertreten (Godon et al. 1997a). Aus diesem Grund kann der Einsatz von hochspezifischen Oligonukleotidsonden in anaeroben Abwasserreaktoren schwierig sein, weil die Zielorganismen trotz guter Signalintensität nur vereinzelt detektiert werden können. So ließen sich in der vorliegenden Untersuchung Gram positive Organismen mit hohem G+C-Gehalt und α -Proteobakterien nur vereinzelt im Reaktor nachweisen, obwohl sich Vertreter aus beiden Gruppen isolieren ließen. Daraus lässt sich schließen, dass Vertreter dieser Gruppen zwar zur autochthonen Flora des untersuchten Anaerobreaktors gehören, aber aufgrund ihrer geringen Repräsentanz durch die *in situ* Hybridisierung nur schwer detektierbar sind. Daher sollte die Untersuchung einer mikrobiellen Biozönose mit mehr als einer Methode durchgeführt werden, damit es durch die Limitierungen einzelner Methoden nicht zu einem unvollständigen Bild der mikrobiellen Biozönose kommt.

Trotz der oben genannten Einschränkungen ist die *in situ* Hybridisierung eine interessante Methode zur Untersuchung mikrobieller Biozönosen. Es ist möglich, diese Methode zur Unterstützung anderer Untersuchungsverfahren einzusetzen. So ließen sich im Reaktor bei Hybridisierungen mit der Sonde CF319 a/b eindeutige Signale erkennen, aber keines der gewonnenen Isolate ließ sich mit dieser Sonde hybridisieren, was darauf hinweist, dass nicht alle im Reaktor auftretenden Arten isoliert wurden. Die *in situ* Hybridisierung lässt sich also für eine Abschätzung der Kultivierungseffizienz einsetzen, indem man die auftretenden Zellmorphologien *in situ* mit den Zellmorphologien der Isolate vergleicht. Diese Ergebnisse müssen

allerdings mit Vorsicht interpretiert werden, da es durch die Kultivierung durchaus zu einer Änderung der Zellmorphologie kommen kann.

4.1.3. MPN-Untersuchungen und Kultivierung

Die Kultivierung anaerober Bakterien erfordert einen beträchtlichen apparativen und präparativen Aufwand, um Sauerstoff vollständig aus dem System zu entfernen und ein reduzierendes Milieu zu garantieren.

Die Wachstumsraten anaerober Bakterien sind oft gering und die Isolierung dieser Organismen erfordert viel Zeit. Deshalb wurden die mikrobiologischen Populationen in natürlichen und technischen Systemen bisher nur selten durch Kultivierungsansätze untersucht (Delbès und Godon 1998). Die Alternative sind Untersuchungen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (Leclerc et al. 2001; Plumb et al. 2001; Wu et al. 2001). Als Argument für einen Einsatz dieser molekularbiologischen Methoden wird häufig die geringe Kultivierbarkeit der Organismen auf Standardmedien angeführt (Amann et al. 1992). Tatsächlich ist in vielen Systemen die Kultivierbarkeit beim Einsatz von Standardverfahren außerordentlich gering. Die Zahl der kultivierbaren Zellen liegt oft deutlich unter 1 % der Gesamtzellzahl. Sowohl in oligotrophen wie auch in eutrophen Systemen ließen sich allerdings auch deutlich mehr Zellen kultivieren, wenn die Kultivierungsbedingungen an die physikochemischen Parameter des untersuchten Systems angeglichen wurden (Bartsch et al. 1999; Bussmann et al. 2001; Kalmbach et al. 1997). Es ist also möglich, durch Anpassung der Kultivierungsmethoden an „natürliche“ Bedingungen die Zahl der kultivierbaren Zellen zu erhöhen.

Darüber hinaus bietet der modulare Aufbau der anaeroben Nahrungskette zusätzliche Möglichkeiten, die Artendiversität durch eine angepasste Isolierungsstrategie zu untersuchen. Mit spezifischen Substraten für unterschiedliche physiologische Gruppen können deren Vertreter selektiv angereichert und isoliert werden. Durch die selektive Anreicherung kann ein breites Spektrum unterschiedlicher Arten isoliert werden, wobei gleichzeitig die Zahl unterschiedlicher Organismen in den einzelnen Ansätzen gering bleibt. Kultivierungsansätze können also durchaus sinnvoll zur Beschreibung mikrobieller Systeme eingesetzt werden, auch wenn dies einen beträchtlichen Zeit- und Arbeitsaufwand bedeutet. Die Möglichkeit, physiologische Untersuchungen an den Isolaten durchzuführen, ist nur bei kultivierungsbasierenden Methoden gegeben und die Ergebnisse aus diesen

Untersuchungen sind ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des untersuchten Systems.

Mit Hilfe von MPN-Experimenten wurde die räumliche Verteilung der kultivierbaren Vertreter verschiedener physiologischer Gruppen untersucht. Dazu wurden verschiedene Substrate eingesetzt. Der Einsatz von Melasseschlempe als Substrat war naheliegend, weil der Anaerobreaktor mit diesem Substrat betrieben wurde. Mit diesem Substrat ließen sich bis zu 10 % der mit DAPI im Reaktor nachweisbaren Zellen kultivieren (Abbildung 3.10). Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss allerdings berücksichtigt werden, dass vermutlich nicht alle physiologischen Gruppen des anaeroben Abbaus gleichermaßen gut auf nativer Melasseschlempe wuchsen beziehungsweise mit den gewählten Kultivierungsmethoden nicht erfasst werden konnten. So wurden keine speziellen Isolierungen für syntrophe oder methanogene Bakterien durchgeführt und die Einbeziehung dieser funktionalen Gruppen in die Isolierungsstrategie würde zu einer Erhöhung des Anteils kultivierbarer Zellen führen.

Die Verteilung verschiedener physiologischer Gruppen wie sulfatreduzierende Bakterien, Homoacetogene und methanogene Archaeen im Reaktor ließ sich ebenfalls mit Hilfe von MPN-Experimenten untersuchen. Hierbei wurde die Möglichkeit genutzt, spezifische Produkte der verschiedenen Stoffwechselwege nachzuweisen.

Sulfatreduzierende Bakterien wurden durch die Präzipitatbildung von Sulfid mit Eisen(II)-Ionen nachgewiesen. Das sich bildende schwarze Eisensulfid färbte die Kolonien der sulfatreduzierenden Bakterien schwarz. Durch den spezifischen Nachweis der biogenen Sulfidproduktion war es möglich, ein Substratgemisch einzusetzen, auf dem verschiedene Vertreter sulfatreduzierender Bakterien in einem Ansatz anzureichern waren. Neben den sulfidogenen Organismen konnten in den Ansätzen auch nicht-sulfidogene Organismen angereichert werden (Tabelle B im Anhang). Da bei diesen Kolonien aber keine Schwarzfärbung auftrat, ließen sich diese Kolonien leicht von den Kolonien sulfatreduzierender Bakterien unterscheiden.

Homoacetogene wurden in den MPN-Ansätzen durch einen colorimetrischen Nachweis detektiert (Harriott und Frazer 1997; Liu 1997). Titan(III)-Ionen bilden mit je zwei benachbarten Hydroxylgruppen einen gelben Komplex, über den eine O-Demethylierung nachgewiesen werden kann. Als Substrat wurde Trimethoxybenzoat eingesetzt. Die O-Demethylierung kann von verschiedenen homoacetogenen Bakterien durchgeführt werden (Bache und Pfennig 1981; Mountfort et al. 1988),

aber der alleinige Einsatz methoxylierter Substrate für die Anreicherung und Isolierung homoacetogener Bakterien ist kritisch. Zum einen gibt es homoacetogene Bakterien, die nicht auf Trimethoxybenzoat wachsen (Daniel et al. 1991; Kane et al. 1991) und zum anderen ist die Fähigkeit zur Demethoxylierung nur ein Hinweis auf eine mögliche homoacetogene Aktivität. So zeigt die Isolierung von Isolat TMB5 (*Sphingomonas aromaticivorans*), dass im untersuchten System auch nicht homoacetogene Organismen substituierte Aromaten verwerten konnten, denn *S. aromaticivorans* fällt als aerober Organismus nicht unter die Definition für homoacetogene Bakterien, die ausschließlich obligat anaerobe Organismen umfasst (Balkwill et al. 1997).

Da der Nachweis der O-Demethylierung kein zwingendes Kriterium für die Zuordnung zu den homoacetogenen Bakterien ist, sollten zusätzliche Tests zur Entscheidung herangezogen werden. Ein solcher Test könnte zum Beispiel durch den Nachweis der Gene des Acetyl-CoA-Weges erfolgen (Lovell und Hui 1991). Mit diesem eindeutigen Nachweis für homoacetogene Bakterien wäre dann der Einsatz verschiedener Substrate bei den MPN-Schätzungen und bei der Isolierung möglich.

Homoacetogene Bakterien bilden keine phylogenetisch einheitliche Gruppe und sind auch physiologisch sehr divers (Drake et al. 1997). Durch den Einsatz eines einzelnen Substrats ist deshalb die Wahrscheinlichkeit gering, dass alle im untersuchten System vorhandenen homoacetogenen Bakterien isoliert werden können. Eine umfassende Isolierungsstrategie für Homoacetogene sollte zusätzlich eine Anreicherung mit H_2 und CO_2 beinhalten. In diesem Fall müssen zusätzlich auftretende autotrophe Organismen (Methanogene und Sulfatreduzierer) unterdrückt werden. Ein Kultivierungsmedium ohne Sulfat könnte das Auftreten von autotrophen Sulfatreduzierern verhindern und autotrophe Methanogene können durch den Einsatz von Bromethansulfonat oder Ethylen unterdrückt werden (Schink 1985).

Methanogene Archaeen ließen sich durch den gaschromatographischen Nachweis von Methan nachweisen. Um alle physiologischen Gruppen der methanogenen Archaeen zu erfassen, wurde ein Substratgemisch eingesetzt. Neben Trimethylamin, Methanol und Acetat wurden Formiat und H_2/CO_2 eingesetzt, um auch den obligat autotrophen Organismen einen Stoffwechsel zu ermöglichen (Zinder 1993). Der MPN-Test wurde, im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen, in Flüssigkultur durchgeführt, da ein Substrat (H_2/CO_2) sowie das Produkt (Methan) gasförmig waren. Da die Diffusion von Gasen in Agar beschränkt ist, ist der Einsatz von

Tiefagarshakes problematisch und würde die Substratversorgung sowie den Nachweis von Methan erschweren.

Die methanogene Population stand bei dieser Untersuchung nicht im Mittelpunkt des Interesses, weil diese physiologische Gruppe bereits in verschiedenen Arbeiten eingehend untersucht wurde (Griffin et al. 1998; Leclerc et al. 2001; Raskin et al. 1994a). Für eine in situ Untersuchung steht ein umfassender Satz von Oligonukleotidsonden zur Verfügung (Raskin et al. 1994b; Rocheleau et al. 1999; Sekiguchi et al. 1999; Sorensen et al. 1997).

Die MPN-Experimente haben sich in dieser Studie als wirkungsvolle quantitative Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Biozönose eines Anaerobreaktors erwiesen. Ein konsequenter Einsatz dieser Methode ist bei der Untersuchung mikrobiologischer Habitats mit kultivierungsbasierenden Methoden sinnvoll, weil dadurch das zahlenmäßige Auftreten und die räumliche Verteilung verschiedener physiologischer Gruppen untersucht werden kann und damit erste Rückschlüsse auf die Stoffflüsse möglich sind. Gleichzeitig können die verschiedenen Verdünnungsstufen der MPN-Experimente als Ausgangspunkt für die weitere Isolierung dienen. Durch den Einsatz von Einzelsubstraten in MPN-Ansätzen kann die Auflösung dieser Methode noch weiter gesteigert werden und damit das Auftreten von Spezialisten des anaeroben Abbaus mit ihren spezifischen Stoffwechselwegen untersucht werden.

Die Kultivierung und Isolierung der Organismen erfolgte im Rahmen dieser Studie in Tiefagarshakes mit verschiedenen Substraten und Elektronenakzeptoren (Tabelle 2.7). Durch den Einsatz von Tiefagarshakes wurde eine räumliche Trennung der Kolonien erreicht. Die Zellen waren im Agar immobilisiert und konnten durch die herabgesetzte Diffusion im Agar nur die lokal verfügbaren Substrate nutzen. Damit ließen sich auch langsam wachsende Organismen isolieren, die sich ansonsten in einer Flüssigkultur nicht gegen schnell wachsende Organismen hätten durchsetzen können. Die lokale Trennung der Einzelkolonien und die herabgesetzte Diffusion haben aber auch die Ausbildung syntropher Interaktionen zwischen wasserstoffproduzierenden und wasserstoffzehrenden Organismen verhindert. Diese Interaktionen sind charakteristisch für anaerobe Biozönosen und verschiedene Substrate wie zum Beispiel Propionat oder verschiedene Aromaten wie Phenol und Benzoat lassen sich ausschließlich syntroph vergären (Schink 1980).

Die Anreicherung und Isolierung obligat syntropher Organismen ist nur durch den Einsatz definierter Hintergrundkulturen möglich. Wasserstoffverwertende Organismen wie methanogene Archaeen, Sulfatreduzierer oder homoacetogene Bakterien können dabei als Hintergrundkultur eingesetzt werden und dann den Abbau der eingesetzten Substrate durch gärende Organismen ermöglichen. Zur Anreicherung obligat syntropher Organismen können Flüssigkulturen eingesetzt werden. Die Handhabung von Flüssigkulturen ist einfacher als die von Tiefagarshakes. Verdünnungsreihen lassen sich leichter herstellen und der Transfer des Inokulums mit Hilfe einer Spritze kann schneller durchgeführt werden als der Transfer einer Kolonie aus einem Tiefagarshake in eine neue Verdünnungsreihe. Durch die ungehinderte Diffusion in der Flüssigkultur ist die Ausbildung mikrobieller Interaktionen leichter möglich als in Tiefagarshakes. Die Isolierung der obligat syntrophen Organismen kann nach einer erfolgten Anreicherung mit der beschriebenen Methode in Tiefagarshakes erfolgen, wobei auch hier eine Hintergrundkultur eines wasserstoffzehrenden Partners eingesetzt werden muss.

Die Effizienz der unterschiedlichen Kultivierungsansätze für die Isolierung anaerober Bakterien im untersuchten System wurde mit Hilfe der Rarefaction-Methode abgeschätzt. Hierbei handelt es sich um ein sehr robustes Verfahren, das nur wenig von der Art und der Größe der Stichprobe beeinflusst wird (Hurlbert 1971). In der vorliegenden Studie wurde versucht, möglichst viele unterschiedliche Arten der Reaktorbiozönose zu isolieren. Daher erfolgte eine willkürliche Auswahl der Kolonien anhand morphologischer Merkmale. Da die Koloniemorphologie aber wenig diskriminierend ist, wurden auch viele Kolonien mit gleicher Koloniemorphologie gepickt. Ein Vergleich der Effizienz unterschiedlicher Substrate für die Isolierung anaerober Bakterien aus dem untersuchten System konnte aber durchgeführt werden, weil bei allen Ansätzen die Kolonien nach der gleichen Methode ausgewählt wurden. Da zudem eine große Zahl von Kolonien gepickt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Proben einer statistischen Stichprobe nahe kommen. Diese Annahme wird auch durch den direkten Vergleich zweier unabhängiger Proben mit Melasseschlempe als Substrat bestätigt. In beiden Proben konnte eine vergleichbare Artenzahl ermittelt werden (Abbildung 3.30).

