



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Isolierung und Charakterisierung eines unbekanntes Archaeons aus Umweltproben

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Jonas Oelbracht

am 24. Januar 2022

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Ing. Hans Schäfers (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** M. Sc. Benjamin Rößler (HAW Hamburg)

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Labor FTZ Alster

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	IV
II	Tabellenverzeichnis.....	V
III	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
IV	Formelverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
2	Theorie.....	3
2.1	Vorkommen Archaeen.....	3
2.2	Abbau von Organik.....	3
2.3	Hydrogenotrophe Methanogenese	5
2.4	Cofaktor F ₄₂₀	6
2.5	Zielsetzung.....	7
3	Material	8
3.1	Geräte und Gebrauchswaren	8
3.2	Chemikalien und Reagenzien.....	9
3.3	Primer	11
3.4	Verwendete Stämme.....	12
3.5	Medienbestandteile	12
3.6	Puffer und Gebrauchslösungen.....	16
3.7	Software.....	18
4	Methoden.....	19
4.1	Herstellung HAW Medium	19
4.2	Anaerobisierung.....	20
4.3	Beschichtung der Objektträger	20
4.4	Anreicherung der Proben für die quantitative Bildanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie	21
4.5	Zellzahlbestimmung mittels Mikroskopie	22
4.6	Probennahme der Umweltproben.....	23
4.7	Isolierung	25
4.8	Spannungsuntersuchung.....	27

4.9	Molekularbiologische Untersuchungen	28
4.9.1	DNA-Aufschluss	28
4.9.2	Gelelektrophorese	28
4.9.3	Polymerase Kettenreaktion	29
4.9.4	Sequenzierung	29
4.10	Morphologie	30
4.11	Bestimmung physiologischer Eigenschaften.....	30
4.11.1	Temperaturoptima	30
4.11.2	pH-Optima.....	31
5	Ergebnisse und Diskussion	32
5.1	Angereicherte Kulturen.....	32
5.2	Molekularbiologische Untersuchungen	35
5.2.1	Extraktion von genomischer DNA.....	35
5.2.2	PCR für Sangersequenzierung.....	37
5.2.3	Sangersequenzierung	40
5.3	Spannungsversuch.....	41
5.4	Charakterisierung.....	45
5.4.1	Morphologie	45
5.4.2	Physiologie.....	58
5.5	Ergebnistabelle	67
6	Zusammenfassung.....	69
6.1	Isolierung	69
6.2	Charakterisierung.....	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Anhang.....	76

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundlagen der anaeroben Vergärung.....	4
Abbildung 2: Wolfzyklus der Kohlenstoffreduktion zu Methan.....	6
Abbildung 3: Herstellung des HAW Mediums	20
Abbildung 4: Beschichtung der Objektträger.....	21
Abbildung 5: Anreicherungsverfahren der Proben für die Auswertung der Zellzahl.....	22
Abbildung 6: Mikroskopie der Proben mittels Autofluoreszenz und SYBR GREEN I.....	23
Abbildung 7: mikrobielle elektrolytische Zelle.	25
Abbildung 8: Vorgehen bei der Isolierung mit Spannung	26
Abbildung 9: Isolierungsschritt der Isolierungsstrategie ohne Spannung	27
Abbildung 10: Agarose Gelelektrophorese der DNA-Extraktionsprodukte der Kulturen EK1PA und EK2PA.....	36
Abbildung 11: Agarose Gelelektrophorese der DNA-Extraktionsprodukte der Kulturen EK11NR und EK12NR..	36
Abbildung 12: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK1PA und EK2PA	37
Abbildung 13: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK1PA und EK2PA	38
Abbildung 14: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK11NR und EK12NR	39
Abbildung 15: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK11NR und EK12NR	39
Abbildung 16: Mittelwerte der Gesamtzellzahl der Kultur EK11NR	42
Abbildung 17: Mittelwerte der methanogenen Zellzahl der Kultur EK11NR.....	43
Abbildung 18: Mittelwerte der Gesamtzellzahl der Kultur EK12NR	44
Abbildung 19: Mittelwerte der methanogenen Zellzahl der Kultur EK12NR.....	44
Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK11NR (40xfach Objektiv).....	47
Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK11NR (100xfach Objektiv).....	48
Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK12NR (40xfach Objektiv).....	50
Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK12NR (100xfach Objektiv).....	51
Abbildung 24: Aufnahmen der Kulturen EK11NR (links) und EK12NR (rechts).....	52
Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der Agglomerate aus Kultur EK12NR	53
Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen der <i>M. congolense</i> Kultur (40xfach Objektiv)	55
Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahmen der <i>M. congolense</i> Kultur (100xfach Objektiv) ...	56
Abbildung 28: Histogramm der Länge der Zellen	57
Abbildung 29: Mittelwerte der Breite und Länge der Zellen.....	58

Abbildung 30: Wachstum der Kultur EK11NR im Temperaturbereich.....	59
Abbildung 31: Wachstum der Kultur EK12NR im Temperaturbereich	60
Abbildung 32: Wachstum der Kultur <i>M. congolense</i> im Temperaturbereich	61
Abbildung 33: Wachstum der drei Kulturen im Temperaturbereich	61
Abbildung 34: Wachstum der Kultur EK11NR im pH-Bereich von 6 bis 8,5	63
Abbildung 35: Wachstum der Kultur EK12NR im pH-Bereich von 6 bis 8,5	64
Abbildung 36: Wachstum der <i>M. congolense</i> Kultur im pH-Bereich von 6 bis 8,5	65
Abbildung 37: Phasenkontrast des HAW Mediums mit 50 mM HEPES Puffer	66

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Gebrauchswaren	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	9
Tabelle 3: Verwendete Primer	11
Tabelle 4: Verwendete Archaeenstämmen von der DSMZ	12
Tabelle 5: Bestandteile der Makroelemente des HAW Mediums	12
Tabelle 6: Bestandteile der Stammlösung der Spurenelemente des HAW Mediums	13
Tabelle 7: Bestandteile der Vitamin Stammlösung des HAW Mediums	13
Tabelle 8: Bestandteile der Resazurin Stammlösung des HAW Mediums	14
Tabelle 9: Bestandteile der Imidazol Stammlösung des HAW Mediums	14
Tabelle 10: Bestandteile der Fe-Cystein Stammlösung des HAW Mediums	15
Tabelle 11: Bestandteile der Natriumsulfid Stammlösung des HAW Mediums.....	15
Tabelle 12: Bestandteile der Titan-Citrat Stammlösung des HAW Mediums	15
Tabelle 13: Konzentrationen der Antibiotika Lösungen für das HAW Medium	16
Tabelle 14: Konzentration der DABCO Lösung	17
Tabelle 15: Konzentration der Methylcellulose Lösung	17
Tabelle 16: Konzentration der Tris-HCl Puffer für die pH Kurve.....	17
Tabelle 17: Konzentration der Imidazol Puffer für die pH Kurve.....	18
Tabelle 18: Konzentration der HEPES Puffer für die pH Kurve.....	18
Tabelle 19: Parameter der verwendeten Umweltproben	24
Tabelle 20: Zusammensetzung des PCR Ansatzes	29
Tabelle 21: Parameter des verwendeten PCR Programmes.....	29
Tabelle 22: Temperaturen des ersten Isolierungsschrittes der einzelnen Proben	33
Tabelle 23: Ergebnisse der BLAST-Suche	40
Tabelle 24: Ergebnistabelle. Angaben zum <i>M. formicicum</i> gemäß Battumur et al. 2016.....	68

III Abkürzungsverzeichnis

CHO-MFR	<i>N-Formylmethanofuran</i>
CoB	<i>Coenzym B</i>
CoM	<i>Coenzym M</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EE	<i>erneuerbare Energien</i>
fd	<i>Ferredoxin</i>
H ₄ MPT	<i>Tetrahydromethanopterin</i>
Mc	<i>Methanobacterium congolense</i>
MEC	<i>mikrobielle elektrolytische Zelle</i>
MFR	<i>Methanofuran</i>
Mo	<i>Mikroorganismus</i>
Mrg	<i>Mikroreaktionsgefäß</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PtG	<i>Power-to-Gas</i>
QMF	<i>Quantitativer mikroskopischer Fingerabdruck</i>

IV Formelverzeichnis

(1) Reaktionsgleichung der Elektromethanogenese	2
(2) Reaktionsgleichung der acetoclastischen Methanogenese	5
(3) Reaktionsgleichung der methylotrophen Methanogenese	5
(4) Reaktionsgleichung der hydrogenotrophen Methanogenese	5

1 Einleitung

In den 1970ern entdeckte Carl Woese die Domäne der Archaeobacteria (Woese et al. 1978), wobei sich der Begriff Archaea durchgesetzt hat. Sie bildet mit den Bakterien und den Eukaryoten die drei Domänen des Lebens (DeLong und Pace 2001). Die ersten Archaeen wurden ca. vor 140 Jahren entdeckt und beschrieben, zu diesem Zeitpunkt waren diese jedoch den Bakterien zugeordnet. Dabei sorgte die Entdeckung der Archaeen für eine erneute Debatte über die Evolution, da Archaeen in extremen Umgebungsbedingungen überleben können (Cavicchioli 2011). Jedoch gehören nicht alle Archaeen zu den extremophilen Mikroorganismen. Die Archaeen werden in vier Superphyla unterteilt: Euryarchaeota, DPANN, Proteoarchaeota und Asgard (Adam et al. 2017; Sun et al. 2020). DPANN ist ein Akronym, welches sich aus den Phyla Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota und die Nano-haloarchaeota zusammensetzt. Diese Phyla gehören diesem Superphylum an (Dombrowski et al. 2019). Das Superphylum der Euryarchaeota ist besonders interessant, vor allem die Gruppe der methanogenen Archaeen, für die Elektrobiotechnologie, ein junges und zukunfts-trächtiges Forschungsgebiet der Biotechnologie. Die Methanogene sind Teil des Abbaus von biologischen Abfallstoffen und kommen daher in den unterschiedlichsten Umgebungen vor, z.B. in Gewässern, anaeroben Fermentern oder Magen-Darm Trakten von Tieren und Menschen (Jabłoński et al. 2015).

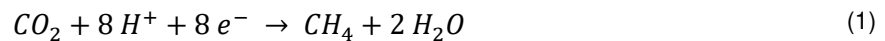
Durch die Erderwärmung und den daraus resultierenden Klimawandel sind die methanogenen Archaeen näher in den Fokus geraten, da die Abgabe von Treibhausgasen wie z. B. CO₂ und CH₄ in die Atmosphäre reduziert werden muss, um ein weiteres Ansteigen der Erdtemperatur zu verlangsamen. Einerseits stammen über 70 % des emittierten Methans aus natürlichen Quellen, welche zum Großteil auf methanogene Archaeen zurückzuführen sind (Wen et al. 2017). Andererseits könnten sie einen entscheidenden Beitrag zur Reduzierung der Methan Emission beitragen.

Um Treibhausgasen einsparen zu können, werden verschiedene Strategien der Energieerzeugung und -speicherung benötigt, welche erneuerbare Energien (EE), z.B. Wind- oder Solar-kraft, nutzen. Die EE fluktuieren aufgrund ihrer Wetterabhängigkeit jedoch stark. Um dennoch eine stabile Versorgung zu gewährleisten, müssen verschiedene Speichersysteme ins Strom-netz integriert werden. Vor allem bei der Langzeitspeicherung bieten die Power-to-Gas (PtG) Technologien ein hohes Potential.

Bei PtG wird Strom genutzt um Wasserstoff und/oder Methan herzustellen. Unter anderem kann Methan, als hochenergetischer Brennstoff, für die Langzeitspeicherung genutzt werden. Ein Vorteil gegenüber von Wasserstoff ist, dass das bestehende Erdgasnetz für die Speicherung des Methans genutzt werden kann. (Weizsäcker et al. 2016; Haumaier et al. 2020)

Ein Bereich der PtG ist die biologische Methanisierung, welche in zwei Stufen abläuft. Zunächst wird Wasser mittels Elektrolyse in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten. Der Wasserstoff wird anschließend in eine Biogasanlage geleitet (*in situ* Methanisierung), welche die Methanproduktion steigert. Jedoch entsteht durch die Elektrolyse ein hoher Energieverlust. Dieser wird versucht durch die Anwendung der Elektromethanogenese zu Umgehen (Weizsäcker et al. 2016; Geppert et al. 2016).

Die Elektromethanogenese ist ein junges Forschungsgebiet der Elektrobiotechnologie und gehört zu den PtG-technologien, wobei die ersten Publikationen in den 90iger Jahren erschienen. Hierbei sollen methanogene Archaeen in der Lage sein, Kohlenstoffdioxid und Elektronen in Methan umzusetzen. Dadurch könnte der Überschussstrom von den EE direkt in Methan umgesetzt und so zwischengespeichert werden. (Geppert et al. 2016).



2 Theorie

2.1 Vorkommen Archaeen

Archaeen weisen vielfältige funktionale Fähigkeiten und einzigartige Spezialitäten (z.B. Isoprenoid-Glycerinether-Lipide) auf, was es ihnen ermöglicht in extremen Umgebungen zu überleben. Sie sind nahezu überall aufzufinden, wie z. B. in Wassersedimenten, im Erdboden, in anaeroben Fermentern, im Verdauungstrakt, in vulkanischen Umgebungen und in Kohle- und Ölvorkommen (Cavicchioli 2011; Jabłoński et al. 2015).