Insgesamt konnten mit den verschiedenen Kultivierungsansätzen 58 Arten aus 18 verschiedenen Gattungen isoliert werden. Mit Melasseschlempe konnten 36 verschiedene Arten isoliert werden, davon 21 Arten ausschließlich mit diesem

Substrat (Tabelle 3.2). Mit Ausnahme einer Gattung (*Sphingomonas*) konnten Vertreter aller in dieser Studie isolierten Gattungen auf diesem Substrat isoliert werden. Damit wiesen die Isolate, die mit Melasseschlempe isoliert werden konnten, die höchste Artendiversität auf. Unter den auf Melasseschlempe isolierten Organismen waren sowohl Generalisten, die viele verschiedene Substrate verwerten konnten (Isolat 61 *Clostridium butyricum*), als auch Spezialisten, die nur spezielle Substrate oder Gruppen von Substraten verwerten konnten (Isolat 34, *C. methylpentosum*).

Mit Glucose als Substrat konnten 21 verschiedene Arten aus acht verschiedenen Gattungen isoliert werden (Tabelle 3.2), aber alle auf Glucose isolierten Arten wurden auch auf Melasseschlempe isoliert (Tabelle B im Anhang). Rübenmelasseschlempe ist pflanzlichen Ursprungs und ein beträchtlicher Teil der Trockenmasse besteht aus pflanzlichen Zellwänden (Tabelle 2.1). Die Cellulose wird beim mikrobiellen Abbau durch Exoenzyme der hydrolytischen primären Gärer in die Zuckermonomere (u.a. Glucose) gespalten. Damit lässt sich erklären, dass alle Isolate, die mit Glucose als Substrat isoliert werden konnten, auch mit Melasse als Substrat isoliert wurden. Daher brachte der Einsatz von Glucose keine weiteren Erkenntnisse über die Zusammensetzung der mikrobielle Biozönose des untersuchten Anaerobreaktors.

Aus den MPN-Ansätzen für sulfatreduzierende Bakterien ließen sich nur zwei verschiedene Arten isolieren, die beide der Gattung *Desulfovibrio* angehörten (Abbildung 3.24). Sulfatreduzierende Bakterien konnten zusätzlich auch mit Melasseschlempe isoliert werden und traten auch in Ansätzen mit Lactat oder Ethanol auf, wenn zusätzlich Sulfat als Elektronenakzeptor zugegeben wurde. Die Sequenzhomologie der 16S rDNA war aber so hoch, dass alle Isolate aus diesen Ansätzen entweder *Desulfovibrio desulfuricans* oder *D. termitidis* zugeordnet werden konnten. Auch wenn nur zwei verschiedene Arten isoliert werden konnten, sind die gewonnenen Ergebnisse wichtig für die Bewertung der mikrobiellen Biozönose.

Die geringe Artendiversität bei den sulfatreduzierenden Bakterien ist bemerkenswert und über das Zustandekommen dieser geringen Diversität lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise hat durch die Konstanz der Umweltparameter die Diversität in Teilen der Biozönose abgenommen. Durch die Betriebsführung wurden konstante Temperaturen und ein gleichmäßiger Eintrag von Nährstoffen aufrechterhalten. Der untersuchte Bioreaktor kann also mit einer Anreicherungskultur verglichen werden, in

der sich die am besten angepassten Organismen durchgesetzt haben. In einer Untersuchung eines vergleichbaren Anaerobreaktors haben die Autoren allerdings eine hohe Diversität gemessen und auch bei den sulfatreduzierenden Bakterien traten verschiedene Gattungen und Arten auf (Godon et al. 1997b). Eine weitere Ursache, die in Habitaten zu geringen Diversitäten führen kann, sind Störungen, die zur Auslöschung von Arten führen (Connell 1978). Nach solchen Störungen dominieren die überlebenden Arten im System, was zu einer geringen Diversität führt. Während des Untersuchungszeitraums kam es zum Zusammenbruch der Abbauleistung am 435. Betriebstag, der vermutlich auf eine Überlastung des Reaktors durch zu hohe Substratkonzentrationen zurückzuführen war (Kozariszczyk 2001). Bei derartigen Ereignissen kann es zu einer irreversiblen Schädigung von Teilen der Reaktorpopulation gekommen sein. Diese Vermutung ließ sich aber nicht durch Messergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen bestätigen und sollte in gezielten Experimenten untersucht werden. Abschließend lässt sich keine Begründung für die geringe Diversität der sulfatreduzierenden Bakterien aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen ableiten. Bevor eine sinnvolle Bewertung der Diversität sulfatreduzierender Bakterien im untersuchten System gemacht werden kann, sollte die Diversität dieser Organismen in möglichst vielen verschiedenen Anaerobreaktoren untersucht werden. Danach kann durch gezielte Experimente der Einfluss von Störungen auf die Diversität unterschiedlicher Teile der Reaktorpopulation geprüft werden.

Trimethoxybenzoat konnte erfolgreich als Substrat für die Kultivierung und Isolierung von homoacetogenen Bakterien eingesetzt werden. Insgesamt konnten neun verschiedene Arten mit TMB als Substrat isoliert werden, drei Arten konnten ausschließlich von diesem Substrat isoliert werden. Die Isolierung von Isolat TMB5 (*Sphingomonas* sp.), sowie der Isolate 11 und 21 (*Acetobacterium woodii* bzw. *A. paludosum*) in den Ansätzen mit Melasseschlempe als Substrat zeigt aber, dass zum einen nicht alle homoacetogenen Bakterien in diesem Ansatz isoliert wurden, und dass zum anderen auch nicht homoacetogene Bakterien mit diesem Ansatz erfasst wurden. Da die Isolate 11 und 21 aber auf TMB wuchsen, wären sie bei einer ausreichend großen Probenahme mit diesem Substrat isolierbar gewesen. Dies zeigt die Notwendigkeit, einen ausreichend großen Stichprobenumfang zu untersuchen.

Durch den Einsatz von Lactat oder Ethanol konnten keine zusätzlichen Isolate gewonnen werden. Da zudem nur wenige Isolate aus diesen Ansätzen gewonnen

wurden (Tabelle B im Anhang), konnten dadurch auch nur wenige zusätzliche Informationen über die mikrobielle Population im untersuchten System gewonnen werden. Da in der Melasseschlempen ausreichend Sulfat vorhanden war, ist anzunehmen, dass der Lactatabbau überwiegend von den sulfatreduzierenden Bakterien durchgeführt wurde und eine Verwertung von Lactat durch gärende Organismen nur eine untergeordnete Rolle spielte.

4.1.4. Populationsbiologische Abschätzungen

Der Einsatz von Kultivierungsmethoden war wegen des zeitlichen Aufwands zur Isolierung und Pflege der Stämme ein zentraler Teil der vorliegenden Arbeit. Der Erfolg dieser Isolierungen konnte durch den Einsatz von Verfahren zur Abschätzung der Artendiversität im untersuchten System bewertet werden.

Die Abschätzung der Diversität in einem System kann mit Hilfe verschiedener Parameter erfolgen, wie zum Beispiel der der Zahl unterschiedlicher Arten in einem untersuchten Habitat (α -Diversität) (Whittaker 1972), der Häufigkeit einzelner Arten im untersuchten System (Shannon-Wiener Index) (Shannon und Weaver 1976) oder der Änderung der Artenzahl entlang eines Gradienten (z.B. Reaktorlänge, β -Diversität) (Whittaker 1972). Für die Anwendung der verschiedenen statistischen Verfahren sind unterschiedliche Voraussetzungen zu erfüllen. So ist zum Beispiel für die Ermittlung der Häufigkeit einzelner Arten in einem System eine zufällige Probenahme erforderlich (Magurran 1988). Diese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt, da das vorrangige Ziel war, möglichst viele verschiedene Arten zu isolieren. Aus diesem Grund kann die Häufigkeit von Vertretern einzelner Arten im untersuchten System nicht aus den gewonnenen Daten abgeleitet werden, auch wenn die einzelnen Isolate unterschiedlich häufig isoliert wurden (Tabelle B im Anhang).

Die gewonnenen Daten wurden genutzt, um die Artenzahl (S) im untersuchten System zu schätzen (Tabelle 3.1). Diese Abschätzung wurde mit Hilfe verschiedener Verfahren durchgeführt. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich dabei in der Art der Parameter, die zur Abschätzung der Artenzahl herangezogen werden. Bei der Methode *Chao1* wird die Zahl der Arten, die nur ein einziges Mal in allen untersuchten Proben auftreten, zur Abschätzung der Artenzahl genutzt (Chao 1984). Durch die willkürliche Auswahl der Kolonien beim Isolieren der Organismen wurde eine möglichst große Diversität angestrebt. Die Kolonien wurden anhand ihrer

phänotypischen Merkmale ausgewählt und aus diesem Grund war die Zahl der Organismen, die nur ein einziges Mal auftraten, hoch und beeinflussten die geschätzte Artenzahl (S) stark. Mit dieser Methode wurde eine Artenzahl von fast 200 Arten geschätzt (Tabelle 3.1). Bei den Verfahren *Chao2*, *Jack-Knife1* und *Jack-Knife2* wurde die Zahl der Arten, die nur in einer Probe auftraten, zur Abschätzung der Artenzahl herangezogen. Diese Abschätzungen passen besser zu der Durchführung der Isolierungen. Durch die Wahl selektiver Substrate wurden unterschiedliche Organismen der Gesamtpopulation angereichert und isoliert. Besonders der Einsatz von Melasseschlempe bzw. von Trimethoxybenzoat führte zur Isolierung von Organismen, die nicht auf anderen Substraten isoliert werden konnten. Diese Organismen wurden dann aber oft mehr als einmal isoliert und würden in die Berechnung der Artenzahl (S) nach *Chao1* nicht eingehen. Bei der Berechnung der Artenzahl nach den Formeln *Chao2*, *Jack-Knife1* und *Jack-Knife2* fließen diese Organismen allerdings in die Berechnung ein. Die geschätzte Artenzahl liegt bei allen drei Methoden in einem Bereich von 79 – 88 Arten. Nach diesen Berechnungen wurden fast 75 % der Arten, die im untersuchten System mit diesen Substraten isoliert werden konnten, auch tatsächlich isoliert (Tabelle 3.1).

Die MPN-Experimente mit Melasseschlempe als Substrat haben gezeigt, dass etwa 10 % der mit DAPI nachweisbaren Gesamtzellzahl kultivierbar sind (Abbildung 3.10). Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei den „nicht kultivierbaren“ Zellen Organismen auftreten, die sich zu keiner der isolierten Arten zuordnen lassen. Darüber hinaus wurden methanogene Archaeen und obligat syntrophe Bakterien nicht bei den Kultivierungsansätzen berücksichtigt. Diese Organismen müssen zur geschätzten Artenzahl hinzugerechnet werden. Da in diesen Fällen keine Daten aus Kultivierungsexperimenten zur Verfügung standen, mussten zur Abschätzung dieser Zahlen die Ergebnisse der Hybridisierung herangezogen werden und ein Vergleich mit Literaturdaten erfolgen.

Bei der *in situ* Hybridisierung mit Sonden für methanogene Archaeen (Arch915) konnten verschiedene Morphotypen gefunden werden. Dabei handelte es sich um Kokken, kurze und lange Stäbchen sowie um große Zellaggregate. Der Einsatz von spezifischen Sonden für verschiedene Familien der methanogenen Archaeen ergab, dass *Methanospirillum* sp. *Methanobacterium* sp. und *Methanosarcina* sp. nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.8). Diese Organismen wurden auch in anderen anaeroben Reaktoren zur Behandlung von Abwässern gefunden (Leclerc et

al. 2001). In der Regel wurden aber nicht mehr als sechs verschiedene Arten gefunden, so dass diese zur geschätzten Artenzahl addiert werden sollten (Fernandez et al. 2000; Godon et al. 1997a).

Obligat syntrophe Organismen können in enger Gemeinschaft mit einem wasserstoffverwertenden Partner anaerob kurzkettenige Fettsäuren und andere Substrate abbauen. Mit Hilfe der Sonden MPOB (Harmsen et al. 1996a) und SYB701 (Sekiguchi et al. 1999) ließen sich keine Zellen nachweisen. Die Ursache hierfür kann in zu geringen Zellzahlen dieser Organismen im Reaktor liegen, möglich ist aber auch, dass die eingesetzten Sonden nicht mit den im Reaktor vorhandenen syntrophen Organismen hybridisierten.

Abschließend lässt sich die Artenzahl im untersuchten System nicht feststellen, aber in vergleichbaren Systemen wurden mit molekularbiologischen Methoden zwischen 82 und 146 sogenannte „operational taxonomic units“ gefunden (Godon et al. 1997b; Suau et al. 1999). Beide Autoren präsentieren eine rarefaction curve, machen aber keine weiteren Aussagen zur geschätzten Artendiversität in den untersuchten Systemen. Zusammen mit eigenen Abschätzungen zur Artendiversität im untersuchten System (Tabelle 3.1) lässt sich aber schließen, dass der Kultivierungsansatz mit insgesamt 58 unterschiedlichen Arten einen erheblichen Teil der Population erfasst hat.

Ein direkter Vergleich von kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden könnte genauere Aussagen über die Einsatzmöglichkeiten beider Methoden liefern. Verschiedene Autoren haben derartige Untersuchungen in unterschiedlichen Systemen durchgeführt (Chin et al. 1999; Felske et al. 1999; Hengstmann et al. 1999; McCaig et al. 2001). Untersuchungen in aeroben Systemen (Böden) ergaben nur wenig Übereinstimmung zwischen den kultivierbaren Organismen und den Klonen der Genbibliotheken (Felske et al. 1999; McCaig et al. 2001). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei der Untersuchung anaerober Systeme (Chin et al. 1999; Hengstmann et al. 1999). In den untersuchten anaeroben Systemen ließ sich zwar ein vergleichsweise großer Anteil der Gesamtpopulation isolieren (über 50 % der mit DAPI ermittelten Gesamtzellzahl), trotzdem gab es deutliche Unterschiede in den Ergebnissen der molekularbiologischen Methoden und der Kultivierungen (Hengstmann et al. 1999). Bei dieser Untersuchung zeigte sich beispielsweise, dass verschiedene Arten von *Actinobacteria*, die sich kultivieren ließen, nicht mit molekularbiologischen Methoden erfasst werden konnten. Ähnliches

wurde auch in anderen Systemen gefunden (Suau et al. 1999). Die molekularbiologische Untersuchung mikrobieller Systeme durch einen Klonierungsansatz erfordert einen Amplifikationsschritt, um eine ausreichend große Menge DNA für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Selbst in definierten Mischkulturen mit nur wenigen Arten war aber eine repräsentative Amplifikation der 16S rDNA durch PCR nicht möglich (Hansen et al. 1998). In komplexen Systemen mit vielen verschiedenen Arten ist eine repräsentative Amplifikation der DNA aller Arten daher unwahrscheinlich. Aus diesem Grund sollte eine umfassende Untersuchung mikrobiologischer Systeme sowohl mit Kultivierungsmethoden wie auch mit kultivierungsunabhängigen Methoden erfolgen, da mit den verschiedenen Methoden offensichtlich unterschiedliche Teile der Gesamtpopulation erfasst werden.

4.2 Ökologische Bewertung des Reaktors

Die Leistungsfähigkeit von Reaktoren zur anaeroben Abwasserreinigung beruht im wesentlichen auf der Zusammensetzung und Aktivität der mikrobiellen Biozönose. Durch die Untersuchung dieser Biozönose kann das Auftreten und die Aktivität verschiedener Organismen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht eine Abschätzung der Stoffflüsse im untersuchten System durch eine taxonomische und funktionale Einordnung der Isolate, die durch physiologische Untersuchungen an den Reinkulturen unterstützt werden kann.

4.2.1. Taxonomische und funktionale Einordnung der Isolate

Durch die phylogenetische Einordnung der Isolate konnten erste Informationen über eine mögliche Funktion der verschiedenen Arten im Reaktor gewonnen werden. Diese Informationen wurden mit den Ergebnissen physiologischer Experimente an den Reinkulturen ergänzt. Die Diskussion der Ergebnisse aus der Isolierung erfolgt nach taxonomischen und funktionalen Gesichtspunkten.

Clostridium

Die Gattung *Clostridium* ist nur durch einige wenig restriktive Charakteristika definiert und weist daher eine große phänotypische und genotypische Diversität auf (Hippe et al. 1991). Dadurch ist eine funktionale Einordnung aufgrund der taxonomischen Zugehörigkeit der Isolate schwierig und muss durch physiologische Untersuchungen ergänzt werden.

Elf Isolate konnten unterschiedlichen Arten der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden bzw. waren eng mit Clostridien verwandt. Einige Isolate beziehungsweise deren nächste Verwandte sind in der Lage, als hydrolytische Gärer komplexe Substrate zu verwerten. So wurde Isolat 18 (*C. celerecrescens*) mit Cellulose als Substrat angereichert und isoliert und ist damit als hydrolytischer Organismus einzuordnen. Der nächste Verwandte von Isolat 32, *C. aerotolerans*, ist ein xylanolytischer Organismus (van Gylswyk und van der Toorn 1987). Die Isolate 61 und TMB2 waren eng mit *C. butyricum* verwandt (Abbildung 3.15). Dieser Organismus kann Polymere wie Stärke und Pektin, aber auch Stoffwechselprodukte anderer Organismen wie zum Beispiel Lactat verwerten (Hippe et al. 1991; Kutzner 1963) und kann damit im Reaktor als hydrolytischer primärer Gärer oder als acetogener Organismus auftreten.

Neben den hydrolytischen Gärern traten im untersuchten System auch Clostridien auf, die den funktionalen Gruppen der acidogenen bzw. den acetogenen Organismen zugeordnet werden konnten. So war Isolat TMB1 eng mit *C. tyrobutyricum* verwandt (Abbildung 3.15). Dieser Organismus vergärt nur Monosaccharide, aber keine Disaccharide oder Polymere (Bryant und Burkey 1956). Isolat 23 war mit *C. propionicum* verwandt (Abbildung 3.18). Dieser Organismus wächst nicht auf Kohlenhydraten, sondern nutzt verschiedene Aminosäuren, Lactat und Acrylat. Die Substrate werden zu Fettsäuren wie Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Isovaleriat und Acetat vergoren (Jannsen 1991). Der nächste Verwandte von Isolat 42 war *C. clostridiiformis* (Abbildung 3.18). Dieser Organismus vergärt Kohlenhydrate zu Acetat, Lactat und Formiat und kann daher als acidogener Organismus angesehen werden (Kaneuchi et al. 1976). Der nächste Verwandte von Isolat 34, *C. methylpentosum* (Abbildung 3.16), ist ein Spezialist, der nur auf Pentosen wächst (Himelbloom und Canale-Parola 1989). Isolat 39 war eng mit *C. viride* verwandt (Abbildung 3.16), einem Organismus, der verschiedene Fettsäuren (Valeriat, Crotonat) verwertet. Damit übernimmt dieses Isolat vermutlich die Rolle eines acetogenen Organismus. Isolat 16 war mit *C. spiroforme* verwandt (Abbildung 3.20). Da dieser Organismus Toxine produzieren kann (Borriello et al. 1986; Borriello und Carman 1983), wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. *C. spiroforme* kann Kohlenhydrate zu Acetat vergären, Butyrat tritt nicht als Stoffwechselprodukt auf (Kaneuchi et al. 1979). Damit kann Isolat 16 als acetogener Organismus eingeordnet werden.

Der nächste Verwandte von Isolat 14 war ein nicht weiter charakterisierter Organismus, dessen 16S rDNA-Sequenz in einem Anaerobreaktor zur Behandlung von chlorbenzolhaltigem Wasser gefunden werden konnte (Abbildung 3.15). Isolat 14 produzierte mit Melasseschlempe als Substrat Butyrat und nachweisbare Mengen von Propionat und Acetat (Tabelle A im Anhang). Isolat 19 wurde nur einmal auf Melasseschlempe isoliert und war mit *C. piliforme* verwandt. Dieser Organismus ist ein pathogener obligat intrazellulär lebender Parasit (Spencer et al. 1990). Da *C. piliforme* bisher nur aus Zellkulturen isoliert werden konnte, war es unwahrscheinlich, dass es sich bei diesem Isolat um das pathogene *C. piliforme* handelte. Trotzdem wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet und eine Einordnung in eine funktionale Gruppe konnte nicht erfolgen.

Ruminococcus

Vertreter der Gattung *Ruminococcus* sind anaerobe chemoorganotrophe Kokken, die Kohlenhydrate zu Acetat, Formiat, Succinat Lactat, Ethanol, H₂ und CO₂ vergären. Verschiedene Vertreter zeigen hydrolytische Aktivität (Schleifer 1986). Acht Isolate konnten dieser Gattung zugeordnet werden, die sich phylogenetisch aus drei verschiedenen Gruppen zusammensetzt (Rainey und Janssen 1995). Die Isolate 27, 41 und 49 konnten in das Cluster XIV der Clostridien eingeordnet werden (Collins et al. 1994). Isolat 27 war mit *R. hydrogenotrophicus* verwandt. Dieser Organismus ist homoacetogen und kann autotroph auf H₂/CO₂ wachsen (Bernalier et al. 1996). In dieser Rolle kann Isolat 27 als wasserstoffverwertender Partner in einer Symbiose mit obligat syntrophen Organismen den Abbau von kurzkettigen Fettsäuren und Aromaten ermöglichen. Isolat 41 war mit *R. gnavus* verwandt und wurde auf Glucose und auf Melasseschlempe isoliert (Tabelle B im Anhang). Dieser Organismus kann verschiedene Zucker zu Ethanol vergären. Einige Stämme sind in der Lage, Stärke zu hydrolysieren (Schleifer 1986). Damit kann dieses Isolat die Rolle eines hydrolytischen und gärenden Organismus übernehmen.

Isolat 49 war mit einer *Ruminococcus*-Art verwandt, die aus dem Pansen von Rindern isoliert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass es sich möglicherweise um einen hydrolytischen primären Gärer handelte (Abbildung 3.18).

Die Isolate 29 und 47 ordneten sich phylogenetisch in das Cluster IV der Clostridien ein (Collins et al. 1994). Diese Organismen waren mit verschiedenen Stämmen von *R. bromii* verwandt (Abbildung 3.16). *R. bromii* kann Stärke hydrolysieren und verschiedene Zucker vergären. Das Hauptprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels ist

Ethanol (Schleifer 1986). Damit kann den Isolaten 29 und 47 die Rolle von hydrolytischen primären Gärern zugeordnet werden.

Die Isolate 22, 31 und 43 ordneten sich in der Verwandtschaft von *R. flavefaciens* ein (Abbildung 3.16). Isolat 22 war mit *R. callidus* verwandt. Dieser Organismus vergärt verschiedene Zucker und produziert Succinat als Stoffwechselprodukt (Schleifer 1986). Die Isolate 31 und 43 waren eng miteinander und mit *R. albus* verwandt. *R. albus* kann Cellulose hydrolysieren und verschiedene Zucker vergären. Die Stoffwechselprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels sind Ethanol und Formiat (Schleifer 1986). Damit kann den Isolaten 31 und 43 die Rolle von hydrolytischen Gärern zugewiesen werden.

Eubacterium

Sieben Isolate wurden der Gattung *Eubacterium* zugeordnet. Die Gattung *Eubacterium* umfasst obligat anaerobe Gram positive Bakterien, die keine Endosporen bilden. Die meisten saccharolytischen Eubakterien produzieren Butyrat als Stoffwechselprodukt und können damit im Reaktor die Rolle von primären und sekundären Gärern übernehmen (Andreesen 1991). Darüber hinaus besitzen aber viele Vertreter der Gattung *Eubacterium* zusätzliche Stoffwechselwege für den Abbau komplexer Substrate und einige Arten sind in der Lage, autotroph zu wachsen. Damit können diese Organismen auch spezielle Aufgaben im anaeroben Abbau übernehmen und zum Beispiel als wasserstoffverbrauchender Partner die Acetogenese aus Fettsäuren ermöglichen (Genthner et al. 1981; Haddock und Ferry 1993).

Der nächste Verwandte von Isolat 9 war *Eubacterium rectale* (Abbildung 3.18). Isolat 9 konnte Glucose zu Butyrat, Lactat und Acetat vergären. Isolat 28 war mit *E. siraeum* verwandt (Abbildung 3.16). Dieser Organismus wurde auf Melasseschlempe isoliert und wuchs nur sehr langsam. Der nächste Verwandte von Isolat 36 war *E. plautii*. Dieses Isolat konnte Glucose zu Lactat, Butyrat und Acetat umsetzen. Isolat 53 war mit *E. cylindroides* verwandt (Abbildung 3.20) und setzte Glucose zu Butyrat und Lactat um (Tabelle A im Anhang). Isolat 60 wuchs nur mit Melasseschlempe als Substrat, physiologische Untersuchungen wurden an diesem Isolat nicht durchgeführt. Der nächste Verwandte von Isolat 60 war *E. brachy* (Abbildung 3.19).

Der nächste Verwandte von Isolat 37 war *E. desmolans* (Abbildung 3.16). Dieser Organismus wurde aus dem Faeces von Katzen isoliert und produziert ein Enzym

(Desmolase), das Steroide abbauen kann (Morris 1986). Damit kann dieses Isolat möglicherweise auch komplexe Strukturen in der Melasseschlempe angreifen und kondensierte aromatische Strukturen abbauen. Der Abbau methoxylierter aromatischer Verbindungen im Reaktor konnte durch die Analysen am Institut für Wasserreinhaltung nachgewiesen werden (Abbildung 2.2).

Isolat TMB19 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit auf Trimethoxybenzoat angereichert und isoliert (Kaesler 1999). Die nächsten Verwandten waren *E. callandrei* und *E. limosum* (Abbildung 3.19). Beide Organismen sind in der Lage, autotroph zu wachsen oder die Methoxygruppen substituierter Aromaten zu verwerten (Genthner et al. 1981; Mountfort et al. 1988). Damit können diese Organismen ebenfalls eine Rolle beim Abbau von hochmolekularen substituierten Verbindungen in der Melasseschlempe übernehmen.

Bacteroides

Die Gattung *Bacteroides* umfasst nicht bewegliche, Gram negative Stäbchen. Als Substrate werden Kohlenhydrate, Peptone und Stoffwechselprodukte anderer Organismen verwertet. Die Produkte des Stoffwechsels sind Succinat, Acetat, Formiat, Lactat und Propionat. Butyrat ist in der Regel kein Hauptprodukt bei der Vergärung von Kohlenhydraten und tritt gewöhnlich zusammen mit Isobutyrat und Isovaleriat auf (Shah 1991). Damit können die Vertreter dieser Gattung als primäre und sekundäre Gärer eingeordnet werden, die im Reaktor Zucker, Aminosäuren und organische Säuren vergären. Sechs Isolate konnten dieser Gattung zugeordnet werden (Abbildung 3.21). Die Isolate 2 und 5 waren mit *Bacteroides uniformis* verwandt. Dieser Organismus wird von der DSMZ in die Risikoklasse 2 eingeordnet. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen an diesen Isolaten durchgeführt. Isolat 26 zeigte einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *B. acidifaciens*, einem Organismus, der Glucose vornehmlich zu Succinat und Acetat vergärt (Miyamoto und Itoh 2000). Isolat 30 war mit *B. vulgatus* verwandt. Der nächste Verwandte von Isolat 33 war *B. splanchnicus* mit einer Sequenzhomologie von über 99 %, während Isolat 40 in die Nähe nicht weiter definierter *Bacteroides* Arten eingeordnet wurde.

Lactobacillus

Die Gattung *Lactobacillus* besteht aus Gram positiven, Katalase negativen Stäbchen, die keine Endosporen bilden. Sie sind in der Regel nicht beweglich und vergären

Glucose entweder homofermentativ oder heterofermentativ zu Lactat und anderen organischen Säuren. Ein Kennzeichen für die Lactobacillen ist der Bedarf an Supplinen. Die meisten Vertreter benötigen verschiedene Vitamine, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine (Hammes et al. 1991).

Vier Isolate konnten der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden. Alle Stämme wurden mit Melasseschlempe als Substrat isoliert (Abbildung 3.22). Isolat 7 war eng mit den homofermentativen Arten *L. pentosus* und *L. plantarum* verwandt (Zanoni et al. 1987). Der nächste Verwandte von Isolat 8 war *L. agilis*, ein homofermentativer Organismus, der verschiedene Zucker zu Lactat vergären kann (Kandler und Weiss 1986). Isolat 25 war mit *L. aviarius* verwandt (Fujisawa et al. 1984). Isolat 44 war eng mit *L. lindneri* verwandt. Allen Isolaten, die der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden konnten, kann die Rolle von primären Gärern zugewiesen werden.

Propionibacterium

Vier Isolate ordneten sich phylogenetisch in die Gattung *Propionibacterium* ein (Abbildung 3.23). Propionibakterien sind chemoorganotroph und bilden bei der Vergärung von Kohlenhydraten große Mengen von Propionat und Acetat. Propionibakterien leben anaerob, sie sind Katalase positiv und manche Arten sind aerotolerant. Isolat 3 war mit *P. microaerophilum* verwandt, einem Organismus, der aus einer Anlage zur Behandlung von Abwässern einer Olivenölmühle isoliert wurde (Koussemon et al. 2001).

Die nächsten Verwandten von Isolat 13 (*P. granulorum*), 48 (*P. lymphophilum*) und TMB22 (*P. acnes*) wurden von der DSMZ in die Risikoklasse 2 eingeordnet. Aus diesem Grund erfolgten keine physiologischen Untersuchungen an diesen Isolaten, aber aufgrund der physiologischen Eigenschaften der gesamten Gattung konnte diesen Organismen die Rolle von primären Gärern zugeordnet werden.

Acetobacterium

Die Gattung *Acetobacterium* besteht aus homoacetogenen stäbchenförmigen Bakterien, die in der Lage sind, Kohlendioxid als Elektronenakzeptor zu nutzen (Balch et al. 1977; Schink und Bomar 1991). Zwei Isolate konnten in diese Gattung eingeordnet werden. Isolat 11 war mit *Acetobacterium woodii* verwandt und wurde mit Glucose als Substrat isoliert. Isolat 21 war mit *A. paludosum* verwandt. Dieser Organismus wurde ursprünglich aus kalten Habitaten isoliert (Kotsyurbenko et al. 1995). Die Isolate 11 und 21 sind homoacetogene Bakterien, wurden aber nicht auf

Trimethoxybenzoat isoliert, obwohl beide Stämme auf TMB wuchsen (Abbildung 3.19). Im Reaktor können diese Isolate verschiedene Rollen spielen. Als acetogene Organismen können sie polymere Verbindungen, Oligomere und Monomere verwerten oder mit Wasserstoff als Elektronenquelle autotroph CO₂ reduzieren. In dieser Funktion können die Isolate in syntrophen Gemeinschaften als wasserstoffzehrende Partner dienen und den Abbau von Fettsäuren und aromatischen Verbindungen ermöglichen.

Paenibacillus

Zwei Isolate konnten der Gattung *Paenibacillus* zugeordnet werden (Abbildung 3.25). Die Isolate 35 und 52 waren mit aquatischen Organismen verwandt. Die nächsten Verwandten lagen nur als Sequenzeintrag in den Datenbanken vor. Da zumindest ein Vertreter der Gattung *Paenibacillus* von Pflanzenmaterial isoliert wurde, steht zu vermuten, dass diese Organismen eine Rolle beim primären Abbau von polymeren Verbindungen spielen (Berge et al. 2000). Isolat 35 produzierte mit Melasseschlempe als Substrat Lactat, sowie nachweisbare Mengen von Formiat, Acetat und Propionat (Tabelle A im Anhang). Damit kann zumindest diesem Organismus die Rolle eines primären Gärers zugeordnet werden.