Im Flusssediment sind vor allem Archaeen der Stämme *Methanoregula*, *Methanosaeta* und *Methanobacterium* vertreten. Im Mündungsbereich von Flüssen sind zusätzlich Archaeen der Stämme *Methanocella* und *Methanoculleus* vorhanden, da ein erhöhter Salzgehalt einen positiven Effekt auf die acetoclastische Methanogenese hat. Diese Umgebung weist eine hohe diverse mikrobielle Gemeinschaft auf, da sich Mikroorganismen vom Land und dem Meer mischen. Die partielle Zellzahl einzelner Stämme ist hingegen gering. Die konkrete Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ist abhängig vom pH-Wert, dem Salzgehalt und der Temperatur der Gewässer (Wen et al. 2017).

In anaeroben Fermentern ist die Zelldichte der Mikroorganismen höher als in viele anderen Umgebungen z.B. in Flusssedimenten. In anaeroben Fermentationen wie in Biogasanlagen und Faultürmen sind acetoclastische und hydrogenotrophe Methanogene vertreten. Die acetoclastischen Methanogenen, welche der Gattung *Methanosaeta* und *Methanosarcina* angehören, können je nach mikrobiellen Profil der anaeroben Fermentern, bis zu 70 % des Methans produzieren, welches bei der typischen anaeroben Vergärung aus Acetat entsteht (Aydin et al. 2015). Die mikrobiellen Profile in den anaeroben Fermentern können je nach Reaktortyp, Fermentationsbedingungen und den hinzugegebenen Substraten stark variieren (Hassa et al. 2018). Je nach Reaktortyp sind Methanogene der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*, *Methanothermobacter*, *Methanosaeta*, *Methanomethylovorans* und/oder *Methanospirillum* vertreten (Abendroth et al. 2015).

2.2 Abbau von Organik

In anaeroben Fermentern werden organische Substrate in ihre Bestandteile zersetzt. Dieser Prozess findet ebenfalls in anderen Umgebungen, wie z.B. Ozeane, Flusssedimente, Feuchtgebiete oder Deponien, statt (Wen et al. 2017; Ferry 1992). Für die Zersetzung von komplexen organischen Strukturen werden verschiedene mikrobiellen Gruppen benötigt. Der Abbau lässt sich in vier Phasen unterteilen: die Hydrolyse, die Acidogenese, die Acetogenese und die Methanogenese (siehe Abbildung 1).

Im ersten Schritt werden die komplexen organischen Strukturen fermentiert und hydrolysiert. Hierbei werden komplexe organische Polymere, wie Kohlenhydrate, Proteine und Fette in Zucker, Aminosäuren und langkettige Fettsäuren zerlegt. Die Hydrolyse stellt den geschwindigkeitslimitierenden Abbauschritt dar (Lee et al. 2017).

Im Anschluss verstoffwechseln Acidogene die Produkte der Hydrolyse in kurzkettige organische Säuren, wie z.B. Ameisensäure oder Essigsäure, und in Alkohole, wie z.B. Methanol oder Ethanol. Es entstehen bei diesem Stoffwechsel ebenfalls Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff. Sowohl die Produkte mit Methylgruppen als auch Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff können direkt von den Methanogenen verstoffwechselt werden. Die weiteren Produkte der Acidogenese werden durch die Acetogenese zu Acetat und Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut, welche wiederum von Methanogenen zu Methan umgewandelt werden können. Sie bilden damit den finalen Schritt des anaeroben Abbaus von komplexen organischen Strukturen (Ferry 1992; Bibra et al. 2015).

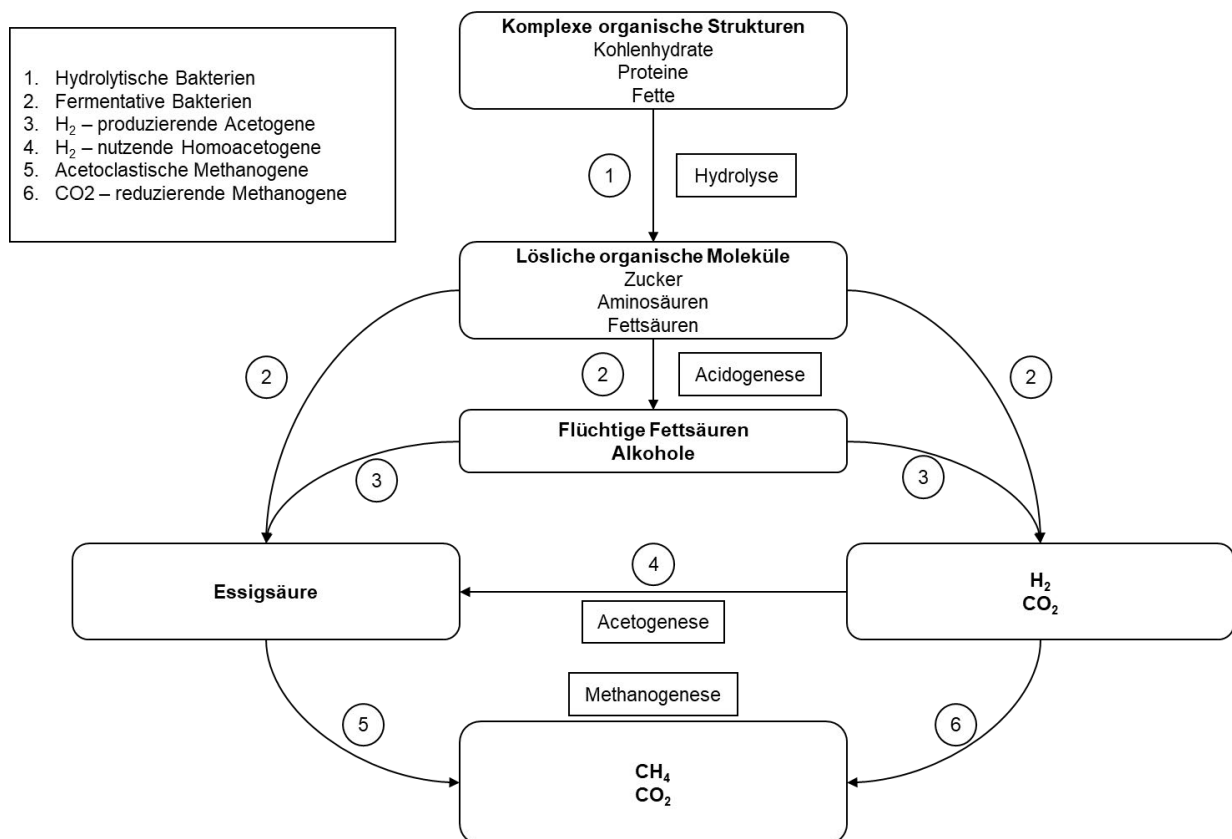
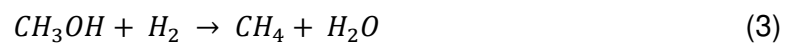


Abbildung 1: Grundlagen der anaeroben Vergärung. Quelle: aus dem Englischen nach (Bibra et al. 2015)

2.3 Hydrogenotrophe Methanogenese

Derzeit sind fünf Ordnungen von Methanogenen klassifiziert: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales*, wobei die *Methanosarcinales* Cytochrome und Methanophenazin in ihrem Stoffwechsel nutzen. Innerhalb der fünf Ordnungen von Methanogenen sind drei methanogene Stoffwechselwege bekannt. Diese drei Stoffwechselwege sind die acetoclastische (siehe (2)), die methylo trope (siehe Formel (3)) und die hydrogenotrophe Methanogenese (siehe Formel (4)). Wobei lediglich die Methanogenen, welche Cytochrome verwenden, alle drei Stoffwechselwege nutzen können. Die Methanogenen ohne Cytochrome können nur den hydrogenotropen Stoffwechselweg verwenden (Thauer et al. 2008).



Bei der hydrogenotropen Methanogenese wird Kohlenstoffdioxid unter Verwendung von Wasserstoff zu Methan reduziert. Zwischen der Energiegewinnung der Methanogenen mit Cytochrom und ohne Cytochrom gibt es zu Beginn des Kreislaufes Unterschiede. Zu Beginn des hydrogenotropen Stoffwechselweges wird Kohlenstoffdioxid an Methanofuran (MFR) fixiert. Bei dieser Reaktion wird das Coenzym Ferredoxin (fd) oxidiert und N-Formylmethanofuran (CHO-MFR) und Wasser entstehen (siehe Abbildung 2, a). Im Anschluss reagiert CHO-MFR mit Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) und bildet CHO-H₄MPT, wobei MFR abgespaltet wird (siehe Abbildung 2, b). Anschließend wird die Aldehydgruppe von CHO-H₄MPT unter der Verwendung eines Wasserstoffprotons zu CH≡H₄MPT reduziert (siehe Abbildung 2, c). Nachfolgend wird der Cofaktor F₄₂₀ zweifach oxidiert, wodurch CH≡H₄MPT zu CH-H₄MPT reduziert wird (siehe Abbildung 2, d und e). Darauf folgend wird die Methylgruppe von CH-H₄MPT auf das Coenzym M (CoM) übertragen und dadurch entsteht CH₃-S-CoM. Dabei wird H₄MPT frei (siehe Abbildung 2, f). Diese Reaktion ist mit der Translokation von Na⁺ Ionen gekoppelt. Im Weiteren reagiert CH₃-S-CoM mit dem Coenzym B (CoB). Dabei bildet sich das Heterosulfid CoM-S-S-CoB aus und Methan wird frei (siehe Abbildung 2, g). Im Zuge dieser Reaktion wird der Cofaktor fd reduziert und somit regeneriert (siehe Abbildung 2, h und j) (Thauer et al. 2008; Cheng et al. 2018).

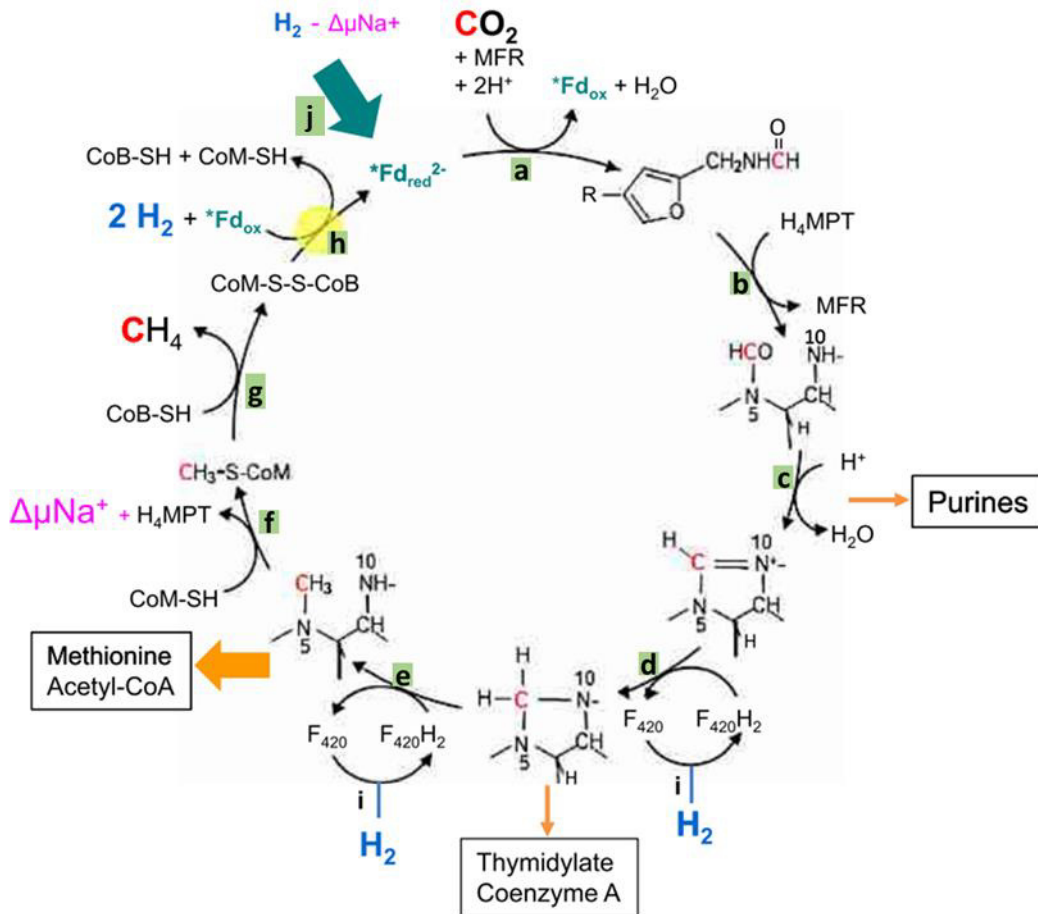


Abbildung 2: Wolfzyklus der Kohlenstoffreduktion zu Methan unter der Verwendung von Wasserstoff (Thauer 2012). Grün hervorgehoben sind die einzelnen Reaktionsschritte.

2.4 Cofaktor F₄₂₀

Methanogene Archaeen können mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden, da die Cofaktoren F₄₂₀ und F₃₅₀ über spezifische Anregungs- und Emissionsspektren verfügen und diese Coenzyme essenziell für die Methanogenese sind. Der reduzierte Cofaktor F₄₂₀ liefert die Reduktionsäquivalente für die schrittweise kovalente Bindung des zweiten und dritten Wasserstoffatoms in der Methanogenese. Dabei wird der Cofaktor F₄₂₀ oxidiert. Die Bindung der Wasserstoffatome stellt einen essenziellen Schritt für den Elektronentransfer in der Methanogenese da. Deshalb besitzen alle methanogenen Archaeen, welche in der Lage sind CO₂ zu reduzieren, diesen Cofaktor (Lambrecht et al. 2017; Doddema und Vogels 1978). Der Cofaktor wurde ebenfalls in anderen Organismen gefunden, liegt bei diesen jedoch in geringeren Konzentrationen vor (Grinter und Greening 2021; Lambrecht et al. 2017). Bei den hydrogenotrophen Methanogene schwankt die Konzentration, je nach Bestimmungsart, zwischen 120 – 410 mg/kg feucht Zellmasse und bei nicht hydrogenotrophen Methanogenen lag diese nur bei 16 mg/kg feucht Zellmasse (Lambrecht et al. 2017). Die oxidierte Form des Cofaktors lässt sich bei

420 nm anregen und emittiert bei 470 nm (Grinter und Greening 2021). Die methanogene Archaeen verfügen dadurch über eine Autofluoreszenz, welches es ermöglicht diese während der Isolierung zu identifizieren. Gleichzeitig kann die Autofluoreszenz genutzt werden, um die Zellzahl mikroskopisch zu bestimmen.