Desulfovibrio

Sulfatreduzierende Bakterien konnten im gesamten Reaktor nachgewiesen werden, aber trotz verschiedener Kultivierungsansätze ließen sich nur zwei verschiedene Arten isolieren. Die nächsten Verwandten waren *Desulfovibrio desulfuricans* und *D. termitidis* (Abbildung 3.24). Diese Organismen können als acetogene Organismen eingeordnet werden, da sie organische Säuren und Alkohole zu Acetat oxidieren und die freiwerdenden Elektronen auf Sulfat übertragen können. Dieser Stoffwechselweg bietet eine höhere Energieausbeute als die Vergärung dieser Substrate. Dadurch kann auch die hohe Zahl von sulfatreduzierenden Organismen im Reaktor erklärt werden, obwohl die Diversität dieser Organismengruppe eher gering ist.

Sphingomonas

Isolat TMB5 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit mit Trimethoxybenzoat als Substrat isoliert (Kaesler 1999) und ordnet sich phylogenetisch in eine Gruppe von *Sphingomonas*-Arten ein, die aus tiefen Sedimenten isoliert wurden (Abbildung 3.24). Die nächsten Verwandten waren *S. aromaticivorans*, *S. subterranea* und *S. stygia*.

Diese Organismen können aerob ein breites Spektrum substituierter Aromaten abbauen (Balkwill et al. 1997). Anaerob konnte TMB5 die Methoxygruppen von Trimethoxybenzoat verwerten, ohne dabei den aromatischen Ring zu spalten (Kaesler 1999). Damit kann Isolat TMB5 eine Rolle beim Abbau substituierter Aromaten im System spielen.

Sporobacterium

Der nächste Verwandte von TMB39 war *Sporobacterium olearium* und wurde aus einem anaeroben Reaktor zur Behandlung von Abwässern aus der Olivenölproduktion isoliert (Mechichi et al. 1999). Das Isolat TMB39 wurde auf TMB isoliert und konnte Trimethoxybenzoat stöchiometrisch zu Acetat und Butyrat umsetzen. Dabei wurde der aromatische Ring gespalten (Kaesler 1999). TMB39 kam also eine wesentliche Rolle beim Abbau aromatischer Verbindungen in der Melasseschlempe zu.

Staphylococcus

Ein Isolat wurde in die Gattung *Staphylococcus* eingeordnet (Abbildung 3.27). Der nächste Verwandte war *S. epidermidis*, ein Organismus, der von menschlicher Haut isoliert wurde. Dieser Organismus wird von der DSMZ in die Risikogruppe 2 eingeordnet und es erfolgten keine weiteren Untersuchungen an diesem Isolat. Das Auftreten dieses Organismus wie auch das Auftreten der *Propionibacterium* spp. könnte auf Kontaminationen während des Reaktorbetriebs, der Anreicherung oder Isolierung zurückzuführen sein. Es ist aber auch möglich, dass die Kontaminationen bereits beim Transport, der Lagerung oder beim Verdünnen der Melasseschlempe vor dem Einsatz im Reaktor erfolgte und diese Organismen sich im untersuchten Reaktor etablieren konnten. Alle Isolate wuchsen sehr gut auf Melasseschlempe, daher ist es auch möglich, dass diese Organismen zur mikrobiellen Flora des Anaerobreaktors gehören. Ob diese Bakterien zur autochtonen Flora gehören oder sich nach einer Kontamination im Reaktor etabliert haben bleibt ungeklärt. Das Auftreten dieser Organismen zeigt aber, dass anaerobe Systeme ein hygienisches Potential besitzen, das Maßnahmen zum Schutz des Personals beim Betrieb auch anaerober Anlagen erforderlich macht.

Bifidobacterium

Ein Isolat konnte in die Gattung *Bifidobacterium* eingeordnet werden (Abbildung 3.28). Glucose wurde von diesem Isolat zu Lactat und Acetat vergoren. Der Abbau von Hexosen erfolgt bei der Gattung *Bifidobacterium* über einen speziellen Abbauweg (Biavati et al. 1991). Damit kann Isolat 10 die Rolle eines primären Gärers beim Abbau der Melasseschlempe übernehmen.

Aminobacterium

Ein Isolat konnte der Gattung *Aminobacterium* zugeordnet werden (Abbildung 3.26). Der nächste Verwandte war *Aminobacterium colombiense*, der aus einer Anlage zur anaeroben Behandlung von Molkereiabwässern isoliert wurde. *A. colombiense* vergärt Aminosäuren und produziert Acetat. Damit kann dieses Isolat die Rolle eines acetogenen Organismus spielen (Baena et al. 2000).

Acidaminococcus

Isolat 17 wurde der Gattung *Acidaminococcus* zugeordnet (Abbildung 3.17). Dieses Isolat wurde nur ein einziges Mal auf *Melasseschlempe* isoliert und wuchs nur schwach. Vertreter der Gattung *Acidaminococcus* vergären Aminosäuren, trans-Aconitat und Citrat zu Acetat, CO₂ und H₂ (Cook et al. 1994; Rogosa 1969). Damit konnte Isolat 17 beim Abbau der Melasseschlempe die Rolle eines acetogenen Organismus zugeordnet werden.

4.2.2. Abschätzung der Stoffflüsse im Reaktor

Ein Ökosystem ist nicht nur durch die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose charakterisiert, sondern auch durch die Stoffwechselprozesse, die von diesen Organismen durchgeführt werden können. Verschiedene Methoden wurden eingesetzt, um den Organismen im Reaktor eine Funktion zuzuweisen und die Stoffflüsse zu charakterisieren. Die Ergebnisse der Kultivierungsansätze ergaben erste Hinweise auf die Funktion der Organismen im Reaktor. Die räumliche Verteilung der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen im Reaktor konnte mit Hilfe der in situ Hybridisierung ermittelt werden und zeigte bei verschiedenen Gruppen ein deutliches Profil, das eine funktionale Einordnung gemäß der Theorie des anaeroben Abbaus ermöglichte. Die taxonomische Einordnung der Isolate mit Hilfe der 16S rDNA-Analyse und der Vergleich mit der aus der Literatur bekannten Physiologie ihrer nächsten Verwandten gab weitere Hinweise auf mögliche

physiologische Kapazitäten, die durch die physiologischen Untersuchungen an ausgewählten Organismen überprüft werden konnten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst und werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

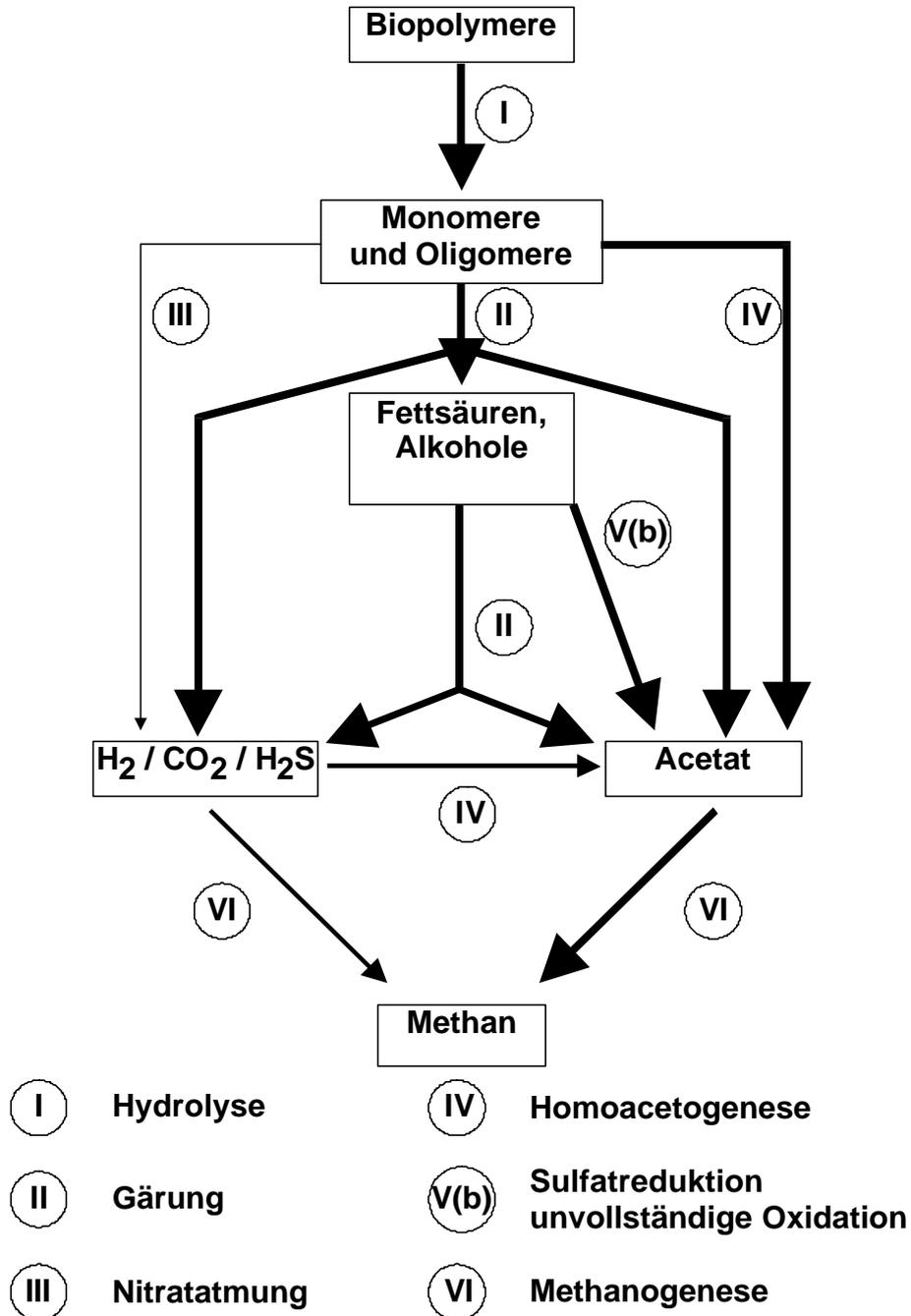


Abbildung 4.1: Potentielle Stoffflüsse im untersuchten Anaerobreaktor

Hydrolyse

Die ersten Schritte beim Abbau der Melasseschlempe wurden von Vertretern der Ordnung *Clostridiales* durchgeführt. Die Isolate 18 und 31 wurden mit Cellulose als Substrat angereichert und isoliert (Tabelle B im Anhang). Diese Organismen waren

also in der Lage, das Polymer Cellulose abzubauen. Die phylogenetische Einordnung dieser Isolate ergab, dass sie eng mit *Clostridium celerecrescens* (Isolat 18) und mit *Ruminococcus albus* (Isolat 31) verwandt waren. Beide Organismen sind in der Lage, Cellulose zu verwerten (Palop et al. 1989; Schleifer 1986). Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft der Isolate 41 und 43 zu *Ruminococcus gnavus* bzw. *R. albus* liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Organismen ebenfalls um hydrolytisch aktive Gärer handelte. Da diese Organismen aber nicht auf polymeren Substraten isoliert wurden, steht der Beweis der hydrolytischen Aktivität aus. Ein solcher Nachweis kann durch eine räumliche Trennung von Organismus und Substrat erfolgen. Die Trennung kann durch eine Dialysemembran oder einen Filter mit einer ausreichend kleinen Porenweite erfolgen, so dass weder die Bakterien, noch das polymere Substrat durch den Filter wandern können. In einer solchen Versuchsanordnung wird ein Organismus wachsen können, wenn er in der Lage ist, Exoenzyme zur Hydrolyse von polymeren Substanzen auszuschcheiden.

Acidogenese

Der Abbau der Biopolymere erfolgt in der Regel durch die Ausscheidung von Exoenzymen. Damit stehen die gelösten Oligomere und Monomere aber nicht ausschließlich den hydrolytischen primären Gärern zur Verfügung, sondern können auch durch andere Organismen entweder vergoren werden oder durch anaerobe Atmungen abgebaut werden. Am Abbau der Monomere waren unterschiedliche physiologische Gruppen beteiligt. Da die Rübenmelasseschlempe ein pflanzliches Produkt ist, kann davon ausgegangen werden, dass Cellulose einen beträchtlichen Anteil der Trockensubstanz ausmacht. Cellulose lässt sich durch die Aktivität von Exoenzymen in Glucosemonomere spalten. Aus diesem Grund wurde Glucose als Anreicherungs- und Isolierungsmedium eingesetzt. Auf Glucose konnten 32 Isolate gewonnen werden, die sich über die 16s rDNA-Analyse den Gattungen *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* und *Acetobacterium* zuordnen ließen.

Die Isolate aus den Gattungen *Clostridium*, *Paenibacillus* und *Ruminococcus* hybridisierten mit den Sonden, die spezifisch für Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt waren. Diese Gruppe war über die gesamte Reaktorlänge bestandsbildend, dominierte aber in der versäuernden Stufe des Reaktors (Abbildung 3.5). Das Cluster *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* stellte im versäuernden Teil des Reaktors

die zweitgrößte Gruppe dar. In der methanogenen Stufe des Reaktors fiel der Anteil dieses Phylums aber deutlich unter 5 % der Gesamtzellzahl (Abbildung 3.6). Die Dominanz dieser Gruppen in der acidogenen Phase des Reaktors weist darauf hin, dass die Vertreter dieser Gruppen für den primären Abbau monomerer Verbindungen verantwortlich sind.

Die physiologischen Untersuchungen an Isolaten aus den Gattungen *Bacteroides*, beziehungsweise *Clostridium* ermöglichte die Einordnung dieser Isolate als primäre Gärer, die Glucose zu Alkoholen und organischen Säuren vergoren. Darüber hinaus konnten weitere Isolate aus den Gattungen *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Eubacterium* als gärende Organismen eingeordnet werden (Tabelle A im Anhang).

Einige Vertreter der Gattung *Paenibacillus* sind in der Lage, eine Nitratatmung durchzuführen. Vertreter der Gattungen *Eubacterium* und *Acetobacterium* sind homoacetogen und nutzen CO₂ als terminalen Elektronenakzeptor. Der Abbau der Monomere erfolgt im Reaktor also sowohl über Gärungsstoffwechsel als auch über anaerobe Atmungen. Während Kohlendioxid durch die Stoffwechselprozesse ständig nachgeliefert wurde und damit für die Homoacetogenese im Reaktor vermutlich in unbegrenzter Menge zur Verfügung stand, war die Verfügbarkeit von Nitrat limitiert. Nitrat kann von vielen Organismen als Stickstoffquelle genutzt werden. Darüber hinaus konkurrieren auch gärende Organismen um den Elektronenakzeptor Nitrat (Arendsen et al. 1999; Seifritz et al. 1993). Es ist also anzunehmen, dass Nitrat im Reaktor schnell zu Ammonium reduziert wurde und die Nitratatmung beim Abbau der monomeren Kohlenhydrate eine untergeordnete Rolle spielte.

Der homoacetogene Stoffwechselweg unterlag im Reaktor nicht den Limitierungen der Nitratatmung. Der Elektronenakzeptor (CO₂) wurde durch Gärungen und anaerobe Atmungen ständig nachgeliefert. Da homoacetogene Bakterien Glucose vollständig zu Acetat umsetzen können und die Elektronenbilanz durch die Fixierung von CO₂ ausgeglichen ist, wird bei diesem Stoffwechsel mehr Energie freigesetzt als bei Gärungen (Drake 1994). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der monomeren Kohlenhydrate über den homoacetogenen Stoffwechsel umgesetzt wurde. Physiologische Experimente an den Isolaten ergaben, dass die Isolate 11 (*Acetobacterium woodii*) und 27 (*Ruminococcus hydrogenotrophicus*) Glucose vollständig zu Acetat oxidierten (Tabelle A im Anhang), was zeigt, dass dieser Stoffwechselweg im Reaktor ein alternativer Abbauweg zu den Gärungen war.

Der weitaus größte Teil der Isolate, die auf Glucose isoliert werden konnten, gehörte zur physiologischen Gruppe der gärenden Organismen (Tabelle A im Anhang). Bei der Bestimmung der Gesamtzahl kultivierbarer Zellen durch eine MPN-Schätzung wurde Melasseschlempe als Substrat eingesetzt. Die Isolierung der Isolate 11 (*A. wodii*) und 21 (*A. paludosum*) zeigte, dass auch mit diesem Ansatz homoacetogene Bakterien isoliert werden konnten, aber der Vergleich der Zellzahlen der kultivierbaren Zellen (Abbildung 3.10) mit den Zellzahlen kultivierbarer homoacetogener Bakterien (Abbildung 3.12) zeigt, dass die homoacetogenen Bakterien nur einen kleinen Teil der Gesamtpopulation im Reaktor ausmachten. Es ist daher anzunehmen, dass der Abbau der monomeren Kohlenhydrate überwiegend über Gärungsstoffwechsel erfolgte.

Acetogenese

Ein Charakteristikum von Gärungen ist die Regeneration von Reduktionsäquivalenten durch Übertragung auf einen internen Elektronenakzeptor. Das reduzierte Gärungsendprodukt wird aus der Zelle ausgeschieden und dient anderen Bakterien der anaeroben Lebensgemeinschaft als Substrat. Der Abbau der Produkte der acidogenen Phase kann durch Gärungen, anaerobe Atmungen und durch syntrophe Lebensgemeinschaften aus wasserstoffproduzierenden gärenden Bakterien und wasserstoffverbrauchenden, anaerob atmenden Organismen durchgeführt werden.

Bei den physiologischen Experimenten mit den primären Gärern war Lactat ein häufiges Stoffwechselprodukt (Tabelle A im Anhang). Lactat kann zum Beispiel als Substrat für die Propionsäuregärung dienen und zu Propionat reduziert werden. Isolat 23 konnte mit Hilfe der 16S rDNA-Analyse als naher Verwandter von *Clostridium propionicum* eingeordnet werden. *C. propionicum* ist in der Lage, Lactat über den Acryloyl-Weg zu reduzieren (Jannsen 1991) und die physiologische Untersuchung von Isolat 23 mit Melasseschlempe als Substrat bestätigte die Produktion von Propionat (Tabelle A im Anhang). Eine weitere Nutzung von Lactat als Substrat von Gärungsstoffwechseln liegt in der Möglichkeit, Reduktionsäquivalente nicht durch die Reduktion von internen Elektronenakzeptoren zu regenerieren, sondern externe Elektronenakzeptoren zu nutzen. Bei verschiedenen gärenden Organismen ist diese Form der Elektronenübertragung nachgewiesen, wobei Huminsäuren als Elektronenakzeptoren fungierten (Benz et al. 1998; Coates et al. 1998). In diesen Fällen besteht für die Organismen die Möglichkeit, Pyruvat

über die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase in Acetyl-CoA umzuwandeln und Acetyl-CoA direkt zur ATP-Synthese zu nutzen. Das reduzierte Ferredoxin kann die Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor übertragen und dabei regeneriert werden. Die massenspektrometrische Analyse der Melasseschlempe, die am Institut für Wasserreinigung der TU Berlin durchgeführt wurde (Abbildung 2.2), zeigte das Auftreten verschiedener Verbindungen, die als Elektronenakzeptoren dienen können. Obwohl keine Experimente zum Einfluss hochmolekularer Substanzen auf den Gärungsstoffwechsel der Isolate durchgeführt wurden, zeigen Literaturdaten, dass von einem solchen Einfluss ausgegangen werden kann (Benz et al. 1998; Shimp und Pfaender 1985).

Neben Lactat konnten verschiedene andere Verbindungen als Produkte der primären Gärungen nachgewiesen werden (Tabelle A im Anhang). Der Umsatz dieser Verbindungen in Gärungsstoffwechseln ist endergon und läuft nur dann ab, wenn eine dieser Reaktionen mit exergonen Reaktionen wie anaeroben Atmungen gekoppelt werden können. Diese Kopplung muss nicht zwangsläufig direkt sein und ausschließlich durch anaerob atmende Organismen durchgeführt werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass gärende und atmende Organismen diese Reaktion in Kooperation durchführen (Schink 1991).

Der Abbau von Alkoholen, Fettsäuren und aromatischen Verbindungen durch anaerobe Atmungen ist bei verschiedenen Organismen beschrieben. Die Oxidation dieser Substrate erfolgt sowohl durch Nitrat-Atmer, sulfatreduzierende Bakterien wie auch durch homoacetogene Organismen (Dong et al. 1994; Heising et al. 1991; Londry et al. 1997; Widdel 1980). Die Limitierungen bei einem Stoffumsatz mit Hilfe der Nitratatmung wurden bereits diskutiert und auch der Stoffumsatz durch eine Sulfatatmung scheint im untersuchten System nur eine eingeschränkte Rolle zu spielen. Alle im Untersuchungszeitraum isolierten sulfatreduzierenden Bakterien konnten mit Hilfe der 16S rDNA-Analyse zwei Arten der Gattung *Desulfovibrio* zugeordnet werden (Abbildung 3.24). Die Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* setzen in der Regel Lactat, Ethanol und Formiat zu Acetat um. Darüber hinaus können die meisten Arten dieser Gattung Wasserstoff verwerten (Widdel 1988). Vollständig oxidierende Sulfatreduzierer konnten zu keinem Zeitpunkt isoliert oder über die in situ Hybridisierung nachgewiesen werden. Damit kommen sulfatreduzierende Bakterien im untersuchten System nicht als Destruenten von Fettsäuren und aromatischen Verbindungen in Frage, können aber Lactat und Ethanol acetogen

umsetzen. Die räumliche Verteilung dieser Organismen wurde über die *in situ* Hybridisierung und über MPN-Schätzungen bestimmt. Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zeigten eine Konzentration der sulfatreduzierenden Bakterien im mittleren Reaktorabschnitt (Abbildung 3.7), aber die Ergebnisse der MPN-Schätzungen ergaben eine relativ gleichmäßige Verteilung dieser Organismen im Reaktor (Abbildung 3.11). Bei beiden Untersuchungen konnte aber eine Abnahme der Zellzahlen im hinteren Abschnitt des methanogenen Reaktors festgestellt werden. Diese Abnahme deckt sich mit der Theorie, dass die sulfatreduzierenden Bakterien für den Abbau relativ wenig oxidierte Verbindungen (Lactat, Ethanol) verantwortlich waren. Ein weiterer deutlicher Hinweis für die Rolle sulfatreduzierender Bakterien im Reaktor waren die Experimente zur Reinstallation methanogener Bakterien in einem Reaktor (Abbildung 3.35). In diesem Reaktor war die methanogene Population irreversibel geschädigt und es kam zur Akkumulation von Fettsäuren. Wenn sulfatreduzierende Bakterien für den Abbau dieser Verbindungen verantwortlich gewesen wären, hätte vermutlich ein Abbau zu CO₂ stattgefunden und eine Akkumulation der Fettsäuren verhindert.

Die räumliche Verteilung homoacetogener Bakterien im Reaktor ließ sich aufgrund der phylogenetischen Diversität dieser physiologischen Gruppe nicht mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung ermitteln. Die Ergebnisse der MPN-Schätzungen zeigen aber eine relativ gleichmäßige Verteilung dieser Organismen im Reaktor. Die Zahl der homoacetogenen Bakterien nahm, im Gegensatz zu der Zahl sulfatreduzierender Bakterien, nicht im hinteren Bereich der methanogenen Stufe des Reaktors ab (Abbildung 3.12). Die gleichmäßige Verteilung über die Reaktorlänge deutet darauf hin, dass homoacetogene Bakterien an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt waren. Die Rolle dieser Organismen für den Abbau monomerer Kohlenhydrate wurde bereits diskutiert. Darüber hinaus ergaben physiologische Untersuchungen an den Isolaten, dass zumindest ein Isolat substituierte Aromaten unter Spaltung des aromatischen Ringsystems abbauen konnte (Kaesler 1999). Die anderen Isolate, die über die Ergebnisse der Kultivierung und die Analyse der 16S rDNA den homoacetogenen Bakterien zugeordnet werden konnten, waren nicht in der Lage, den aromatischen Ring zu spalten. Die Isolierung dieser Organismen mit Trimethoxybenzoat zeigt aber, dass die wichtigste Rolle der homoacetogenen Bakterien in ihrer Fähigkeit zum Abbau komplexer substituierter Aromaten zu sehen ist. Der Abbau komplexer lignin-ähnlicher Strukturen ist in anaeroben Habitaten

schwierig (Schink 1988) und auf wenige Organismengruppen beschränkt. Durch die physiologische Aktivität homoacetogener Bakterien kann aber ein eingeschränkter Abbau stattfinden und gleichzeitig können Substrate für den methanogenen Stoffwechsel bereitgestellt werden.

Der anaerobe Abbau organischer Säuren, Alkohole und aromatischer Verbindungen kann auch durch die physiologische Aktivität gärender Bakterien stattfinden. Da die Reaktionen aber unter Standardbedingungen endergon sind, müssen diese Reaktionen mit exergonen Reaktionen gekoppelt sein, damit der Gesamtabbau möglich wird. Da gärende Organismen nicht die Möglichkeiten haben, eine anaerobe Atmung durchzuführen und die exergone Reaktion der Nitrat-, Sulfat-, oder Carbonat-Reduktion mit der Vergärung des Substrats zu koppeln, muss diese Funktion von anderen Organismen übernommen werden. Der syntrophe Abbau verschiedener Verbindungen konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Boone und Bryant 1980; Cord-Ruwisch et al. 1998; Jackson et al. 1999; Krumholz und Bryant 1986). Die gärenden Organismen in den syntrophen Gemeinschaften übertragen die Elektronen aus der Oxidation der Substrate auf Protonen und produzieren dabei molekularen Wasserstoff. Die Konzentration von Wasserstoff wird durch einen wasserstoffverbrauchenden Partner in der syntrophen Gemeinschaft niedrig gehalten. Dadurch ändern sich die thermodynamischen Bedingungen und die freie Energie der Teilreaktion wird negativ. Unter diesen Bedingungen kann die Reaktion spontan ablaufen.

Obligat syntrophe Bakterien wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht isoliert. Die Isolierung dieser Organismen erfordert besondere Maßnahmen. So muss zum Beispiel gewährleistet sein, dass der Wasserstoffpartialdruck bei der Kultivierung immer niedrig gehalten wird. Dies kann durch den Einsatz einer Hintergrundkultur von wasserstoffzehrenden Bakterien erreicht werden. Viele syntrophe Gärer sind häufig sehr spezialisiert und vergären nur wenige Verbindungen (Schink 1980). Aus diesem Grund wäre bei einem Kultivierungsansatz möglicherweise der Nachweis eines syntrophen Abbaus bestimmter Verbindungen gelungen, aber umfassende Aussagen über das Auftreten und die phylogenetische Diversität dieser funktionalen Gruppe sollten in einer spezifischen Studie untersucht werden.

Da aber verschiedene Stoffwechselwege für den Abbau von langkettigen Fettsäuren und Aromaten ausgeschlossen wurden, ist davon auszugehen, dass im untersuchten

Reaktor langkettige Fettsäuren und aromatische Verbindungen von syntrophen Gemeinschaften zu Acetat oxidiert werden. Im untersuchten Reaktor konnten verschiedene Gruppen wasserstoffverwertender Organismen identifiziert werden. Für diese Rolle kommen sowohl die methanogenen Archaeen wie auch die sulfatreduzierenden oder die homoacetogenen Bakterien in Frage. Möglicherweise lässt sich das Auftreten der Sulfatreduzierer im hinteren Reaktorabschnitt mit ihrer Rolle als wasserstoffzehrende Partner in syntrophen Gemeinschaften erklären.

Methanogenese

Der letzte Schritt des anaeroben Abbaus wird von einer spezialisierten Gruppe von Organismen durchgeführt, den methanogenen Archaeen. Diese Organismen ließen sich mit Hilfe der Autofluoreszenz lichtmikroskopisch im Reaktor nachweisen. Dabei konnten erste Rückschlüsse auf die taxonomische Zugehörigkeit und auf die Funktion dieser Organismen gezogen werden. Der fluoreszierende Cofaktor F₄₂₀ tritt nur bei wasserstoffverwertenden Methanogenen auf.

Die Verteilung dieser Organismen wurde zusätzlich über eine MPN-Schätzung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sowohl im acidogenen wie auch im methanogenen Teil des Reaktors physiologisch aktive Methanogene nachweisbar waren. Die Zahl der methanogenen Archaeen stieg im methanogenen Teil des Reaktors deutlich an. Dieser Anstieg der Zahlen methanogener Archaeen konnte auch durch die in situ Hybridisierung bestätigt werden (Abbildung 3.9).

Als bestandsbildende Methanogene traten *Methanobacterium* sp., *Methanospirillum hungatei* und *Methanosarcina* sp. auf. *Methanosaeta* sp., ein obligat acetoklastischer methanogener Organismus, konnte im Reaktor über die in situ Hybridisierung nicht nachgewiesen werden. Da dieser Organismus auch in Anreicherungskulturen nur vereinzelt nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass *Methanosaeta* sp. im Reaktor keine Rolle für den Acetatabbau spielte. Diese Funktion übernahm *Methanosarcina* sp., ein methanogener Organismus, der sowohl autotroph wie auch heterotroph leben kann. Alternative Abbauege von Acetat durch sulfatreduzierende Bakterien konnten weder durch die Ergebnisse der Isolierungen, noch durch die in situ Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer nachgewiesen werden. Die anderen methanogenen Organismen (*Methanobacterium* sp., *Methanospirillum* sp) sind autotroph und reduzieren CO₂ zu Methan. Diesen Organismen kommt damit eine wichtige Rolle als wasserstoffzehrende Partner in syntrophen Gemeinschaften zu.

4.3 Einsatz mikrobiologischer Parameter für die Steuerung anaerober Reaktoren

Ein Charakteristikum der anaeroben Nahrungskette ist der modulare Aufbau. Verschiedene physiologische Gruppen setzen die Substrate schrittweise um. Deshalb ist ein vollständiger Abbau nur dann zu erreichen, wenn alle trophischen Gruppen effizient funktionieren. Dies ist besonders in der Anfahrphase eines Reaktors noch nicht der Fall, da sich die Organismen erst an ein neues Substrat adaptieren und eine ausreichende Biomasse aufbauen müssen, um den anaeroben Abbau durchzuführen. Die Anfahrphase ist bei anaeroben Reaktoren daher besonders kritisch. Die Wachstumsraten anaerober Organismen sind aufgrund der schlechteren Energieausbeute beim unvollständigen Umsatz der Substrate in der Regel geringer als bei aeroben Organismen. Daher kommt es in der Anfahrphase oft zu langen Phasen mit reduzierten Abbauraten. Bei Störungen des anaeroben Abbaus ist es daher neben der schnellen Diagnose des Problems erforderlich, geeignete Maßnahmen zur Problemlösung zu ergreifen und die Effizienz dieser Maßnahmen zu dokumentieren. Es konnte gezeigt werden, wie mikrobiologische Untersuchungen zur Diagnose von Mangelzuständen im Reaktor eingesetzt wurden.