2.5 Zielsetzung

Bei dem Abbau von Organik ist eine Vielzahl an Mikroorganismen beteiligt. Umweltproben sind dabei eine Repräsentation der mikrobiellen Gemeinschaft der Umgebung, aus der die Umweltprobe genommen wurde. Bei der Isolierung soll möglichst ein Stamm dieser mikrobiellen Gemeinschaft vorliegen. Hierzu müssen die Begleitorganismen aus der Anfangskultur (Umweltprobe) entfernt werden. Dies ist aufgrund der Eigenschaften der unterschiedlichen Mikroorganismen ein längerer Prozess, da sich manche Bakterienstämme nur schwer entfernen lassen. Unter der Verwendung der Elektromethanogenese könnte ein Isolierungsbedingung geschaffen werden, welche den Isolierungsprozess verbessert. Dies ist möglich, da die Elektromethanogenese hauptsächlich durch Methanogene durchgeführt wird (Xu et al. 2017; Geppert et al. 2016). In der hier vorliegenden Arbeit soll eine solche Umgebung für die Isolierung geschaffen werden, in welcher sich elektroaktive Methanogene anreichern können. Allerdings ist zum derzeitigen Standpunkt noch keine direkte Isolation mittels Anlegens einer Spannung gelungen bzw. bekannt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Isolation einer methanogenen Kultur via der Elektromethanogenese möglich ist. Des Weiteren sollen die isolierten Stämme physiologisch und morphologisch charakterisiert werden. Eine molekularbiologische Untersuchung soll eine taxonomische Einordnung der Kulturen, ermöglichen.

3 Material

3.1 Geräte und Gebrauchswaren

In Tabelle 1 sind die verwendeten Geräte und Gebrauchswaren aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Gebrauchswaren

Gerät/Gebrauchs- ware	Typ	Artikelnum- mer	Hersteller
Aluminiumbördelkappe		CLS-4209-12	Chemglass
Autoklav	DE-45		Systec
Deckgläschen	Menzel-Gläser, 24 x 50 mm	5161050	Thermo Scientific
Elektrophorese - Netzgerät	Consort EV 265		Fischer scientific
Heizplatte	D-6010		neoLab
	IKAMAG RCT		IKA
Homogenisierer	FastPrep-24 5G	15260488	MP Biomedicals
Inkubatoren	Certomat BS-1		B. Braun
	BFD 53	9010-0087	Binder
	B 30	832 310	Memmert
	BD 115	9010-0088	Binder
	BD-240		Binder
	B 40	861 497	Memmert
	FE 53	89604	Binder
	1724009900310	4990735	Binder
Kanüle	Sterican Gr.01	4657519	B.Braun
	Sterican Gr.17	4657675	B.Braun
Kits	FastDNA, Spin kit for Soil	116560200-CF	MP Biomedicals
	GenepHlow, Gel/PCR Kit	DFH100	Geneaid
	Genomic DNA (Clean & Concentrator-10)	2152687	ZYMO Research
Mikroskop	Leica DM6000 B		Leica Microsystems
Mikroskop Kamera	Leica DFC365 FX		Leica Microsystems
Objektträger	geschliffen 90° L 76 x W 26 mm, Dicke 1mm	H869.1	Roth
pH Elektrode	SevenExcellence		Mettler Toledo
Pipetten			Eppendorf
Pipettenspitzen			VWR International
Röhrchen	Balch-type	CLS-4209-10	Chemglass
Rührer	Vortex-Genie 2 MR 3000		Scientific Industries Heidolph
Serumflaschen	Volumen 10 mL Volumen 100 mL Volumen 250 mL		Frontis Energie

Spannungsquelle	3645A DC Source Power Supplies		Array Elektronik
Spritzen	Omnifix Luer 5 mL	4616057V	B. Braun
	Omnifix Luer 20 mL	4616200V	B. Braun
	Omnifix F Solo 1 mL	9161406V	B. Braun
Spritzenfilter	Rotilabo CME, 0,22 µm	KH54.1	Roth
	PTFE Roth	KC76.1	Roth
Sicherheitswerkbank	LaminAir HB2448		Heraeus Instruments
Stopfen	Blauer Butylkautschuk Stopfen	CLS-4209-14	Chemglass
Thermocycler	T-Gradient		Biometra
Thermomixer	Thermomixer comfort		Eppendorf
Vakuumpumpe	Divac 2,2L		Leybold
Waagen	LC 12001P		Sartorius
	APX-200		Denver Instrument
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R		Eppendorf
	6K15		Sigma

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien, welche in der Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer	Reinheit	Verwendung
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth	2189.2	≥ 99%, p.a.	Makroelemente
NaCl	Roth	3957.1	≥ 99,5%, p.a.	
NH ₄ Cl	Roth	P726.1	≥ 99,5%, p.a.	Spurenelemente
KCl	Roth	6781.3	≥ 99,5%, p.a.	
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth	T886.1	≥ 98%, p.a.	Spurenelemente
(NaPO ₃) x	Merck	1.065.291.00 0	Reinst.	
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich	31650	≥ 98%, p.a.	Spurenelemente
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	Roth	T881.3	≥ 99%, p.a.	
H ₃ BO ₃	Roth	6943.2	≥ 99%, p.a.	Spurenelemente
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck	2733	p.a.	
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	Roth	2604.1	≥ 99%, p.a.	Spurenelemente

CoCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth	T889.2	≥ 99%, p.a.	
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck	1.067.170.250	≥ 98%, p.a.	
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	Merck	K15715507	≥ 99%, p.a.	
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	Roth	0274.1	≥ 99,5%, p.a.	
Fe-(III)-Cl ₂ x 6 H ₂ O	Roth	P742.1	≥ 99%, p.a.	
Biotin	Serva	TT614914	≥ 98,5%	Vitamin-Lösung
Folsäure	Merck	3984		
Pyridoxinhydrochlorid	Merck	7527	≥ 99,5%	
Riboflavin	Merck	7609	99%	
Thiamin-HCl	Sigma	T-4625		
Nicotin Säure	Merck	6817	≥ 99,5%	
D-Ca Pantothenate	Merck	2316		
Vitamin B12	Serva	38310	pure	
p-Aminobenzoessäure	Merck	822312	≥ 99%	
Liposäure	Merck	K17810345		
Resazurin	Serva	34226	p.a.	Resazurin-Lösung
Imidazol	Roth	3899.2	≥ 99%, p.a.	Imidazol-Lösung
				pH-Puffer
Cysteine-HCL Monohydrat	Merck	1.028.390.100	≥ 99%, p.a.	Fe-Cystein-Lösung
Fe-(II)-Citrat	Dr. Paul Lohmann	29181500	chem. Rein	
Na ₂ S x H ₂ O	Fluka	14738-250G	59 - 65%	Natriumsulfid-Lösung
Tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O	Fluka	71403	≥ 99,5%, p.a.	Titan-Citrat-Lösung
15%iges Titan-III-Chlorid	Merck	1.107.890.001	p.a.	
Ampicillin Natriumsalz	Roth	HP62.1	≥ 99%	Antibiotika-Lösung
Kanamycin	Roth	T832.1	≥ 750 I.U/mg	
Nalidixinsäure	Roth	CN32.1	≥ 99%, p.a.	
Streptomycin	Roth	HP66.1	≥ 720 I.E/mg	
Vancomycin	Roth	0242.2	≥ 900 U/mg	
DABCO	Roth	0718.2	≥ 99%	DABCO-Lösung
Methyl cellulose	Sigma-Aldrich	M0262-100G	-	Methylcellulose-Lösung
Immersionsöl	Roth	X899.2	-	Mikroskop
Tris-HCL	AppliChem	A3452,0250	≥ 99%	pH-Puffer
HEPES	Roth	6763.1	≥ 99,5%	
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Roth	9143		sonstiges
GeneRuler 1 kb	Thermo Scientific	SM0311	-	DNA-Elektrophorese

DNA Loading Dye	Thermo Scientific	R1151	-	
Agarose	Biozym Scientific	850180	-	
Rotiphorese 50x TAE Puffer	Roth	CL86.1	-	
Hefeextrakt	Chemsolute	92.570.500	-	Medium
SYBR Safe	Thermo Scientific	S33102	-	PCR
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific	EP0702	-	
MgCl ₂	Thermo Scientific	AB0359	-	
dNTP Mix (10 mM each)	Thermo Scientific	R0192	-	
Wasser, Nuklease frei, autoklaviert	Roth	T143.3	-	BioScience
10X DreamTaq, Green Puffer	Thermo Scientific	B71	-	

3.3 Primer

In Tabelle 3 sind die verwendeten Primer aufgeführt. Der Primer A915r wurde für die Sanger-Sequenzierung verwendet. Die weiteren Primer wurden zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'	Länge	Anwendung für	Verwendung
A915r	TGCTCCCCCGCCAATTCCT	19	Archaeen	Sequenzierung
A1000r	GCCATGCACYWCYTCTC	17	Archaeen	PCR
A337f	TAYGGGGYGCAGCAG	15	Archaeen	PCR
Bact-1492r	TACGGYTACCTTGTTA-CGACTT	22	Bakterien	PCR
Bact-27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	Bakterien	PCR

3.4 Verwendete Stämme

Zusätzlich zu den isolierten Stämmen wurden zwei Stämme von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in dieser Arbeit genutzt. Diese Stämme sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Archaeenstämmen von der DSMZ

Name	Domaine	DSMZ Nr.	Type strain
<i>Methanobacterium congolense</i>	Archaea	7095	yes
<i>Methanobacterium formicicum</i>	Archaea	1535	yes (Neotype strain)

3.5 Medienbestandteile

Makroelemente, 1000 mL

Die Lösung der Makroelemente bildet die Grundlage des HAW Mediums. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Bestandteile der Makroelemente des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0	1,0
NaCl	30,0	30,0
NH ₄ Cl	18,6	18,6
KCl	64,1	64,1
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5	0,5

Stammlösung Spurenelemente, 500 mL

Die Archaeen benötigen neben den Makroelementen auch sogenannte Spurenelemente, wie Nickel, Kobalt, Wolfram oder Molybdän fürs Wachstum (Boone 2015). Diese Metallionen werden unter anderen in den Enzymen der Archaeen benötigt und sind daher essentiell (Cavicholi 2011).

Tabelle 6: Bestandteile der Stammlösung der Spurenelemente des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
(NaPO ₃) _x	102	1,02
ZnCl ₂	1	0,01
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1	0,001
H ₃ BO ₃	0,01	0,0001
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2	0,002
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,1	0,001
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,3	0,003
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,3	0,003
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,2	0,002
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1	0,001
Fe-(III)-Cl ₂ x 6 H ₂ O	2	0,02

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,6 eingestellt und auf 500 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde sterilfiltriert und bei Raumtemperatur in einer Schottflasche gelagert.

Vitamin Stammlösung, 500 mL

Die Zusammensetzung der Vitamin Stammlösung ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Bestandteile der Vitamin Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in µmol/L	im HAW Medium in nmol/L
Biotin	8,2	82
Folsäure	4,53	45,3
Pyridoxinhydrochlorid	48,6	486
Riboflavin	13,3	133
Thiamin-HCl	14,8	148
Nicotin Säure	40,6	406
D-Ca Pantothenate	10,5	105
Vitamin B12	0,147	1,47
p-Aminobenzoessäure	36,5	365
Liposäure	24,2	242

Die Einwaagen wurden in demineralisiertem Wasser gelöst und auf 500 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und in einer Schottflasche bei 4 °C gelagert. Die

Schottflasche wurde mit Aluminiumfolie umwickelt. Von der Lösung aus der Schottflasche wurden 60 mL abgenommen, sterilfiltriert und in eine sterile, anaerobisierte Serumflasche überführt und bei 4 °C gelagert. Das Volumen für die Herstellung des HAW Mediums wurde aus dieser Serumflasche entnommen.

Resazurin Stammlösung, 100 mL

Die Zusammensetzung der Resazurin Stammlösung ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Bestandteile der Resazurin Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
Resazurin	4	0,008

Das eingewogene Resazurin wurde in demineralisiertem Wasser gelöst und auf 100 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Imidazol Stammlösung, 100 mL

Imidazol wurde als Puffer verwendet. Die Konzentration der Imidazol Stammlösung ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Bestandteile der Imidazol Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in mol/L	im HAW Medium in mol/L
Imidazol	2	0,02

Das eingewogene Imidazol wurde in demineralisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt und auf 100 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Fe-Cystein Stammlösung, 50 mL

Die Zusammensetzung der Fe-Cystein Stammlösung ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Bestandteile der Fe-Cystein Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösungen	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
Cysteine-HCL Monohydrat	212,5	0,425
Fe-(II)-Citrat	5	0,01

Die Bestandteile wurden in demineralisiertem Wasser gelöst und auf 50 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Natriumsulfid Stammlösung, 10 mL

Die Zusammensetzung der Natriumsulfid Stammlösung ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Bestandteile der Natriumsulfid Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösung	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
Na ₂ S x H ₂ O	250	0,5

Die Einwaage wurde in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde mittels Sterilfiltration in eine anaerobisierte Serumflasche überführt.