Die Diagnose einer verminderten mikrobiellen Aktivität in der Anfahrphase des Reaktors war durch den Einsatz der Fluoreszenz in situ Hybridisierung schnell möglich. Nachdem eingeleitete verfahrenstechnische Maßnahmen zur Verbesserung des Abbaugrades nicht den erwünschten Erfolg zeigten, wurde mit Hilfe der in situ Hybridisierung der physiologische Zustand der Reaktorpopulation untersucht. Dabei konnte schnell diagnostiziert werden, dass die mikrobielle Population im Reaktor wenig aktiv war. Aufgrund dieser mikrobiologischen Daten war es möglich, eine Strategie für einen optimierten Anfahrprozess zu entwickeln, der dann erfolgreich auf diesen Reaktor angewendet werden konnte. Durch Anfütterung mit leicht abbaubaren Substraten für die primären Gärer und acetogenen Bakterien konnte die mikrobielle Population aktiviert werden. Die eingeleiteten Maßnahmen wurden mit Hilfe der in situ Hybridisierung verfolgt und der positive Effekt konnte dokumentiert werden. Gleichzeitig verbesserten sich die verfahrenstechnischen Parameter wie der CSB-Abbau und die Biogasproduktion (Abbildung 3.34).

Der Vorteil der in situ Hybridisierung bei derartigen Untersuchungen ist die Möglichkeit, detaillierte Untersuchungen einzelner phylogenetischer Gruppen durchzuführen. Eine Untersuchung des Reaktors auf der Populationsebene

ermöglicht eine genaue Diagnose aller physiologischen Gruppen und hilft bei der Entwicklung angepasster Maßnahmen. Diese Maßnahmen können zum Beispiel das Zufüttern spezifischer Substrate bzw. die Supplementierung mit Spurenelementen für sulfatreduzierende Bakterien oder Methanogene (Eisen, Nickel, Kobalt, Molybdän, Selen, Wolfram) sein, deren Wirkung in der Folge direkt überwacht werden kann.

Die vorliegende Untersuchung hat aber auch gezeigt, dass eine direkte Kopplung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit verfahrenstechnischen Parametern nur bedingt möglich ist. Die Hybridisierungssignale blieben nach Abschalten der Substratzufuhr über einen längeren Zeitraum stabil, während klassische verfahrenstechnische Parameter wie die Gasproduktion sehr schnell auf diesen Mangelzustand reagierten (Abbildung 3.32). Die Stabilität der Hybridisierungssignale bei kohlenstofflimitierten Zellen konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. (Fukui et al. 1996) zeigten, dass *Desulfobacter latus* auch nach längerer Zeit in einem Mineralmedium ohne Energie- und Kohlenstoffquelle positive Signale bei der in situ Hybridisierung zeigte. Der RNA-Gehalt der Einzelzellen sank nach dem Transfer in das Mineralmedium auf 30 % der RNA-Ausgangskonzentration und blieb auch während längerer Hungerphasen auf diesem Niveau. Vergleichbare Entwicklungen des RNA-Gehalts wurden auch bei anderen Organismen unter Hungerstress gemessen (Flärdh et al. 1992).

Die Fähigkeit, auch während Hungerperioden durch eine ausreichend hohe Konzentration von Ribosomen eine Proteinbiosynthese sicherzustellen, ist besonders bei schwankenden Nährstoffkonzentrationen von Vorteil. Durch eine schnelle Aktivierung der Proteinbiosynthese können Nährstoffe sofort bei Verfügbarkeit genutzt werden und in Zellmaterial umgesetzt werden. Diese Theorie wird durch weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Alle untersuchten physiologischen Gruppen zeigten eine langsame Abnahme der Hybridisierbarkeit, wenn die Substratzufuhr abgestellt wurde. Beim Wiederaufstart der Reaktoren reagierten die Zellen mit einer sofortigen Synthese von Ribosomen und die Hybridisierbarkeit stieg deutlich an (Abbildung 3.33).

Die schnelle Reaktion der Zellen auf bessere Umweltbedingungen und die Möglichkeit, diese Reaktionen mit Hilfe der in situ Hybridisierung messen zu können, lässt sich zur Verkürzung der Anfahrzeiten nutzen und in eine Strategie zur sondenunterstützten Inbetriebnahme von Reaktoren umsetzen. So kann durch die in situ Hybridisierung des Inokulums vor Inbetriebnahme des Reaktors geprüft werden,

ob alle physiologischen Gruppen vorhanden sind. Durch eine Beurteilung der Intensität des Hybridisierungssignals lässt sich der physiologische Status der Zellen abschätzen und bei schwachen Signalintensitäten eine gezielte Aktivierung einzelner Populationen durch Zugabe leicht abbaubarer Substrate erreichen. Zusätzlich können aus dem Inokulum Anreicherungskulturen angelegt werden, die unterschiedliche funktionale Gruppen enthalten. Während des Anfahrprozesses kann die Entwicklung der mikrobiellen Population mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung überwacht werden. Bei auftretenden Problemen (fehlender CSB-Abbau, geringe Biogasproduktion, niedriger pH-Wert) können geeignete Maßnahmen wie eine Pufferung des pH-Wertes, ein erneutes Animpfen mit adaptierten Anreicherungskulturen oder die Zugabe von spezifischen Spurenelementen für einzelne funktionale Gruppen ergriffen werden.

Auch im laufenden Reaktorbetrieb bieten sich Möglichkeiten, mikrobiologische Parameter zur Diagnose des Reaktorzustandes einzusetzen und aus den gewonnenen Ergebnissen Maßnahmen zur Verbesserung des Reaktorzustandes abzuleiten.

In einem weiteren Experiment zur Einbeziehung mikrobiologischer Parameter in die Prozesssteuerung konnte gezeigt werden, wie das Fehlen einer physiologischen Gruppe (methanogene Archaeen) im Reaktor diagnostiziert wurde und geeignete Maßnahmen für die Reinstallation dieser funktionalen Gruppe ergriffen wurden. Da durch hohe Fettsäurekonzentrationen der pH-Wert auf Werte von pH 4 gefallen war, wurde der Reaktor mit gepufferter Melasseschlempe gespült und mit einer Anreicherungskultur von methanogenen Archaeen angeimpft. In der Folge sanken die Fettsäurekonzentrationen, der CSB-Abbau stabilisierte sich und Methan konnte im Biogas nachgewiesen werden (Abbildung 3.35).

Die Etablierung einer physiologischen Gruppe in einem Anaerobreaktor wurde auch an verschiedenen anderen Beispielen beschrieben (Bouchez et al. 2000a; Bouchez et al. 2000b). Auch hier bieten sich durch die *in situ* Hybridisierung neue Möglichkeiten. Bei der Reinstallation funktionaler Gruppen in bestehende Reaktorsysteme ist es wichtig, die Etablierung und Aktivität dieser Organismen im Reaktor zu überprüfen. Summenparameter bieten dabei nur eingeschränkte Möglichkeiten, aber mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung lässt sich ein Organismus spezifisch im Habitat nachweisen und seine physiologische Aktivität *in situ* dokumentieren.

Der Nachweis von Mangelzuständen in einem Reaktor kann zwar auch einfach und direkt über die Messung verfahrenstechnischer Parameter vorgenommen werden, aber die in situ Hybridisierung ermöglicht zusätzlich eine deutlich differenziertere Aussage über die Aktivität verschiedener funktionaler Gruppen. Damit werden die Untersuchungsmöglichkeiten für anaerobe Reaktoren zur Abwasserbehandlung verbessert und ermöglichen differenzierte Diagnosen des Reaktorzustandes

Abschließend stellt sich die Frage, ob mikrobiologische Untersuchungen eines Anaerobreaktors mit dem Ziel einer Prozessoptimierung Sinn machen, oder ob die etablierten Methoden der Verfahrenstechnik ausreichend für die Überwachung solcher Systeme sind. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Populationszusammensetzung und funktionaler Stabilität nicht unbedingt gegeben ist. Reaktoren mit stabiler mikrobieller Populationszusammensetzung zeigten instabiles Verhalten, während stabil laufende Reaktoren deutliche Schwankungen in ihrer Populationszusammensetzung zeigten (Fernandez et al. 2000; Fernandez et al. 1999). Welche Parameter sind also tatsächlich entscheidend für die funktionale Stabilität eines Reaktors? Es steht außer Zweifel, dass alle funktionalen Gruppen in einem Anaerobreaktor vorhanden sein müssen, damit ein vollständiger Abbau komplexer organischer Verbindungen stattfindet. Viele Repräsentanten dieser funktionalen Gruppen des anaeroben Abbaus sind aber offensichtlich noch nicht bekannt, wie die Untersuchungen verschiedener anaerober Systeme zeigen (Delbès und Godon 1998; Godon et al. 1997b; Suau et al. 1999).

Die Einbeziehung mikrobiologischer Parameter in die verfahrenstechnische Steuerung von anaeroben Reaktoren zur Behandlung von Abwässern kann also als Ergänzung zu den vorhandenen Meßmethoden gesehen werden. Durch die langsame Abnahme der Hybridisierungssignale bei Zellen in Mangelsituationen, die für verschiedene Organismen beschrieben ist und durch eigene Messungen im Reaktor nachgewiesen wurde, müssen die Ergebnisse der in situ Hybridisierung mit Vorsicht interpretiert werden. Besonders bei akuten Vorfällen wie toxischen Effekten lässt sich die in situ Hybridisierung nicht einsetzen. Hier sind verfahrenstechnische Parameter wie die Biogasproduktion oder der CSB-Abbau aussagekräftiger. Trotzdem sind ursachenorientierte mikrobiologische Untersuchungen eine gute Ergänzung zu den ergebnisorientierten verfahrenstechnischen Untersuchungen, um das komplexe Ökosystem eines anaeroben Reaktors zur Abwasserreinigung zu verstehen.

4.4 Ausblick

Bioreaktoren bieten eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Untersuchung der Ökologie mikrobieller Systeme. Durch den Reaktorbetrieb werden die Umweltbedingungen weitgehend konstant gehalten und Bilanzierungen des Ein- und Austrags sind möglich. Dies sind Vorteile, die in offenen natürlichen Systemen nicht gegeben sind. Obwohl die anaerobe Abwasserreinigung seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt wird, sind nicht alle mikrobiellen Prozesse in diesen Anlagen geklärt. Eine umfassende Beschreibung der Biozöosen von anaeroben technischen Systemen wurde bisher nur selten durchgeführt (Delbès und Godon 1998; Godon et al. 1997b; Leclerc et al. 2001). In der Regel erfolgte eine Beschränkung auf einzelne physiologische Gruppen (Griffin et al. 1998; Hansen et al. 1999; Raskin et al. 1994b), wobei die Untersuchungen mit wenigen Ausnahmen (Delbès und Godon 1998) molekularbiologisch durchgeführt wurden und auf eine Kultivierung der Organismen verzichtet wurde. Durch diesen Verzicht werden physiologische Untersuchungen an den Reinkulturen unmöglich, die einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des Gesamtsystems leisten können. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass viele mikrobiologische Aspekte der anaeroben Abwassereinigung durch kultivierungsbasierende Methoden untersucht und damit verschiedene Fragen zur mikrobiellen Ökologie der anaeroben Abwasserreinigung beantwortet werden können. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese nicht ohne weiteres auf andere Systeme übertragen werden können.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse sollte durch detaillierte Untersuchungen an anderen Anaerobreaktoren geklärt werden. Dabei sollten die in dieser Untersuchung eingesetzten kultivierungsbasierenden Methoden durch molekularbiologische Methoden ergänzt werden, damit ein möglichst vollständiges Bild der mikrobiellen Biozönose gezeichnet werden kann. Durch die Auswahl der zu untersuchenden Systeme bezüglich verschiedener Parameter, wie der Bauart und der Größe der Anlagen, der Prozessführung oder des eingesetzten Abwassers (landwirtschaftliche, industrielle oder kommunale Abwässer), ließe sich der Zusammenhang von verfahrenstechnischen Parametern und dem Auftreten bestimmter Organismen untersuchen. Durch physiologische Experimente an den Reinkulturen ließe sich eine Datenbasis für die Abschätzung der Stoffflüsse in den untersuchten Systemen schaffen.

Die vorliegende Studie und Literaturdaten zeigen, dass anaerobe Reaktoren zur Behandlung von Abwässern mikrobiologische Systeme mit hoher Artenvielfalt sind (Tabelle 3.1) (Godon et al. 1997b). Die Rolle verschiedener physiologischer Gruppen, wie zum Beispiel der homoacetogenen Bakterien, sollte weitergehend untersucht werden, da diese Organismen durch ihre Physiologie verschiedene Aufgaben beim Abbau der organischen Substanzen im Abwasser übernehmen können. Bei der Abschätzung der mikrobiellen Diversität fiel eine äußerst geringe Diversität der sulfatreduzierenden Bakterien im untersuchten System auf. Ob dies das Resultat einer optimalen Anpassung an die Umweltbedingungen im Reaktor oder die Reaktion auf eine äußere Störung ist, kann nur in weitergehenden Untersuchungen beantwortet werden. Die Untersuchung der Reaktion mikrobieller Biozönosen auf äußere Störungen könnte wichtige Hinweise für die Optimierung der Prozesssteuerung liefern. Die Optimierung der Reaktorsteuerung durch die Einbeziehung mikrobiologischer Parameter war ein Ziel dieser Arbeit und konnte anhand von Fallbeispielen demonstriert werden. Detaillierte Untersuchungen der mikrobiellen Biozönosen verschiedener anaerober Reaktoren durch molekularbiologische und mikrobiologische Methoden können dazu beitragen, die Kenntnisse über die mikrobiologischen Grundlagen der anaeroben Abwasserreinigung zu vertiefen und die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen in die Planung und den Betrieb technischer Anlagen einfließen zu lassen.

5 Literatur

- Adrian, L.** Reduktive Dechlorierung von Trichlorbenzolen durch anaerobe Mikroorganismen. 1999. Dissertation Technische Universität Berlin.
- Amann, R., H. Lemmer, and M. Wagner.** 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology* **25**:205-215.
- Amann, R., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1992. Identification and in situ detection of individual bacterial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**:45-50.
- Amann, R. and K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**:143-169.
- Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
- Andreesen, J.** 1991. The genus *Eubacterium*, p. 1914-1924. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Arendsen, A. F., M. Q. Soliman, and S. W. Ragsdale.** 1999. Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **181**:1489-1495.
- Bache, R. and N. Pfennig.** 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **130**:255-261.
- Baena, S., M. L. Fardeau, M. Labat, B. Ollivier, J. L. Garcia, and B. K. C. Patel.** 2000. *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **50**:259-264.
- Balch, W. E., S. Schoberth, R. S. Tanner, and R. S. Wolfe.** 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon-dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bact.* **27**:355-361.
- Balkwill, D. L., G. R. Drake, R. H. Reeves, J. K. Fredrickson, D. C. White, D. B. Ringelberg, D. P. Chandler, M. Romine, D. Kennedy, and C. Spadoni.** 1997. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov.; *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:191-201.
- Barker, H.** 1936. Studies upon the methan-producing bacteria. *Arch Microbiol* **7**:420-438.
- Bartsch, K., H. Cypionka, and J. Overmann.** 1999. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiology Ecology* **28**:249-259.
- Beimfohr, C., A. Krause, R. Amann, and W. Ludwig.** 1993. In situ identification of *Lactococci*, *Enterococci* and *Streptococci*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:450-456.
- Bello-Mendoza, R. and M. F. Castillo-Rivera.** 1998. Start-up of an anaerobic hybrid (UASB/Filter) reactor treating wastewater from a coffee processing plant. *Anaerobe* **4**:219-225.
- Benz, M., B. Schink, and A. Brune.** 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4507-4512.
- Berge, O., Guinebretiere, M., Achouak, W., Antinelli, J., Fellous, R., Normand, P., and Heulin, T.** Description of three new species of the genus *Paenibacillus*: *Paenibacillus graminis* sp. nov., *Paenibacillus odorifer* sp. nov., and *Paenibacillus rhizohabitans* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. Genbank AJ251193 . 2000.
- Bernalier, A., A. Willems, M. Leclerc, V. Rochet, and M. D. Collins.** 1996. *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Archives of Microbiology* **166**:176-183.
- Biavati, B., B. Sgorbati, and V. Scardovi.** 1991. The genus *Bifidobacterium*, p. 816-833. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.

- Bockelmann, U., W. Manz, T. R. Neu, and U. Szewzyk.** 2000. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology* **33**:157-170.
- Boone, D. R. and M. P. Bryant.** 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:626-632.
- Boone, D. R., W. B. Whitman, and P. Rouvière.** 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. p. 35-80. *In: Methanogenesis - Ecology, physiology, biochemistry & genetics* (Ed. : J. G. Ferry), Chapman & Hall
- Borriello, S. and R. Carman.** 1983. Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. *J. Clin. Microbiol.* **17**:414-418.
- Borriello, S., H. Davies, and R. Carman.** 1986. Cellular morphology of *Clostridium spiroforme*. *Vet. Microbiol.* **11**:191-195.
- Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabert, S. Juretschko, J. Dore, P. Delgenes, R. Moletta, and M. Wagner.** 2000a. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* **2**:179-190.
- Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabert, M. Wagner, J. P. Delgenes, and R. Moletta.** 2000b. Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water Science and Technology* **41**:61-68.
- Brosius, J., T. Dull, D. Sleeter, and H. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* **148**:107-127.
- Bryant, M. P. and L. Burkey.** 1956. The characteristics of lactate fermenting sporeforming anaerobes from silage. *J. Bacteriol.* **71**:43-46.
- Buckel, W., P. H. Janssen, A. Schuhmann, U. Eikmanns, P. Messner, U. Sleytr, and W. Liesack.** 1994. *Clostridium viride* sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. *Arch. Microbiol.* **162**:387-394.
- Burggraf, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese, and K. O. Stetter.** 1994. Identifying members of the domain Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3112-3119.
- Burnham, K. and W. Overton.** 1978. Estimation of the size of a closed population when capture probabilities vary among animals. *Biometrika* **65**:623-633.
- Burnham, K. and W. Overton.** 1979. Robust estimation of population size when capture probabilities vary among animals. *Ecology* **60**:927-936.
- Bussmann, I., B. Philipp, and B. Schink.** 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **47**:41-50.
- Chao, A.** 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**:265-270.
- Chao, A.** 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43**:783-791.
- Chin, K. J., D. Hahn, U. Hengstmann, W. Liesack, and P. H. Janssen.** 1999. Characterization and Identification of Numerically Abundant Culturable Bacteria from the Anoxic Bulk Soil of Rice Paddy Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5042-5049.
- Coates, J. D., D. J. Ellis, E. L. Blunt-Harris, C. V. Gaw, E. E. Roden, and D. R. Lovley.** 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1504-1509.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**:812-826.
- Connell, J.** 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* **199**:1302-1310.
- Cook, G. M., F. A. Rainey, G. Chen, E. Stackebrandt, and J. B. Russell.** 1994. Emendation of the description of *Acidaminococcus fermentans*, a trans- aconitate- and citrate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **44**:576-578.

- Cord-Ruwisch, R., D. R. Lovley, and B. Schink.** 1998. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2232-2236.
- Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434-444.
- Daniel, S. L., E. Keith, H. Yang, Y. Lin, and H. L. Drake.** 1991. Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: expression and specificity of the CO-dependent demethylating activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**:416-422.
- Daniels, L., N. Bakhiet, and K. Harmon.** 1985. Evidence for the widespread distribution in *Streptomyces* and related organisms of the electron transferring cofactor, 5-deazaflavin. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:12-17.
- Defnoun, S., M. Labad, M. Ambrosio, J. Garcia, and B. K. C. Patel.** 2000. *Papillibacter cinnamivorans* gen. nov., sp. nov., a cinnamate-transforming bacterium from a shea cake digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1221-1228.
- Delbès, C. and J.-J. Godon.** 1998. 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe* **4**:267-275.
- Devereux, R., M. D. Kane, J. Winfrey, and D. A. Stahl.** 1992. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **15**:601-609.
- Dijkhuizen, L. and W. Harder.** 1991. Applications of prokaryotes, p. 197-206. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Dolfing, J.** 1988. Acetogenesis, p. 417-468. *In* A. J. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Dong, X., C. M. Plugge, and A. J. Stams.** 1994. Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2834-2838.
- Dörries, H.** Phylogenetische Diversität und räumliche Verteilung von mesophilen, Gram-negativen sulfatreduzierenden Bakterien in einem anaeroben Festbettreaktor. 1999. Studienarbeit, Institut für technischen Umweltschutz, TU Berlin.
- Drake, H. L.** 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood-Ljungdahl" pathway: past and current perspectives, p. 3-60. *In* H. L. Drake (ed.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York.
- Drake, H. L., S. L. Daniel, K. Küsel, C. Matthies, C. Kuhner, and S. Braus-Strohmeyer.** 1997. Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their metabolic versatilities? *BioFactors* **6**:13-24.
- Eker, A., J. Hessels, and J. van de Velde.** 1988. Photoreactivating enzyme from the green alga *Scenedesmus acutus*. Evidence for the presence of two different flavin chromophores. *Biochemistry* **17**:1758-1765.
- Felske, A., A. Wolterink, R. van Lis, W. M. de Vos, and A. D. L. Akkermans.** 1999. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:137-145.
- Fernandez, A. S., S. A. Hashsham, S. L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F. B. Dazzo, R. F. Hickey, C. S. Criddle, and J. M. Tiedje.** 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl Environ Microbiol* **66**:4058-4067.
- Fernandez, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle, and J. Tiedje.** 1999. How Stable Is Stable? Function versus Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3697-3704.
- Flårdh, K., P. S. Cohen, and S. Kjelleberg.** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain CCUG15956. *J Bacteriol* **174**:6780-6788.

- Fujisawa, T., S. Shirasaka, J. Watabe, and T. Mitsuoka.** 1984. *Lactobacillus aviarius* sp. nov.: a new species isolated from the intestine of chickens. *Syst Appl Microbiol* **5**:414-420.
- Fukui, M., Y. Suwa, and Y. Urushigawa.** 1996. High survival efficiency and ribosomal RNA decaying pattern of *Desulfobacter latus*, a highly specific acetate-utilizing organism, during starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **19**:17-25.
- Garrity, G., M. Winters, and D. Searles.** 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Gavin, J. J. and D. P. Cummings.** 1978. Enumeration of Microorganisms, p. 727-736. In J. J. Gavin and D. P. Cummings (eds.), CRC Handbook of Microbiology.
- Gelsomino, A., A. C. Keijser-Wolters, G. Cacco, and J. D. van Elsas.** 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **38**:1-15.
- Genthner, B. R., C. L. Davis, and M. P. Bryant.** 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:12-19.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen, and N. R. Pace.** 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bact.* **170**:720-726.
- Godon, J.-J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta.** 1997a. Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic reactor. *Water Science and Technology* **36**:49-55.
- Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta.** 1997b. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**:2802-2813.
- Gottschalk, G.** 1986. Bacterial metabolism. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Griffin, M. E., K. D. McMahon, R. I. Mackie, and L. Raskin .** 1998. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol. Bioeng.* **57**:342-355.
- Haddock, J. D. and J. G. Ferry.** 1993. Initial steps in the anaerobic degradation of 3,4,5-trihydroxybenzoate by *Eubacterium oxidoreducens*: characterization of mutants and role of 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene. *J. Bacteriol.* **175**:669-673.
- Hamilton, W. A.** 1991. Sulphate-reducing bacteria and their role in biocorrosion. p. 187-193. In: *Biofouling and biocorrosion in industrial watersystems*: Flemming, H. -C. , Geesey, G. G. (eds),.
- Hammes, W., N. Weiss, and W. H. Holzapfel.** 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, p. 1535-1594. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Hansen, K. H., B. K. Ahring, and L. Raskin.** 1999. Quantification of Syntrophic Fatty Acid-beta - Oxidizing Bacteria in a Mesophilic Biogas Reactor by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4767-4774.
- Hansen, M. C., T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, and S. Molin .** 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology* **26**:141-149.
- Harmsen, H. J., H. M. Kengen, A. D. Akkermans, and A. J. Stams.** 1995. Phylogenetic analysis of two syntrophic propionate-oxidizing bacteria in enrichment cultures. *System. Appl. Microbiol.* **18**:67-73.
- Harmsen, H. J., H. M. Kengen, A. D. Akkermans, A. J. Stams, and W. M. de Vos.** 1996a. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **62**:1656-1663.
- Harmsen, H. J. M., H. M. P. Kengen, A. D. L. Akkermans, A. J. M. Stams, and W. M. deVos.** 1996b. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1656-1663.
- Harriott, O. T. and A. C. Frazer.** 1997. Enumeration of Acetogens by a Colorimetric Most-Probable-Number Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:296-300.

- Heising, S., A. Brune, and B. Schink.** 1991. Anaerobic degradation of 3-hydroxybenzoate by a newly isolated nitrate-reducing bacterium. *FEMSMicrobiol. Lett.* **84**:267-272.
- Hengstmann, U., K. J. Chin, P. H. Janssen, and W. Liesack.** 1999. Comparative Phylogenetic Assignment of Environmental Sequences of Genes Encoding 16S rRNA and Numerically Abundant Culturable Bacteria from an Anoxic Rice Paddy Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5050-5058.
- Himmelbloom, B. and E. Canale-Parola.** 1989. *Clostridium methylpentosum* sp. nov.: a ring shaped intestinal bacterium that ferments only methylpentoses and pentoses. *Arch Microbiol* **151**:287-293.
- Hippe, H., J. Andreesen, and G. Gottschalk.** 1991. The genus *Clostridium* - Nonmedical, p. 1800-1866. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**:4765-4774.
- Hungate, R. E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. In J. Norris and D. Ribbons (eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York.
- Hurlbert, S.** 1971. The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**:577-586.
- Jackson, B. E., V. K. Bhupathiraju, R. S. Tanner, C. R. Woese, and M. J. McInerney.** 1999. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology* **171**:107-114.
- Janssen, P. H. and K. A. O'Farrell.** 1999. *Succinispira mobilis* gen. nov., sp. nov., a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.* **49**:109-1013.
- Janssen, P.** 1991. Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry 3 and further characteristics of the species. *Arch Microbiol* **155**:566-571.
- Jukes, T. and C. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. Murno (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic press, New York.
- Kaesler, I.** Untersuchung homoacetogener Bakterien in einem anaeroben Festbettreaktor. 1999. Diplomarbeit Humboldt-Universität Berlin.
- Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk.** 1997. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl Environ Microbiol* **63**:4164-4170.
- Kandler, O. and N. Weiss.** 1986. Regular, nonsporing Gram positive rods, p. 1208-1260. In P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore; London, Los Angeles, Sydney.
- Kane, M. D., A. Brauman, and J. A. Breznak.** 1991. *Clostridium mayombeii* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the african soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Arch. Microbiol.* **156**:99-104.
- Kaneuchi, C., T. Miyazato, T. Shinojo, and T. Mitsuoka.** 1979. Taxonomic study of helically coiled, sporeforming anaerobes isolated from the intestines of humans and other animals: *Clostridium cocleatum* sp. nov. and *Clostridium spiroforme* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **29**:1-12.
- Kaneuchi, C., K. Watanabe, A. Terada, Y. Benno, and T. Mitsuoka.** 1976. Taxonomic study of *Bacteroides clostridiiformis* subsp. *clostridiiformis* (Purri and Ankersmit) Holdeman and Moore and of related organisms: Proposal of *Clostridium clostridiiformis* (Burri and Ankersmit) comb.nov and *Clostridi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **26**:195-204.
- Kolmert, A., T. Henrysson, R. Hallberg, and B. Mattiasson.** 1997. Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters* **19**:971-975.
- Kotsyurbenko, O., M. Simankova, A. N. Nozhevnikova, T. Zhilina, N. Bolotina, A. Lysenko, and G. Osipov.** 1995. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov, *A. paludosum* sp.nov., *A. fimentarium* sp. nov. *Arch Microbiol* **163**:29-34.
- Koussemon, M., Y. Combet-Blanc, B. K. C. Patel, J. L. Cayol, P. Thomas, J. L. Garcia, and B. Ollivier.** 2001. *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *Int J Syst Bacteriol* **51**:1373-1382.

- Kozariszczuk, M.** Beurteilung des Abbauverhaltens von Rübenmelasseschlempe in anaeroben Festbettreaktoren unter Einbeziehung neuer mikrobiologischer Parameter. 2001. Dissertation Fakultät III- Prozesswissenschaften, TU Berlin.
- Krumholz, L. R. and M. P. Bryant.** 1986. *Syntrophococcus sucromutans* sp.nov. gen. nov. uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxybenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems. Arch. Microbiol. **143**:313-318.
- Kuttig, U.** Mehrstufige anaerobe Abwasserreinigung mit integrierter Auskristallation von Ammonium. 1992. Institut für Verfahrenstechnik, TU Berlin.
- Kutzner, H.** 1963. Untersuchungen an Clostridien mit besonderer Berücksichtigung der für die Milchwirtschaft wichtigen Arte. Zentralbl. Bakteriologie. **191**:441-450.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, and T. Noike.** 1998. The influence of pH and ammonia concentration on the methane production of in high solids digestion processes. Water Environ. Res. **70**:1075-1082.
- Leclerc, M., C. Delbes, R. Moletta, and J. Godon.** 2001. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. FEMS Microbiol Ecol. **34**:213-220.
- Lee, W., Z. Lewandowski, P. H. Nielsen, and W. A. Hamilton .** 1995. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review. Biofouling **8**:165-194.
- Liu, S.** 1997. An improved colorimetric assay for vicinal diol determination by Ti(III) and its utilization for reporting microbial O-demethylation. J. Microbiol. Methods **29**:85-95.
- Londry, K. L., P. M. Fedorak, and J. M. Suflita.** 1997. Anaerobic degradation of m-cresol by a sulfate-reducing bacterium. Appl Environ. Microbiol. **63**:3170-3175.
- Lovell, C. R. and Y. Hui.** 1991. Design and testing of a functional group-specific DNA probe for the study of natural populations of acetogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2602-2609.
- MacGregor, B. J., S. Toze, E. W. Alm, R. Sharp, C. Ziemer, and D. A. Stahl.** 2001. Distribution and abundance of Gram-positive bacteria in the environment: development of a group-specific probe. Journal of Microbiological Methods **44**:193-203.
- Maestrojuan, G. and D. R. Boone.** 1991. Characterization of *Methanosarcina barkeri* MS^T and 227, *Methanosarcina mazei* S-6^T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761^T. Int J Syst Bacteriol **41**:267-274.
- Magurran, A.** 1988. Ecological Diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K. H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. Microbiology **142** :1097-1106.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. System. Appl. Microbiol. **15**:593-600.
- Manz, W., M. Eisenbrecher, T. Neu, and U. Szewzyk.** 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16SrRNA targeted oligonucleotides. FEMS Microbiol. Ecol. **25**:43-61.
- Marmur, J.** 1961. A method for the extraction of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of molecular biology **3**:208-218.
- McAleece, N.** Biodiversity Pro. [Beta Version]. 1997. The Natural History Museum and the Scottish Association for Marine Science.
- McCaig, A. E., S. J. Grayston, J. I. Prosser, and L. A. Glover.** 2001. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol. **35**:37-48.
- Mechichi, T., M. Labat, J. L. Garcia, P. Thomas, and B. K. C. Patel.** 1999. *Sporobacterium olearium* gen. nov., sp. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester. Int J Syst Bacteriol **49**:1741-1748.
- Medlin, L., H. Elwood, S. Stickel, and M. Sogin.** 1988. The characterization of enzymatically amplified eucaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene **71**:491-499.