Titan-Citrat Stammlösung, 50 mL

Die Bestandteile der Titan-Citrat Stammlösung und deren Konzentration ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Bestandteile der Titan-Citrat Stammlösung des HAW Mediums

Substanz	Konzentration der Lösung	
	in Stammlösung in mmol/L	im HAW Medium in mmol/L
Tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O	200	0,2
15%iges Titan-III-Chlorid	83,9	0,0839

Die Bestandteile wurden in 50 mL demineralisiertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die Serumflasche unter sterilen Bedingungen verschlossen und anaerobisiert.

Antibiotika Lösungen

Das verwendete HAW Medium ist für das Wachstum von Archaeen ausgelegt, wobei Kohlenstoffdioxid die einzige Kohlenstoffquelle ist. Lediglich Mikroorganismen, welche in der Lage sind, dieses zu verwenden, können in diesem Umfeld wachsen. Bakterien haben eine höhere Wachstumsrate als Methanogene und würden ohne Inhibierung die Methanogenen bei der Isolierung verdrängen (Boone 2015). Aus diesem Grund wird dem HAW Medium Antibiotika der Klassen β -lactam Antibiotika, Glycopeptide, Aminoglycoside und Fluoroquinolone hinzugegeben. Die Wirkung dieser Antibiotika richtet sich gegen Bakterien und haben nahezu keinen Effekt bzw. einen weit geringeren Effekt auf Archaeen (Cheng et al. 2018; Kohanski et al. 2010; Hilpert et al. 1981). Die verwendeten Antibiotika und deren Konzentration ist in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Bestandteile und Konzentrationen der Antibiotika Lösungen für das HAW Medium

Substanz	Konzentration der Lösung		
	Stammlösung in mg/mL	Arbeitslösung $\mu\text{g/mL}$	HAW Medium $\mu\text{g/mL}$
Ampicillin	500	5000	50
Kanamycin	150	150	15
Nalidixinsäure	250	2500	25
Streptomycin	50	500	5
Vancomycin	100	1000	10

Von jedem Antibiotikum wurde eine Stammlösung, der in Tabelle 13 aufgeführten Konzentration, hergestellt. Es wurden Aliquote mit 0,1 mL der einzelnen Antibiotikum Stammlösung in Mikroreaktionsgefäßen (Mrg) überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um die Arbeitslösung herzustellen, wurden die fünf Stammlösungen in 9,5 mL PBS gelöst. Diese Arbeitslösung wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.6 Puffer und Gebrauchslösungen

DABCO, 100 mL

Die Fluoreszenz von fluoreszierenden Stoffen nimmt ab, wenn diese angeregtem Licht ausgesetzt sind. Um diesen Prozess des Verblässens (engl. *fading*) zu verlangsamen, werden Anti-Fading Reagenzien, z. B. DABCO, verwendet (Longin et al. 1993). Die Konzentration des verwendeten Anti-Fading Reagenz ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Konzentration der DABCO Lösung

Substanz	Konzentration der Lösung in g/L
DABCO	50

Das eingewogene DABCO wurde in 100 mL PBS gelöst und autoklaviert. Die Schottflasche mit der Lösung wurde mit Aluminiumfolie umwickelt.

Methylcellulose Lösung, 100 mL

Die Methylcellulose Lösung wurde zur Beschichtung der Objektträger verwendet und ist in ihrer Konzentration in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Konzentration der Methylcellulose Lösung

Substanz	Konzentration der Lösung in g/L
Methylcellulose	20

Die Methylcellulose wurde in 100 mL demineralisiertem Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

Tris-HCl Puffer, 50 mL

Der Tris-HCl Puffer wurde für die pH-Kurve verwendet. Die Konzentration des Tris-HCl Puffers ist in Tabelle 16 angegeben.

Tabelle 16: Konzentration der Tris-HCl Puffer für die pH Kurve

Substanz	Konzentration des Puffers in mol/L
Tris-HCL	1

Das eingewogene Tris wurde in demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert bei 37 °C eingestellt. Es wurden drei Puffer mit den folgenden pH-Werten angesetzt:

- pH = 7,5
- pH = 8
- pH = 8,5

Nachfolgend wurden die Puffer jeweils auf 50 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Diese Puffer wurden sterilfiltriert und jeweils in eine anaerobisierte Serumflasche überführt. Diese Serumflasche wurde anschließend erneut anaerobisiert, um den im Puffer gelösten Sauerstoff zu entfernen. Die Puffer wurden bei 37 °C gelagert.

Imidazol Puffer, 50 mL

Für die pH-Kurve wurden ebenfalls Imidazol als Puffer verwendet. Die Konzentration dieser Puffer ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Konzentration der Imidazol Puffer für die pH Kurve

Substanz	Konzentration des Puffers in mol/L
Imidazol	1

Die Imidazol Puffersysteme wurden wie die Tris-HCl Puffer angesetzt und gelagert. Es wurden vier Imidazolpuffer hergestellt. Diese hatten die folgenden pH-Werte:

- pH = 6
- pH = 6,5
- pH = 7
- pH = 7,5

HEPES Puffer, 25 mL

Neben den Imidazol und den Tris-HCL Puffern wurden noch vier Pufferbereiche mit HEPES hergestellt, deren Konzentration in Tabelle 18 angegeben ist.

Tabelle 18: Konzentration der HEPES Puffer für die pH Kurve

Substanz	Konzentration des Puffers in mol/L
HEPES	1

Die vier Pufferbereiche wurden wie die Imidazol und Tris-HCL Puffer hergestellt und gelagert. Die vier HEPES Puffersysteme hatten die folgenden pH-Werte:

- pH = 6,5
- pH = 7
- pH = 7,5
- pH = 8

3.7 Software

Für die Aufnahme und Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde die Image-Pro plus MDA Software der Version 7.0.1.658 für Windows XP/Vista von der Firma Media Cybernetics verwendet. Zur Bearbeitung der Sanger-Sequenzdaten wurde Software FinchTV Version 1.4.0 von Geospiza genutzt.

4 Methoden

4.1 Herstellung HAW Medium

Die Zusammensetzung und Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen sind im Abschnitt 3.5 aufgeführt. Die Herstellung für einen Liter HAW Medium ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Makroelement-Lösung diente als Grundlage des HAW Mediums. Anschließend wurden 10 mL der Imidazol Stammlösung, 10 mL Traceelement Stammlösung und 2 mL der Resazurin Stammlösung hinzugegeben (siehe Abbildung 3). Durch die Zugabe von Resazurin verfärbte sich das HAW-Medium bläulich. Im Anschluss wurde der pH-Wert auf 7,6 eingestellt und das Volumen auf 983 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Danach mussten jeweils 98,3 mL in 250 mL Serumflaschen abgefüllt werden. Der nächste Schritt begann mit der Versiegelung der Serumflaschenöffnung mit Aluminiumfolie und endete mit dem Autoklavieren der Serumflaschen. Nach dem Autoklavievorgang wurden unter der Sicherheitswerkbank die Aluminiumfolie von den Serumflaschen entfernt. Die Versiegelung erfolgte mittels eines Gummistopfens. Anschließend daran wurden die Serumflaschen gebördelt und anaerobisiert. Die Lagerung der Serumflaschen bis zur Verwendung fand bei Raumtemperatur statt. Vor der Verwendung des HAW Mediums musste diesem 1 mL Vitamin Stammlösung und 1 mL der Antibiotika Arbeitslösung hinzugefügt werden. Nachfolgend wurde dem HAW Medium 0,2 mL der Fe-Cystein Stammlösung, 0,2 mL der Natriumsulfid Stammlösung und 0,1 mL der Titan-Citrat Stammlösung hinzugegeben (siehe Abbildung 3). Durch das Titan-Citrat wird das Resazurin ein weiteres Mal reduziert, wodurch sich die Färbung des HAW Mediums von pink zu farblos ändert. Resazurin dient in diesem Zustand als Redoxindikator. Bei Kontakt mit Sauerstoff wird der Indikator oxidiert und färbt sich von farblos zu pink.

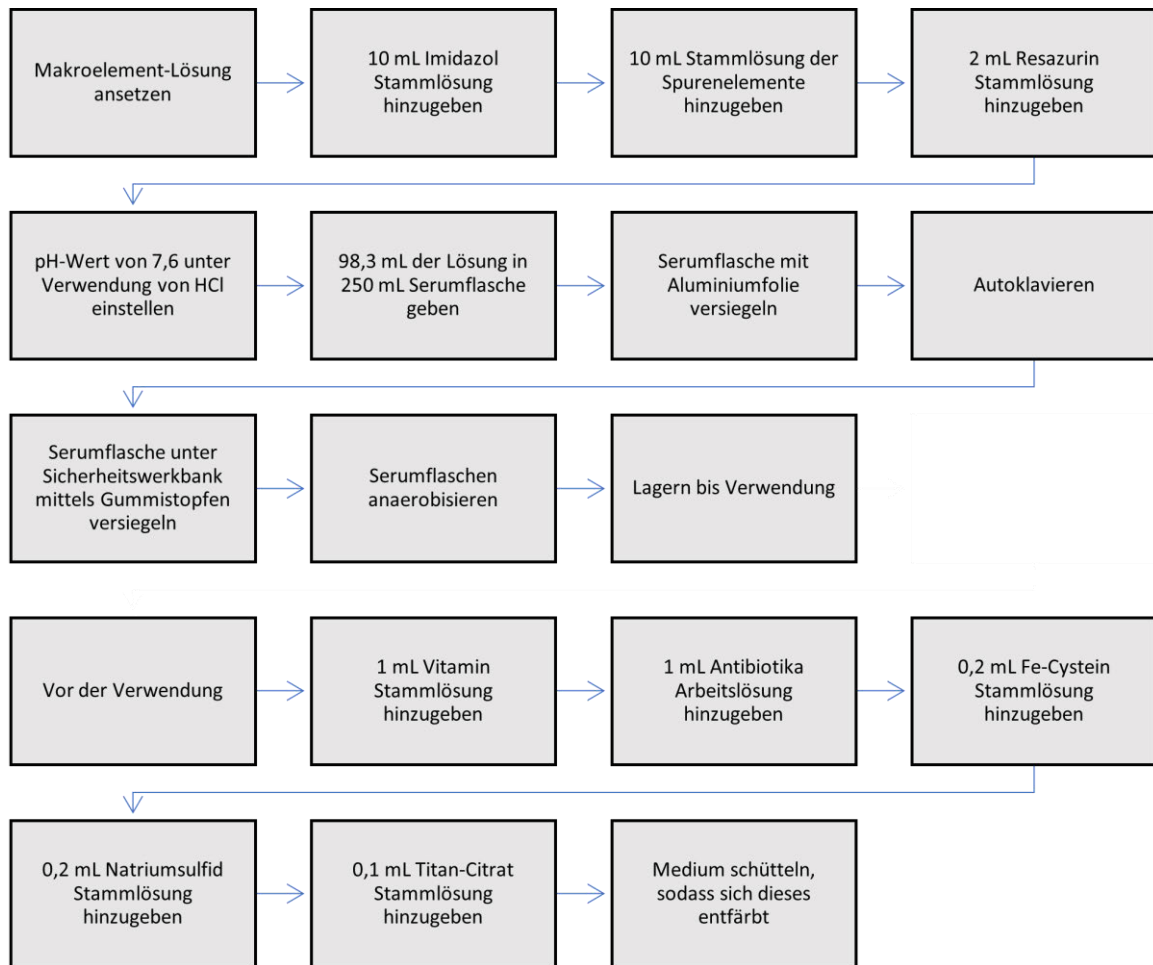


Abbildung 3: Herstellung des HAW Mediums

4.2 Anaerobisierung

Methanogene Archaeen benötigen strikte anaerobe Wachstumsbedingungen. Deswegen müssen alle Gefäße anaerobisiert werden (Cavicchioli 2011). Zum Einsatz kamen anaerobe Kulturröhrchen des Typs „Balch“ und Serumflaschen verschiedener Volumina. Die Versiegelung dieser Gefäße erfolgte mittels eines blauen Butyl Stopfens und durch eine Aluminiumkappe. Anschließend wurde die Luft durch eine Vakuumpumpe entzogen und durch 1,5 bis 2 bar absolut Stickstoff ersetzt. Die Kulturröhrchen wurden danach autoklaviert.

4.3 Beschichtung der Objektträger

Damit die Zellzahl mittels mikroskopischer Aufnahmen bestimmt werden kann, muss ein definiertes Volumen vorliegen, welches auf dem Objektträger fixiert wird. Hierfür wurde ein dünner Film Methylcellulose aufgetragen. Der Prozess ist in Abbildung 4 A dargestellt. Für die Beschichtung wurden die Objektträger in die Fassung gelegt, welche in Abbildung 4 B und C zu sehen ist. Anschließend wurden 300 µL der Methylcellulose Lösung am linken Rand verteilt.

Die Verteilung des Tropfens erfolgte mit dem Stab in einer durchgehenden Bewegung von links nach rechts. Dabei ergab sich eine 0,2 mm dicke Methylcellulose Schicht. Der beschichtete Objektträger wird bei 50 °C getrocknet. Durch die Beschichtung entsteht eine Oberfläche, auf der die Proben fixiert werden können.

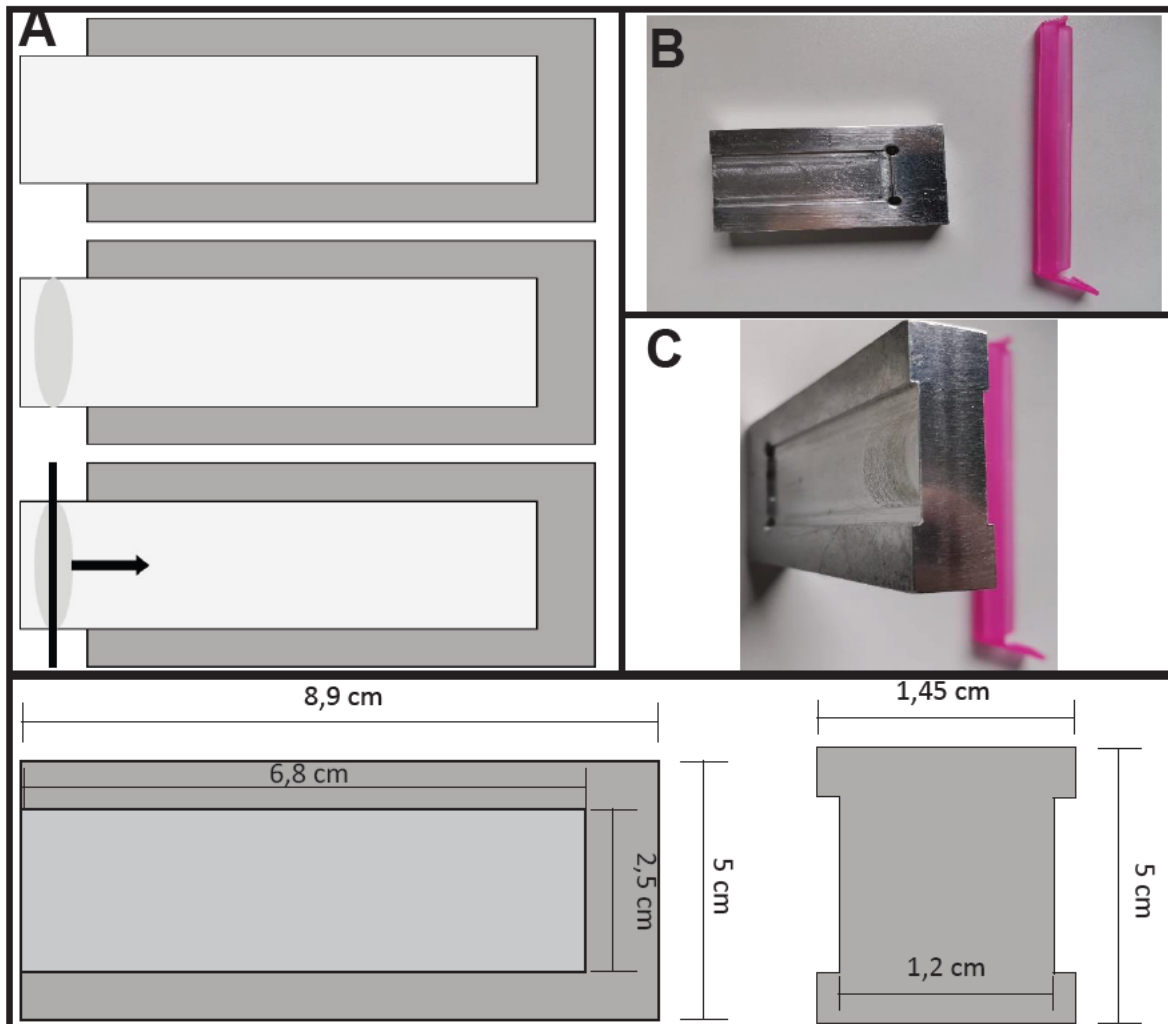


Abbildung 4: Beschichtung der Objektträger. A: Verfahren der Beschichtung. B: Draufsicht der Fassung zur Beschichtung. C: Frontansicht der Fassung zur Beschichtung. D: Maße der Fassung zur Beschichtung

4.4 Anreicherung der Proben für die quantitative Bildanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellzahl der Proben wurde durch eine computergestützte, quantitative Bildanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie (QMF) bestimmt. Proben mit geringer Zellzahl sollten angereichert werden. In der Abbildung 5 ist das Verfahren zur Konzentrierung der Proben dargestellt. Zu nächst wird von einer gut homogenen Lösung 2 mL entnommen und in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß (Mrg) überführt. Der Inhalt des Mrg wurde mindestens dreimal invertiert, um das Absetzen von Zellen zu verhindern. Anschließend wurde 1 mL in ein 1,5 mL Mrg überführt. Der

verbliebene Inhalt konnten für weitere Analytik genutzt werden. Das 1,5 mL Mrg wurde für 5 Minuten mit 10 000 xg bei 4 °C zentrifugiert. 900 µL des Überstandes wurden verworfen. Zu dem verbleibenden Überstand und dem Pellet wurden 100 µL der 5 %igen DABCO Lösung hinzugegeben und resuspendiert.

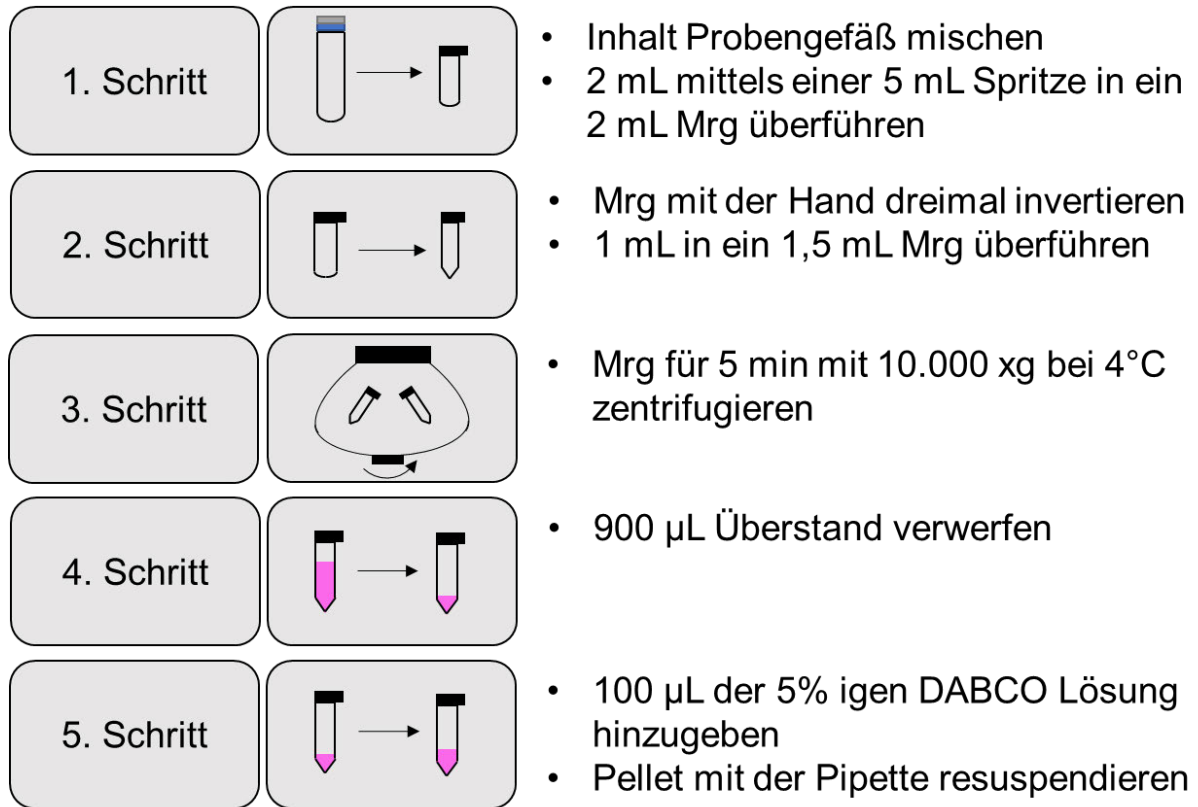


Abbildung 5: Anreicherungsverfahren der Proben für die Auswertung der Zellzahl durch die computergestützte, quantitative Bildanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

4.5 Zellzahlbestimmung mittels Mikroskopie

Zum Mikroskopieren wurden die angereicherten Proben aus Abschnitt 4.4 verwendet. Einerseits kann die Autofluoreszenz der Methanogenen verwendet, andererseits können die Methanogenen mit SYBR Green I angefärbt werden. SYBR Green I interkaliert mit der doppelsträngige DNA. Dadurch können neben den Methanogen ebenfalls/gleichzeitig die Begleitorganismen angefärbt werden (Dragan et al. 2012).

Bei der Bestimmung der Zellzahl mittels Autofluoreszenz wurden 10 µL von der Lösung, siehe Abschnitt 4.4 mittig auf dem Deckgläschen platziert (siehe Abbildung 6, Schritt 1). Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 5 µL der Lösung aus Abschnitt 4.4 mit 5 µL SYBR GREEN I (1000-fach verdünnt) auf dem Deckgläschen gemischt. Die Deckgläschen wurden jeweils im 45 ° Winkel auf die beschichteten Objektträger angesetzt und auf die Objektträger

fallen gelassen (siehe Abbildung 6, Schritt 2). Anschließend wurde jeweils einer der Objektträger unters Mikroskop gelegt und das 40x Objektiv ausgewählt. Die Mikroorganismen (Mo's) wurden im Phasenkontrast fokussiert (siehe Abbildung 6, Schritt 3). Nachfolgend wurde der CFP Filterwürfel der Firma Leica (Anregung 426 – 446 nm, Emission 460 – 500 nm) für die Autofluoreszenz verwendet, siehe Abbildung 6, Schritt 4. Für die Anfärbung mit SYBR GREEN I wurde der L5 Filterwürfel der Firma Leica (Anregung 498 nm, Emission 522 nm) genutzt (siehe Abbildung 6, Schritt 4). Durch die Kamera entstand ein weiterer 10xfach Zoom. Nach einer Aufnahme erfolgte jeweils ein Abschnittwechsel. Für eine ausreichend große Menge zur statistischen Auswertung sind in etwa 20 Aufnahmen nötig. Die Aufnahmen wurden zur mikrobiellen Zellzahlbestimmung mit den eigens an der HAW entwickelten Algorithmen zur Auswertung digitaler Bilder über die Bildanalysesoftware Image-Pro® Plus Version 7.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD) ausgewertet (Scherer et al. 2012; Kim et al. 2014).

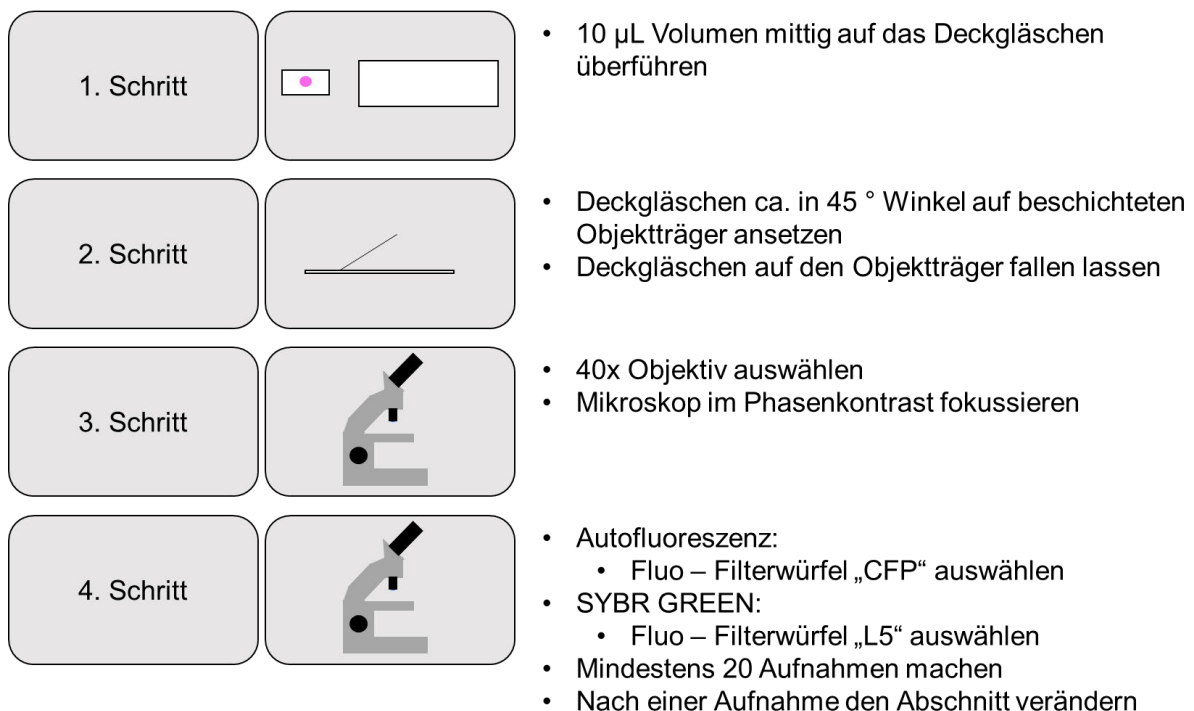


Abbildung 6: Mikroskopie der Proben mittels Autofluoreszenz und SYBR GREEN I

4.6 Probennahme der Umweltproben

Insgesamt wurden 16 Umweltproben genommen (siehe Tabelle 19). Die Proben stammen aus einem Güllebecken, verschiedene Flusssedimenten und der Biogasanlage Reitbrook. Die Proben aus der Biogasanlage Reitbrook wurden aus dem Hauptfermenter und dem Nachgärer entnommen. Der Nachgärer ist dem Hauptfermenter nachgeschaltet. Der erste Zersetzungs-

prozess dauert ca. 6 Wochen. Dabei lagern sich ausgegorene Anteile am Boden des Hauptfermenters ab. Diese werden in den Nachgärer gepumpt. (Stute 2015) Die Biogasanlage verwendet neben dem Hauptsubstrat Mais, auch Rindergülle, Pferdemist und Gras. Die Betriebstemperaturen liegen zwischen 40 und 45 °C. Diese Proben wurde am 17.06.2021 gezogen bei einer Betriebstemperatur von 44 °C. Die beiden Gülleproben stammen von Rindern.