- Meier, H., R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1999. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic And Applied Microbiology* **22**:186-196.
- Merkel, W., W. Manz, U. Szewzyk, and K. Krauth.** 1999. Population dynamics in anaerobic wastewater reactors: Modelling and in situ characterization. *Water Research* **33**:2392-2402.
- Miyamoto, Y. and K. Itoh.** 2000. *Bacteroides acidifaciens* sp. nov., isolated from the caecum of mice. *Int J Syst Bacteriol* **50**:145-148.
- Mizuno, O., H. Takagi, and T. Noike.** 1998. Biological sulfate removal in an acidogenic bioreactor with an ultrafiltration membrane system. *Water Sci. Technol.* **38**:513-520.
- Morris, G.** 1986. *Eubacterium desmolans* sp. nov., a steroid desmolase-producing species from cat fecal flora. *Int J Syst Bacteriol* **36**:183-186.
- Mountfort, D. O., W. D. Grant, R. Clarke, and R. A. Asher.** 1988. *Eubacterium callanderi* sp. nov. that demethoxylates O-methoxylated aromatic acids to volatile fatty acids. *Int J Syst Bacteriol* **38**:254-258.
- Mouton, C. and L. Lamonde.** 1984. Immunogold electron microscopy of surface antigens of oral bacteria. *Can. J. Microbiol.* **30**:1008-1013.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
- Oleszkiewicz, J. A., T. Mastaller, and D. M. McCartney.** 1989. Effects of pH on sulfide toxicity in anaerobic processes. *Envir. Technol. Lett.* **10**:815-822.
- Osborn, A. M., E. R. Moore, and K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**:39-50.
- Palop, M., S. Valles, F. Pinaga, and A. Flors.** 1989. Isolation and characterization of anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **39**:68-71.
- Pankhania, I. P.** 1988. Hydrogen metabolism in sulphate-reducing bacteria and its role in anaerobic corrosion. *Biofouling* **1**:27-47.
- Pfennig, N.** 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B12-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Bact.* **28**:283-288.
- Plumb, J. J., J. Bell, and D. C. Stuckey.** 2001. Microbial Populations Associated with Treatment of an Industrial Dye Effluent in an Anaerobic Baffled Reactor. *Appl Environ Microbiol* **67**:3226-3235.
- Poulsen, L. K., G. Ballard, and D. A. Stahl.** 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1354-1360.
- Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdle.** 1996. Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605-3613.
- Rainey, F. A. and P. H. Janssen.** 1995. Phylogenetic analysis by 16S ribosomal DNA sequence comparison reveals two unrelated groups of species within the genus *Ruminococcus*. *FEMS Microb. Lett.* **129**:69-74.
- Raskin, L., L. K. Poulsen, D. R. Noguera, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1994a. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **60**:1241-1248.
- Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1994b. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1232-1240.
- Rieu-Lesme, F., B. Morvan, M. D. Collins, G. Fonty, and A. Willems.** 1996. A new H₂/CO₂-using acetogenic bacterium from the rumen: description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. *FEMS Microb. Lett.* **140**:281-286.

- Rocheleau, S., C. W. Greer, J. R. Lawrence, C. Cantin, L. Laramee, and S. R. Guiot.** 1999. Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent In situ hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* **65**:2222-2229.
- Rogosa, M.** 1969. *Acidaminococcus* gen.nov. *Acidaminococcus fermentans* sp. nov. anaerobic gram negative diplococci using aminoacids as the sole energy source for growth. *J Bacteriol* **98**:766.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1994. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849-2858.
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and Biological Evolution* **4**:406-425.
- Salama, M., W. Sandine, and S. J. Giovannoni.** 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* **57**:1313-1318.
- Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanders, HL.** 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *Amer. Nat.* **102**:243-282.
- Schink, B.** 1980. Syntrophism among Prokaryotes, p. 276-299. *In* A. Balows (ed.), *The Prokaryotes.* Springer Verlag.
- Schink, B.** 1985. Inhibition of methanogenesis by ethylene and other unsaturated hydrocarbons. *FEMS Microb. Ecol.* **31**:63-68.
- Schink, B.** 1988. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects, p. 771-846. *In* A. J. Zehnder (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms.* John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Schink, B.** 1991. Syntrophism among prokaryotes, p. 277-299. *In* A. Balows, H. G. Trüper, W. Harder, K. H. Schleifer, and M. Dworkin (eds.), *The Prokaryotes.* Springer Verlag.
- Schink, B. and M. Bomar.** 1991. The genera *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobium*, and *Acetitomaculum*. *in: The Prokaryotes*, 2nd ed,(eds. : Balows, A. , Trüper, H. G. , Harder, W, Schleifer, K. H.):1925-1936.
- Schink, B. and N. Pfennig.** 1982. *Propionigenium modestum* gen. nov. sp.nov. a new strictly anaerobic, non sporing bacterium growing on succinate. *Arch. Microbiol.* **133**:209-216.
- Schleifer, K. H.** 1986. Gram positive cocci, p. 999-1103. *In* P. Sneath, N. Mair, and E. Sharpe (eds.), *Bergey's Manual of systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Seifritz, C., S. L. Daniel, A. Gossner, and H. L. Drake.** 1993. Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **175**:8008-8013.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada.** 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol* **65**:1280-1288.
- Shah, H.** 1991. The genus *Bacteroides* and related taxa, p. 3593-3607. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes.* Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Shannon, C. and W. Weaver.** 1976. *Mathematische Grundlagen der Informationstheorie.* München, Wien.
- Shimp, R. and F. K. Pfaender.** 1985. Influence of naturally occurring humic acids on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:402-407.
- Smith, E. and G. van Belle.** 1984. Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics* **40**:119-129.

- Sorensen, A. H., V. L. Torsvik, T. Torsvik, L. K. Poulsen, and B. K. Ahring.** 1997. Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **63**:3043-3050.
- Spencer, T., J. Ganaway, and K. Waggie.** 1990. Cultivation of *Bacillus piliformis* (Tyzzer9 in mouse fibroblasts (3T3 cells). *Vet. Microbiol.* **22**:291-297.
- Stahl, D. A. and R. I. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes. p.205-248 *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Eds: E. Stackebrandt and M. Goodfellow),.
- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery.** 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1079-1084.
- Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J. J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Dore.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4799-4807.
- Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.
- Tebbe, C. C. and W. Vahjen.** 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* **59**:2657-2665.
- Tschech, A. and N. Pfennig.** 1984. Growth yield increase linked to caffeine reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **137**:163-167.
- van Gylswyk, N. O. and J. J. T. K. van der Toorn.** 1987. *Clostridium aerotolerans* sp. nov., a xylanolytic bacterium from corn stover and from the rumina of sheep fed corn stover. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:102-105.
- von Wintzingerode, F.** Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität einer anaeroben, Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkultur. 1999. Dissertation Humboldt Universität.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt .** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* **21**:213-229.
- Weber, S.** Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden. 2000. Dissertation Universität Marburg.
- Whittaker, R.** 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* **21**:213-251.
- Widdel, F.** Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Arten. 1980. Universität Göttingen.
- Widdel, F.** 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, p. 469-586. *In A. J. Zehnder* (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane.
- Widdel, F. and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. *In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer* (eds.), *The prokaryotes*. New York.
- Wilfinger, W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**:474-481.
- Wu, J. H., W. T. Liu, I. C. Tseng, and S. S. Cheng.** 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* **147**:373-382.
- Yoda, M., M. Kitagawa, and Y. Miyaji.** 1987. Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Wat. Res.* **21**:1547-1556.
- Zanoni, P., J. A. Farrow, B. Phillips, and M. D. Collins.** 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) spec.nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **37**:339-341.
- Zehnder, A. J. and K. Wuhrmann.** 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**:1165-1166.
- Zinder, S. H.** 1993. Physiological ecology of methanogens, p. 128-206. *In J. G. Ferry* (ed.), *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York.

Tabelle B: Übersicht über die Isolierungsfrequenz auf den unterschiedlichen Substraten

| Isolat | Nächster Verwandter | Häufigkeit der Isolierungen auf | | | | | | | | | |
|-----------|--|---------------------------------|----------|------------------------|-----|-------------------------|-----|-----------|---------|---|--|
| | | Melasse1 | Melasse2 | Lactat SO ₄ | TMB | Ethanol SO ₄ | MIX | Cellulose | Glucose | | |
| Isolat 3 | <i>Propionibacterium microaerophilum</i> | 2 | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 13 | <i>Propionibacterium granulosum</i> | 1 | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 48 | <i>Propionibacterium lymphophilum</i> | | | | 1 | | | | | | |
| TMB 22 | <i>Propionibacterium acnes</i> | | | | | | | | | | |
| Isolat 61 | <i>Clostridium butyricum</i> | 1 | 1 | | | | | | | 1 | |
| TMB 2 | <i>Clostridium butyricum</i> | | | | 1 | | | | | | |
| TMB1AT | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | | | | 1 | | | | | | |
| Isolat 34 | <i>Clostridium methylpentosum</i> | 2 | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 39 | <i>Clostridium viridae</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 36 | <i>Clostridium orbiscindens</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 18 | <i>Clostridium celerecrescens</i> | 1 | 2 | | | | | | 1 | | |
| Isolat 32 | <i>Clostridium aerotolerans</i> | 2 | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 42 | <i>Clostridium clostriforme</i> | 1 | | | | | | | | 1 | |
| Isolat 19 | <i>Clostridium piliforme</i> | 1 | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 23 | <i>Clostridium propionicum</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 53 | <i>Clostridium innocuum</i> | 2 | 1 | | | | | | | 2 | |
| Isolat 16 | <i>Clostridium spiroforme</i> | | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 52 | <i>Paenibacillus durum</i> | 2 | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 35 | <i>Paenibacillus spec.</i> | 2 | 2 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 7 | <i>Lactobacillus pentosus</i> | 3 | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 8 | <i>Lactobacillus agilis</i> | 2 | 3 | | | | | | | 3 | |
| Isolat 25 | <i>Lactobacillus aviaris</i> | 1 | 2 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 44 | <i>Lactobacillus lindneri</i> | | 1 | | | | | | | 1 | |
| Mix1 | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | 1 | 3 | | | 4 | | 1 | | 9 | |
| TMB 6 | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | | | | 1 | | | | | | |
| Isolat 1 | <i>Desulfovibrio termitides</i> | 1 | 1 | | | 3 | | 1 | | | |
| Mix 8 | <i>Desulfovibrio termitides</i> | | | | | | | | | 3 | |

Tabelle B: Übersicht über die Isolierungsfrequenz auf den unterschiedlichen Substraten (Fortsetzung)

| Isolat | Nächster Verwandter | Häufigkeit der Isolierungen auf | | | | | | | | | |
|-----------|--|---------------------------------|----------|------------|-----|-------------|-----|-----------|---------|---|--|
| | | Melasse1 | Melasse2 | Lactat SO4 | TMB | Ethanol SO4 | MIX | Cellulose | Glucose | | |
| Isolat 11 | <i>Acetobacterium woodii</i> | | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 21 | <i>Acetobacterium paludosum</i> | | 1 | | | | | | | | |
| TMB 3 | <i>Eubacterium limosum</i> | 1 | | | 1 | | | | | 1 | |
| Isolat 9 | <i>Eubacterium rectale</i> | | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 6 | <i>Eubacterium brachy</i> | 1 | | | | | | | | | |
| TMB 19 | <i>Eubacterium callandri</i> | | | | 4 | | | | | | |
| Isolat 53 | <i>Eubacterium cylindroides</i> | 1 | | | | | | | | 1 | |
| Isolat 28 | <i>Eubacterium siraeum</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 37 | <i>Eubacterium desmolans</i> | 2 | | | | | | | | | |
| Isolat 5 | <i>Bacteroides uniformis</i> | 1 | | | | | | | | 1 | |
| Isolat 2 | <i>Bacteroides uniformis</i> | | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 26 | <i>Bacteroides acidifaciens</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 3 | <i>Bacteroides vulgatus</i> | | 1 | | | | | | | 2 | |
| Isolat 33 | <i>Bacteroides splanchnicus</i> | | 1 | | | | | | | | |
| Isolat 4 | <i>Bacteroides spec.</i> | 1 | | | | | | | | 1 | |
| Isolat 22 | <i>Ruminococcus callidus</i> | 2 | | | | | | | | 3 | |
| Isolat 27 | <i>Ruminococcus hydrogenotrophicus</i> | | | | | | 1 | | | 2 | |
| Isolat 29 | <i>Ruminococcus sp.</i> | | 1 | | | | | | | 1 | |
| Isolat 41 | <i>Ruminococcus gnavus</i> | | 1 | | | | | | | 2 | |
| Isolat 31 | <i>Ruminococcus albus</i> | 2 | | | | | | | 1 | | |
| Isolat 43 | <i>Ruminococcus albus</i> | 2 | | | | | | | | 1 | |
| Isolat 47 | <i>Ruminococcus bromii</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 49 | <i>Ruminococcus sp.</i> | 1 | | | | | | | | 2 | |
| Isolat 17 | <i>Acidaminococcus fermentans</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 15 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2 | | | | | | | | | |
| Isolat 24 | <i>Aminobacterium colombensis</i> | 1 | | | | | | | | | |
| Isolat 1 | <i>Bifidobacterium lactis</i> | | 2 | | | | | | | | |
| TMB 39 | <i>Sporobacterium olearius</i> | 1 | | | 19 | | | | | | |
| TMB 5 | <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> | | 1 | | 2 | | | | | | |
| Isolat 12 | <i>Papillibacter cinnaminivorans</i> | 1 | | | | | | | | | |

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen an der TU Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Szewzyk im Zeitraum von Mai 1997 bis Juni 2000 durchgeführt. Dabei habe ich von vielen Personen Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Herrn **Prof. Dr. U. Szewzyk** danke ich besonders für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit. Die wertvollen Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft waren eine wichtige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. U. Göbel** danke ich für seine spontane Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Bei den Mitarbeitern des FG Ökologie der Mikroorganismen bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit, fachliche Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima. Besonderer Dank gebührt den Kolleginnen Frau **C. Baschien**, Frau **Dr. U. Böckelmann** und Frau **C. Keil**, die diese Arbeit bereits in einem frühen Stadium korrigiert haben.

Prof. Dr. M. Kraume und den Mitarbeitern vom Institut für Verfahrenstechnik der TU Berlin, namentlich Herrn **M. Kozarisczcuk**, danke ich für die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit im Rahmen des TP A16 im Sfb 193.

Herrn **Yves Neitzel** gilt mein Dank für seine ausgezeichnete Arbeit als studentische Hilfskraft.

Frau **Ines Kaesler** und Herr **Henno Dörries** beteiligten sich an dieser Arbeit in Form einer Diplom- bzw. Studienarbeit.

Ganz besonders danke ich **Verena Niesel** und **Friedrich** für die große Geduld und die Unterstützung bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Die Untersuchungen wurden mit der finanziellen Unterstützung der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 193, Teilprojekt A16, durchgeführt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Wolfgang Wenzel
geb. am 16.5.1967 in Werl

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1977 - 1986 Mariengymnasium Werl
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

15. 8. 1986 – 15. 11. 1987 Grundwehrdienst als Sanitätssoldat

Akademische Ausbildung:

Abschluß Grundstudium Universität Bonn
Vordiplom
Hauptstudium Universität Oldenburg
Abschluß Diplom Biologe

Mai 1997 – Juni 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für technischen Umweltschutz TU Berlin im
Sfb193

seit Juli 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im EU-
Projekt Micromar