Tabelle 19: Parameter der verwendeten Umweltproben

Probentyp	Probenort	Datum Proben- nahme	Koordinaten	Bezeich- nung
Biogasanlage	Nachgärer	17.06.2021	N 53.461389 E 10.163806	NR
	Hauptfermenter	17.06.2021	N 53.461389 E 10.163806	HR
Güllebecken	Bührings	31.05.2021	N 53.359117 E. 10137990	B
	Ruschmeyer	31.05.2021	N 53.381510 E. 10121315	R
Sediment	Mühlenbach	31.05.2021	N 53.358223 E. 10118770	M
		10.06.2021	N 53.351627 E. 10106630	MI
		10.06.2021	N 53.351627 E. 10106630	MII
		10.06.2021	N 53.351626 E. 10.106666	MIII
	10.06.2021	N 53.351626 E. 10.106666	MIV	
	Mühlenberger Loch	17.06.2021	N 53.54623 E 9.81921	ML
	Schweensand	17.06.2021	N 53.470472 E 10.001008	Sc
	Stettiner Haff (St. A)	19.07.2021	N 53.771583 E 14.010600	SA
	Stettiner Haff (St. B)	20.07.2021	N 53.785567 E 14.077633	SB
	Stettiner Haff (St. C)	20.07.2021	N 53.767983 E 14.129067	Stc
	Peenestrom	22.07.2021	N 53.884833 E 13.865450	PA
		22.07.2021	N 54.016483 E 13.846550	PB

4.7 Isolierung

Für die Isolierung wurde die Umweltprobe vorverdünnt. Dabei wurden 5 g der Probe mit 10 mL PBS gemischt. Mit dieser Vorverdünnung wurden zwei Isolierungsstrategien durchgeführt. Bei dem ersten Ansatz wurde eine Spannung angelegt (siehe Abbildung 8), bei dem zweiten wurde keine Spannung angelegt. Die Durchführung des Spannungsansatz erfolgte in einer mikrobiellen elektrolytischen Zelle (MEC) (siehe Abbildung 7). In diese MEC wurden 0,7 mL der Vorverdünnung und 6,4 mL des HAW Mediums überführt. Anschließend wurde die MEC mit 1 bar CO₂ begast und kontinuierlich eine Spannung von 0,5 Volt angelegt. Nach einer Woche wurde die MEC unter sterilen Bedingungen geöffnet. Es wurde ein Stück von der Kathode abgebrochen und in eine Serumflasche überführt. Diese wurde mit einem Gummistopfen versiegelt und anaerobisiert. Danach wurde die Serumflasche mit 6,4 mL Medium aufgefüllt. Zusätzlich erfolgte eine Begasung der Serumflasche mit 2 bar H₂: CO₂ (80:20) Gas (siehe Abbildung 8, Schritt 2).

Zudem wurde die alte Anode durch eine neue Anode ersetzt und mit der ursprünglichen Kathode in eine neue Serumflasche überführt. Dieser MEC wurden 6,4 mL HAW Medium hinzugegeben. Darüber hinaus wurde die MEC mit 1 bar CO₂ begast und es wurde eine kontinuierliche Spannung von 0,5 Volt angelegt (siehe Abbildung 8, Schritt 1).

Im Anschluss wurden 0,7 mL des Mediums der ursprünglichen MEC zusammen mit 6,4 mL HAW Medium in eine Serumflasche pipettiert. Diese Serumflasche wurde mit 2 bar H₂: CO₂ (80:20) Gas begast (siehe Abbildung 8, Schritt 3). Die Wiederholung dieses Vorgehens erfolgte jede Woche, solange methanogene Archaeen im Medium, des jeweiligen Ansatzes erkennbar waren.

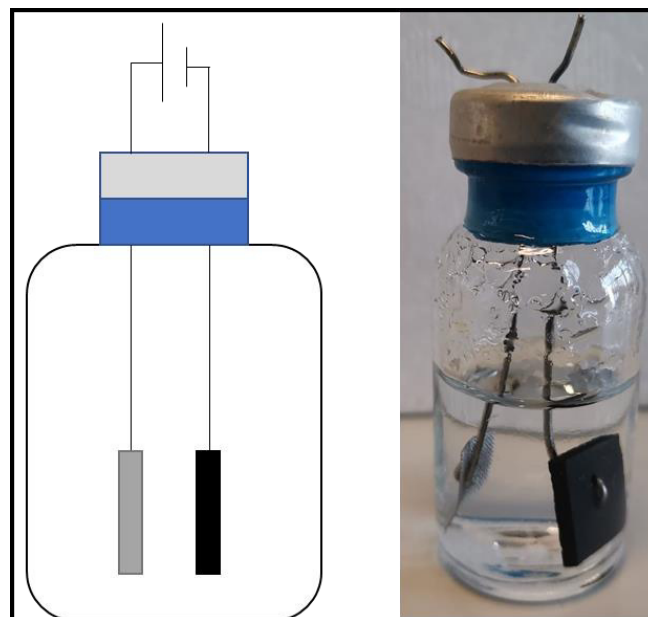


Abbildung 7: mikrobielle elektrolytische Zelle. Links eine schematische Darstellung und rechts eine Aufnahme.

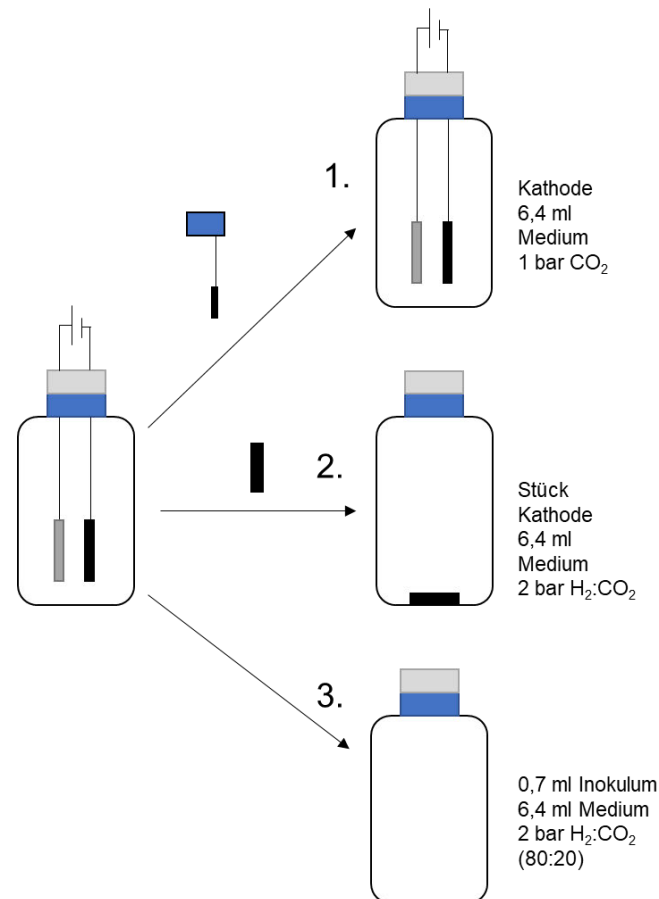


Abbildung 8: Vorgehen bei der Isolierung mit Spannung. Beim ersten Schritt wird die Kathode der MEC in eine neue MEC überführt. Beim zweiten Schritt wird ein Stück der Kathode überführt. Zusätzlich wird H₂: CO₂ (80:20) anstelle von CO₂ verwendet. Beim dritten Schritt wird der Ansatz in der MEC als Inokulum verwendet. Zusätzlich wird H₂: CO₂ (80:20) anstelle von CO₂ verwendet.

Beim zweiten Isolierungsansatz wurden 0,7 mL der Vorverdünnung zusammen mit 6,4 mL HAW Medium in ein Kulturröhrchen überführt. Dieses wurde mit 2 bar H₂: CO₂ (80:20) Gas begast (siehe Abbildung 9). Pro Vorverdünnung erfolgte eine dreifache Wiederholung dieses Vorgangs. Nach einer Woche wurde eine Probe aus jedem Kulturröhrchen unter dem Mikroskop auf methanogene Archaeen untersucht. Das Kulturröhrchen, welches die meisten methanogenen Archaeen aufwies, wurde als Vorkultur für den weiteren Isolierungsschritt ausgewählt. Wiesen alle drei Kulturröhrchen kaum Wachstum auf, wurde erneut 2 bar H₂: CO₂ (80:20) Gas hinzugegeben und die Kulturen wurden eine weitere Woche kultiviert.

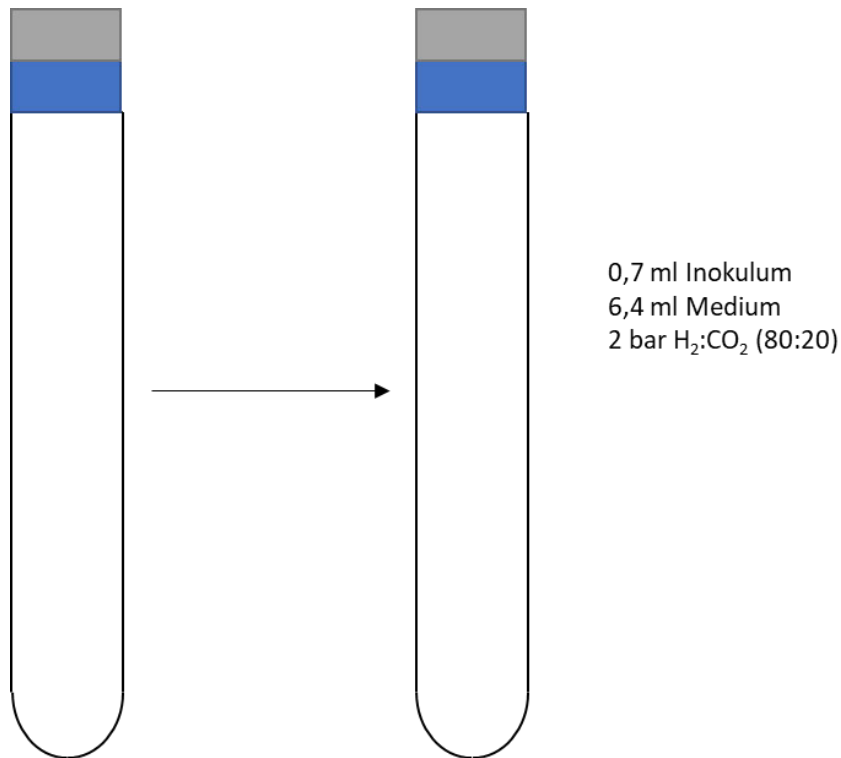


Abbildung 9: Isolierungsschritt der Isolierungsstrategie ohne Spannung

4.8 Spannungsuntersuchung

Es sollte der Einfluss der Spannung auf den Isolierungserfolg untersucht werden. Zu Beginn erfolgte die Vorbereitung der Elektroden für die MEC. Diese wurden 1 h in Aceton mittels Ultraschalles behandelt und anschließend für 1 h in demineralisiertem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden diese für 50 min bei 50 °C getrocknet und bis zur Verwendung im Exsikkator gelagert. Die Gummistopfen wurden mit einer Kathode und einer Anode ausgestattet und damit ist eine 10 mL Serumflasche versiegelt und anaerobisiert worden. Die Befüllung der MECs erfolgte mit 6,4 mL HAW Medium und 0,7 mL Kultur. Ausgehend von diesen befüllten MECs wurden vier Ansätze mit jeweils drei MECs vorbereitet. Beim ersten Ansatz wurden die drei MECs mit 2 bar H₂: CO₂ (80:20) begast. Beim zweiten Ansatz wurde zusätzlich eine Spannung von 0,5 Volt angelegt. Beim dritten Ansatz wurden die drei MECs mit 2 bar CO₂ begast. Außerdem wurde mittels eines Netzteils eine Spannung von 0,5 Volt angelegt. Beim vierten Ansatz wurden die drei MECs mit 2 bar N₂ begast. Zusätzlich wurde eine Spannung von 0,5 Volt angelegt. Die Kultivierung aller MECs erfolgte bei 40 °C. Nach der Inkubation wurde die Zellzahl und der pH-Wert der MECs untersucht. Insgesamt wurden drei Messungen pro MEC durchgeführt, zum Beginn des Versuchs, nach einer Woche und nach zwei Wochen Laufzeit. Die Proben wurden, wie in 4.4 beschrieben, vorbereitet. Es wurde sowohl die Auto-fluoreszenz als auch die Gesamtzellzahl mittels SYBR Green I (siehe 4.5) gemessen.

4.9 Molekularbiologische Untersuchungen

4.9.1 DNA-Aufschluss

Es wurden 10 mL der jeweiligen Kultur entnommen und bei $> 20.000 \times g$ bei $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in sterilem PBS in einem Volumen von 1 mL resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Mrg überführt. Dieses wurde für 10 min bei $> 20.000 \times g$ und $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in $400 \text{ }\mu\text{L}$ PBS. Diese Suspension wurde mit Hilfe des Fast-DNA™ Spin kit für Erde aufgeschlossen, gemäß der Anleitung des Kites. Die Reinigung und Aufkonzentrierung der aufgeschlossenen DNA erfolgte mit dem Genomic DNA Clean & Concentrator™ kit. Nachfolgend wurde zur Kontrolle eine Elektrophorese durchgeführt (siehe 4.9.2) und die DNA-Konzentration mittels Nanodrop ermittelt.

4.9.2 Gelelektrophorese

Um den Erfolg des DNA-Aufschlusses und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu verifizieren wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1% iges Agarosegel gegossen. Hierzu wurde durch das Aufkochen $0,8 \text{ g}$ Agarose in 80 g TAE Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde $8 \text{ }\mu\text{L}$ Syber Safe hinzugegeben. Die Probenkammern wurden mit jeweils $8 \text{ }\mu\text{L}$ Probe ($5 \text{ }\mu\text{L}$ DNA-Probe und $3 \text{ }\mu\text{L}$ Ladepuffer) befüllt. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA Molecular Weight Marker 1 kb mit aufgetrennt.

4.9.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Zusammensetzung des verwendeten PCR Ansatzes ist Tabelle 20 und die Parameter des PCR Programms in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Bestandteil	Volumen (in μL)
PCR-Wasser	35
DreamTaq Green Puffer	5
dNTP-Mix	6
MgCl ₂	1
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Taq-DNA-Polymerase	0,25
DNA-Template	1
Gesamt	50,25

Tabelle 21: Parameter des verwendeten PCR Programmes

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturation	95	300	1. Zyklus
Denaturation	95	50	
Annealing	51	50	30 Zyklen
Elongation	72	50	
Extension	72	480	Abschluss
Endtemperatur	10		

4.9.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt. Hierfür wurden 10 μL des PCR-Produktes mit 4 μL (5 mM) des Primers A915r eingeschickt. Die zurückerhaltenen Elektropherogramme wurden manuell korrigiert und zugeschnitten. Dabei wurden Sequenzbereiche am Anfang und Ende (ca. 10 bp) entfernt, da diese kein eindeutiges Signal lieferten. Dafür wurde die Software FinchTV verwendet. Die Sequenzen wurden mittels der BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center für Biotechnology Information) ausgewertet.

4.10 Morphologie

Die Proben wurden mit dem Mikroskop Leica DM6000B untersucht. Die Aufnahmen wurden mit der Mikroskopkamera Leica DFC365 FX gemacht. Beim Phasenkontrast wurden die 10x, 40x und 100x Zoom Objektive verwendet. Die Proben wurden 1:3 mit der DABCO Lösung verdünnt (siehe Abschnitt 3.6). Anschließend wurden 10 µL der Lösung auf einen beschichteten Objektträger aufgetragen, wie in 4.5 beschrieben. Es wurden 50 Aufnahmen gemacht. Die Image - Pro plus MDA Software fasst die Methanogenen aufgrund Ihrer Länge in Gruppen zusammen.

4.11 Bestimmung physiologischer Eigenschaften

4.11.1 Temperaturoptima

Auf Grundlage der optimalen Wachstumstemperatur lassen sich Mikroorganismen in vier Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe sind die psychrophilen Mikroorganismen. Diese haben ihre optimale Wachstumstemperatur im niedrigen Temperaturbereich. Anschließend folgt der mesophile Temperaturbereich bei 27 °C. Die obere Grenze des mesophilen Bereiches liegt bei 47 °C. Danach folgt der thermophile Temperaturbereich. Von diesem lässt sich der hyperthermophile Temperaturbereich abgrenzen. Der Großteil der methanogenen Archaeen wächst im Temperaturbereich von 25 – 40 °C. Oberhalb 40 °C können weitaus weniger methanogene Archaeen wachsen (Jabłoński et al. 2015).

Für die Charakterisierung wurde eine Temperaturkurve der Organismen erstellt, um den Wachstumsbereich und die optimale Wachstumstemperatur zu bestimmen. Hierzu wurden 0,5 mL der Kultur zu 4,5 mL des HAW Mediums hinzugefügt. Die Kulturröhrchen wurden mit 0,5 bar H₂: CO₂ (80:20) begast. Pro Kultivierungstemperatur wurden drei Kulturen angesetzt. Nach dem Ansetzen wurden drei Startwerte bestimmt. Nach einer Woche wurden die Zellzahlen erneut bestimmt. Die Untersuchung beschränkte sich auf eine Temperaturspanne von 4 – 60 °C.

4.11.2 pH-Optima

Der pH-Wert beim anaeroben Abbau von Organik kann zwischen 5,5 und 8,5 liegen. Die meisten methanogenen Archaeen präferieren hingegen einen pH Bereich zwischen 6,7 und 7,4 (Balat und Balat 2009).

Das HAW Medium enthält normalerweise einen 20 mM Imidazolpuffer. Bei dem HAW Medium für die pH-Kurven wurde kein Imidazol bei der Herstellung hinzugegeben. Es wurden drei unterschiedliche pH-Kurven pro Stamm aufgenommen. Bei der ersten pH-Kurve wurden 0,5 mL Kultur und 0,5 mL Puffer zu 4 mL HAW Medium gegeben. Imidazol Puffer und Tris-HCL Puffer dienten als Puffersysteme. Bei der zweiten pH-Kurve wurden 1 mL Kultur und 0,25 mL Puffer zu 3,75 mL HAW Medium hinzugefügt. Die Puffersysteme waren ebenfalls Imidazol Puffer und Tris-HCl Puffer. Bei der dritten pH-Kurve blieb die Zusammensetzung gleich. Es wurde HEPES Puffer anstelle von Imidazol Puffer verwendet. Bei allen drei pH-Kurven wurden jeweils 3 Kulturen pro pH-Wert angesetzt. Begast wurden alle Kulturröhrchen mit 0,5 bar H₂: CO₂ (80: 20). Der Versuch begann mit der Bestimmung von drei Startwerten und endete mit einer Zellzahlbestimmung aller Kulturen nach einer Woche. Die Untersuchung beschränkte sich auf den pH-Wert Bereich von 6,0 bis 8,5.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Angereicherte Kulturen

Bei der Isolierung bzw. der Anreicherung gibt es unterschiedliche Methoden. Eine verbreitete Methode ist das Ausstreichen auf einem Selektionsmedium. Anschließend können einzelne Kolonien von der Platte genommen und weiter kultiviert werden. Diese Methode konnte innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da beim Beimpfen und bei der Kultivierung der Agarplatte strikt anaerobe Bedingungen herrschen müssen. Hierfür würde ein Anaerobier Zelt benötigt werden. Daher wurde die Methode „Dilution to extinction“ angewendet (Sun et al. 2020). Je nach Probenort bzw. der dort vorkommenden Archaeen wurden die Temperaturen des ersten Isolierungsschrittes angepasst (siehe Tabelle 22). Bei Proben mit einer hohen Zelldichte an Mikroorganismen wurde zusätzlich eine Isolierung in MECs durchgeführt (siehe 4.7). Eine erfolgreiche Isolierung mit der „Dilution to extinction“ Methode mit Proben mit einer geringen Zelldichte stellen eine erhöhte Schwierigkeit, aufgrund der geringen Zelldichte an Methanogenen, dar. Daher wurde der Fokus bei der Isolierung mit Spannung auf Proben mit hoher Zelldichte gelegt, da hier eine erfolgreiche Isolierung wahrscheinlicher ist (Sun et al. 2020). Von allen drei Kulturen einer Temperatur und Isolierungsstufe der gleichen Probe wurde die Autofluoreszenz der Methanogenen betrachtet. Wenn mehrere dieser Kulturen ungefähr die gleiche Menge an Methanogenen aufwiesen, wurden diese zusätzlich im Phasenkontrast betrachtet. Im Phasenkontrast lässt sich die Kontamination mit Bakterien abschätzen. Viele hydrogenotrophe Methanogene sind unbeweglich (Boone 2015), sodass alle beweglichen Organismen höchstwahrscheinlich keine Methanogenen und somit ein möglicher Beweis für eine Kontamination sind. Der Umkehrschluss ist nicht möglich, da nicht alle unbeweglichen Organismen zwangsläufig Methanogene sind. Unterschiedliche morphologische Typen sind ebenfalls ein Indiz für eine Kontamination bzw. ein Indiz dafür, dass nicht nur ein Stamm in der Kultur vorhanden ist.

Tabelle 22: Temperaturen des ersten Isolierungsschrittes der einzelnen Proben

Bezeichnung	Temperaturen						Spannung	
	Dilution to extinction						37 °C	40 °C
	4 °C	20 °C	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C	37 °C	40 °C
NR			X	X	X	X		X
HR			X	X	X	X		X
B			X	X			X	
R			X	X			X	
M	X	X	X	X				
MI								
MII		X	X	X				
MIII		X	X	X				
MIV		X	X	X				
ML		X	X	X				
Sc		X	X	X				
SA			X	X	X	X		
SB			X	X	X	X		
Stc			X	X	X	X		
PA			X	X	X	X		
PB			X	X	X	X		

Die Isolierungsansätze aus dem Mühlenbach (M, MI-IV) wiesen nach einer Woche keine Methanogene mehr auf und wurden daher nicht weiter isoliert. Das Gleiche war bei der Sedimentprobe aus dem Mühlenberger Loch zu beobachten.

Bei der Schweensand-Probe konnten nur im Isolierungsansatz bei 37 °C nach einer Woche Methanogene nachgewiesen werden. Nach dem fünften Isolierungsschritt war in diesem Ansatz keine methanogenes Wachstum mehr auffindbar.

Bei den Sedimentproben vom Stettiner Haff konnten nur in den Isolierungsansätze bei 37 °C und 40 °C Methanogene beobachtet (40 °C: SA, SB; 37 °C: SA, Stc), wobei bei den Ansätzen bei 40 °C nach einem weiteren Isolierungsschritt diese nicht mehr detektierbar waren. Nach dem dritten Isolierungsschritt waren bei 37 °C ebenfalls keine Methanogene mehr zu finden.

Bei den beiden Gülleproben (B und R) wiesen nur die Isolierungsansätze bei 30 °C und 37 °C Methanogene auf, wobei die Methanogene im Isolierungsansatz bei 37 °C nur in den sieben weiteren Isolierungsschritten nachgewiesen werden konnten. Im Isolierungsansatz der beiden Proben (B und R) bei 30 °C konnte ebenfalls nach zwölf Isolierungsschritten noch methanogenes Wachstum dokumentiert werden. Dennoch konnten in diesen Isolierungsansätzen bakterielle Verunreinigungen gefunden werden. Eine Isolierung mit den genutzten Methoden ist bei den Proben nicht möglich bzw. würde sehr langwierig sein, daher wurde die Isolierung für diese Proben abgebrochen. Von dem Isolierungsansatz mit konstant anliegender Spannung, konnten nur in dem Ansatz aus dem Medium der MEC Methanogene identifiziert werden.

Bei den Sedimentproben vom Peenestrom (PA, PB) waren nur in den Isolierungsansätze bei 37 °C und 40 °C nach dem ersten Isolierungsansatz Methanogene nachweisbar. In den PB Proben konnten bei beiden Temperaturen nach drei Isolierungsschritten keine Methanogene mehr detektiert werden. Aus der Probe PA wurden zwei stark angereicherte Methanogenenkulturen (EK1PA und EK2PA) isoliert. Die Benennung der Kulturen setzt sich aus drei Teilen zusammen. EK steht für Endkultur, die Ziffer dient der fortlaufenden Nummerierung und der letzte Teil nach der Ziffer steht für die ursprüngliche Umweltprobe (PA). Der ausführliche Ablauf der Isolierung dieser Kulturen ist in Anhang 1 dargestellt.

Bei der Probe aus dem Hauptfermenter (HR) konnten in allen Isolierungsansätze Methanogene detektiert werden. Nach dem dritten Isolierungsschritt konnten in den Isolierungsansätze bei den Temperaturen 30 °C, 37 °C und 45 °C keine Methanogene mehr erfasst werden. Nach acht Isolierungsschritten waren in den beiden Isolierungsansätze bei 40 °C (mit und ohne Spannung) keine Methanogene nachweisbar.

Bei der Probe aus dem Nachgärer (NR) verhielt es sich für die Isolierungsansätze bei den Temperaturen 30 °C, 37 °C und 45 °C wie bei den HR-Proben. Aus den Isolierungsansätzen bei 40 °C mit Spannung wurden zwei Kulturen isoliert. Deren genauer Isolierungsablauf ist in Anhang 1 dargestellt. EK11NR wurde nach elf Isolierungsschritten isoliert. EK12NR nach zehn Isolierungsschritten. Bis zum sechsten Isolierungsschritt teilten sich beide Kulturen einen Isolierungsansatz. Daher ist es möglich, dass beide Kulturen den gleichen Stamm enthalten. Deswegen können die Kulturen als Unterkulturen einer Anreicherungskultur angesehen werden und erhielten die Bezeichnung EK11NR und EK12NR anstelle von EK1NR und EK2NR.

Der geringe Isolierungserfolg von vier angereicherten Kulturen bei 16 Umweltproben und den daraus angesetzten 55 Isolierungsansätzen unterschiedlicher Temperaturen ist nicht verwunderlich, da die Isolierung von Archaeen schwierig ist (Sun et al. 2020). Archaeen weisen geringe Wachstumsraten als Bakterien auf, außerdem kommen sie in vielen Umweltproben in geringer Häufigkeit als Bakterien vor (Sun et al. 2020). Dazu wurde beim ersten Isolierungsschritt eine 1:30 Verdünnung der Ausgangsprobe durchgeführt, dadurch wird die hohe Anzahl an Mikroorganismen reduziert. Gleichzeitig lassen sich die Proben durch diese Verdünnung besser pipettieren. Außerdem werden die chemischen Stoffe der Umweltprobe ebenfalls stark verringert. Bei einer zu hohen Konzentration an spezifischen chemischen Stoffen (z.B. andere Kohlenstoffquellen) der Umweltprobe könnten Mikroorganismen, welche unter den Isolierungsbedingungen nicht wachsen, dennoch anwachsen. Dies würde die benötigte Zeit bis zum Ausschluss dieser aus der Isolierungskultur verlängern, da sie sich in den ersten Isolierungsschritten zusätzlich anreichern würden. Wenn die gewählte Temperatur des Isolierungsansatzes nicht der optimalen Wachstumstemperatur entspricht, wird das Wachstum verlangsamt. Aufgrund der geringen Häufigkeit, der hohen Verdünnung, dem geringen Wachstum und interspezifische Konkurrenz können viele Archaeen innerhalb einer Woche (Intervall zwischen

den ersten Isolierungsschritten) nicht in ausreichender Menge angereichert werden. Eine komplett anaerobe Umgebung konnte von der Probenahme bis zur Isolierung nicht gewährleistet werden, was sich ebenfalls negativ auf den Isolierungserfolg ausgewirkt haben könnte (Sun et al. 2020).

Wie in Abschnitt 3.5 (Antibiotika Lösungen) beschrieben, inhibieren vorallem die zugegebenen Antibiotika das Wachstum von Bakterien, sodass diese durch die vorlaufenden Verdünnungen aus dem Isolierungsansatz verschwinden. Im natürlichen Umfeld gehen die Archaeen syntropische Wechselwirkungen mit anaeroben Bakterien ein. Diese syntropische Wechselwirkung hat einen positiven Effekt auf das Wachstum der Archaeen. (Thauer et al. 2008) Durch die Isolierung werden diese syntropischen Beziehungen zwischen Archaeen und Bakterien gestört, dies kann einen negativen Effekt auf das Wachstum der Archaeen haben. Manche Archaeen lassen sich nur in Form einer syntrophischen Co-Kultur isolieren. Der Abbau von Butyrat in Wasserstoff und Acetat ist thermodynamisch günstig, solange die Konzentration der Metabolite durch Methanogene auf einem geringen Niveau gehalten werden (McInerney et al. 2009). Die Störung solcher syntrophen Wechselwirkungen kann zu einem Scheitern eines Isolierungsansatz nach mehreren Isolierungsansätzen geführt haben.

5.2 Molekularbiologische Untersuchungen

5.2.1 Extraktion von genomischer DNA

Es wurde die genomische DNA der Kulturen EK11NR, EK12NR, EK1PA und EK2PA extrahiert. Diese Kulturen wurden ausgewählt, da diese im Phasenkontrast keine Indizien auf Kontamination aufwiesen. Dabei wurde vorgegangen, wie in 4.9.1 beschrieben. Die extrahierte genomische DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, wie in 4.9.2 beschrieben. Aufgrund der geringen Agarosekonzentration und der geringen Laufzeit der Gele sind die größeren DNA-Fragmente des Markers nicht eindeutig aufgetrennt. Durch die Erhöhung der Agarosenkonzentration und die Verlängerung der Laufzeit, lassen sich größere Moleküle, wie die größeren DNA-Fragmente des Markers, auftrennen (Lee et al. 2012).

Das Produkt der Extraktion der genomischen DNA von den Kulturen EK1PA und EK2PA sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Proben 2 und 3 weisen keine scharfen Banden auf. Diese unscharfen Banden bei den Proben 2 und 3 liegen oberhalb der obersten Bande des Markers, somit enthalten die Proben 2 und 3 DNA-Fragmente, welche größer als 1 kb sind. Die Unschärfe der Banden resultiert daraus, dass die DNA durch den Aufschluss teilweise gebrochen ist. Dadurch sind unterschiedlich große DNA-Fragmente entstanden, welche sich aufgrund der unterschiedlichen Größe unterschiedlich schnell durch das Gel bewegen. Dennoch sind keine

Banden unterhalb von der 1 kb Bande des Markers zu betrachten. Es gibt also keine kleineren DNA-Bruchstücke in den Proben. Die genomische DNA wurde erfolgreich extrahiert.

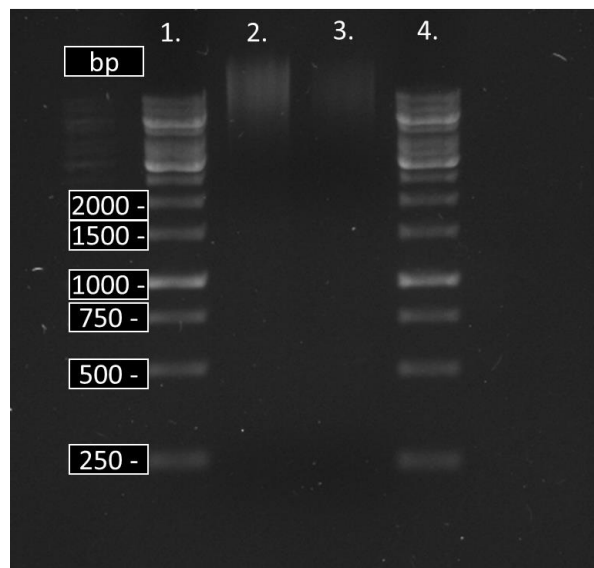


Abbildung 10: Agarose Gelelektrophorese der DNA-Extraktionsprodukte der Kulturen EK1PA und EK2PA. Die Proben 1 und 4 sind vom 1 kb Marker. Die Probe 2 ist von der Kultur EK1PA und die Bande 3 ist von der Kultur EK2PA; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 120 V, Laufzeit 60 min.

Die genomische DNA von den Kulturen EK1PA und EK2PA sind in Abbildung 11 dargestellt. Es sind unscharfe Banden oberhalb der höchsten Bande des 1 kb Marker zu sehen. Somit sind in den Proben 2 und 4 größere DNA-Fragmente von über 1 kb Länge. Es sind keine Banden unterhalb der 1 kb Bande des Markers zu identifizieren. Daher gibt es hier ebenfalls keine kleinen DNA-Bruchstücke.

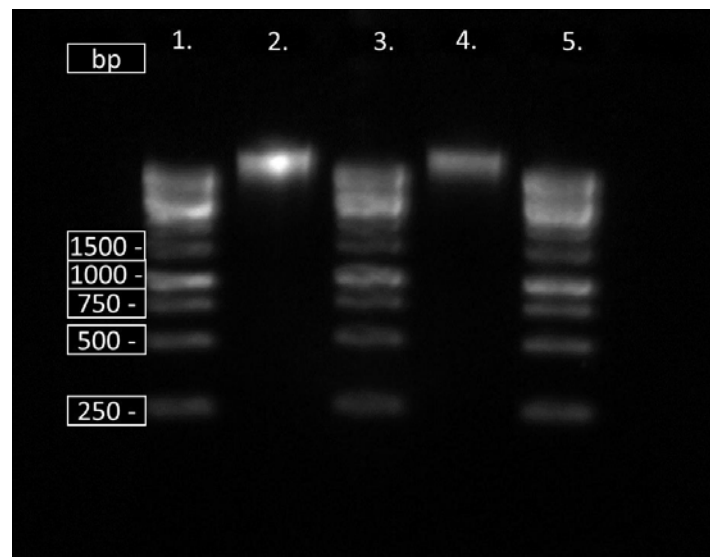


Abbildung 11: Agarose Gelelektrophorese der DNA-Extraktionsprodukte der Kulturen EK11NR und EK12NR. Die Proben 1, 3 und 5 sind vom 1kb Marker. Die Probe 2 ist von der Kultur EK12NR und die Bande 4 ist von der Kultur EK11NR; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 120 V, Laufzeit 60 min.

5.2.2 PCR für Sangersequenzierung

Die Amplifizierung der 16S rRNA Genabschnitte mittels der Kulturen EK11NR, EK12NR, EK1PA und EK2PA wurden, wie in 4.9.3 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 12 ist das PCR Produkt der Kulturen EK1PA und EK2PA mit den Primern (Bact-1492r und Bact-27f) für die 16S rRNA von Bakterien dargestellt. Die Proben 2 und 3 sind von den Kulturen EK1PA und EK2PA. Beide weisen keine Banden auf. Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit keine DNA von Bakterien im PCR Ansatz enthalten. Demnach sind beide Kulturen wahrscheinlich frei von Bakterien. Die positive Probe (Probe 5) weist eine Bande bei ca. 1500 Basenpaaren auf. Die negative Probe (Probe 4) weist ebenfalls in diesem Bereich eine Bande auf. Somit ist es zu einer Kontamination der negativen Probe gekommen. Dadurch kann nicht klar ausgesagt werden, ob bei der PCR oder beim Pipettieren ein Fehler unterlaufen ist.

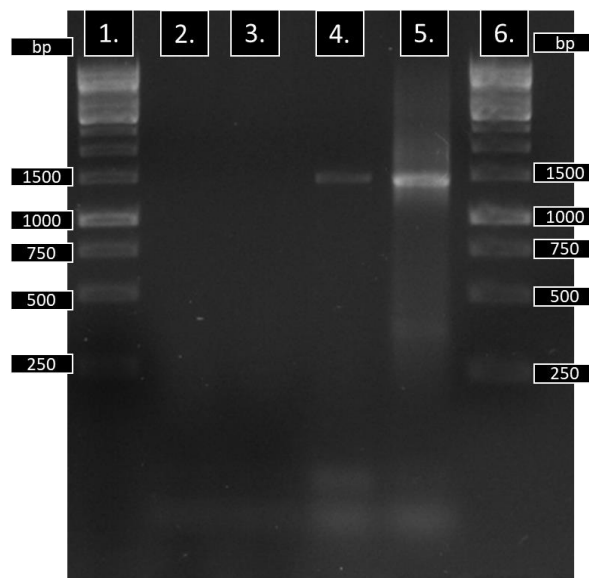


Abbildung 12: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK1PA und EK2PA mit den Primern (Bact-1492r und Bact-27f) für die 16S rRNA von Bakterien. Die Proben 1 und 6 sind der 1 kb Marker. Die Probe 2 ist das PCR Produkt vom Stamm EK1PA. Die Probe 3 ist das PCR Produkt vom Stamm EK2PA. Die Probe 4 ist die Negativprobe und die Probe 5 ist die Positivprobe; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 75 min.

In Abbildung 13 zeigt das PCR Produkt von den Kulturen EK1PA und EK2PA mit den Primern (A1000r und A337f) für die Gene der 16S rRNA von Archaeen. In der Negativprobe (Probe 2) sind keine Banden zu sehen, somit ist es zu keiner Kontamination des Ansatzes gekommen. In der Positivprobe (Probe 3) ist eine Bande zwischen 500-750 Basenpaare zu erkennen. Auf gleicher Höhe weisen die Proben von EK1PA (Probe 4) und EK2PA (Probe 5) ebenfalls eine Bande auf. Die Kulturen enthalten Archaeen.

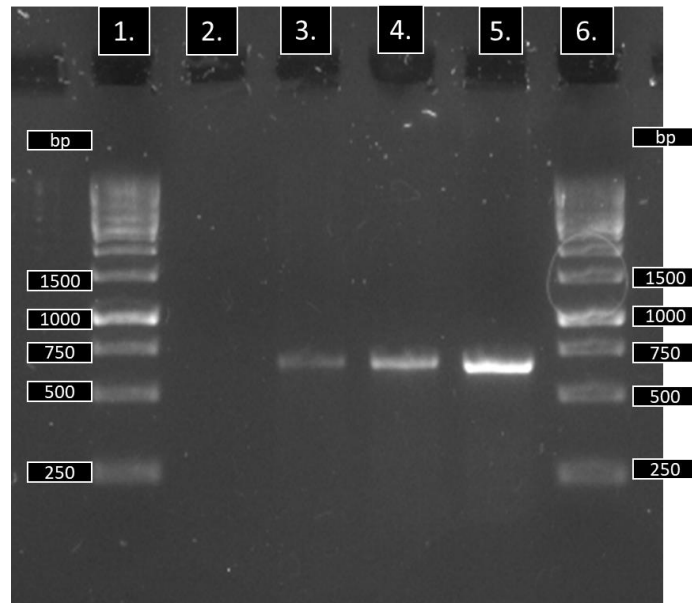


Abbildung 13: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK1PA und EK2PA mit den Primern (A1000r und A337f) für die 16S rRNA von Archaeen. Die Proben 1 und 6 sind der 1 kb Marker. Die Probe 2 ist die Negativprobe und die Probe 3 ist die Positivprobe. Die Probe 4 ist das PCR Produkt von dem Stamm EK1PA. Die Probe 5 ist das PCR Produkt von dem Stamm EK2PA; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 75 min.

In Abbildung 14 ist das PCR Produkt von den Stämmen EK11NR und EK12NR mit den Primern (Bact-1492r und Bact-27f) für die 16S rRNA von Bakterien dargestellt. Die positive Probe (Probe 2) weist eine Bande bei ca. 1500 Basenpaaren auf. In der Negativprobe (Probe 3) sind keine Bande zu erkennen. In den Proben der Kultur EK11NR (Probe 4) und der Kultur EK12NR (Probe 5) sind jeweils eine Bande bei ca. 1500 Basenpaaren zu sehen. Die Bande von Probe 5 leuchtet intensiver als die von Probe 4, aber nicht so intensiv wie die von der positiven Probe. Die Leuchtintensität des Farbstoffes innerhalb der Proben ist ein Maß für die Konzentration in den Proben. Somit ist die Konzentration an Bakterien in der Kultur EK12NR höher als in EK11NR.

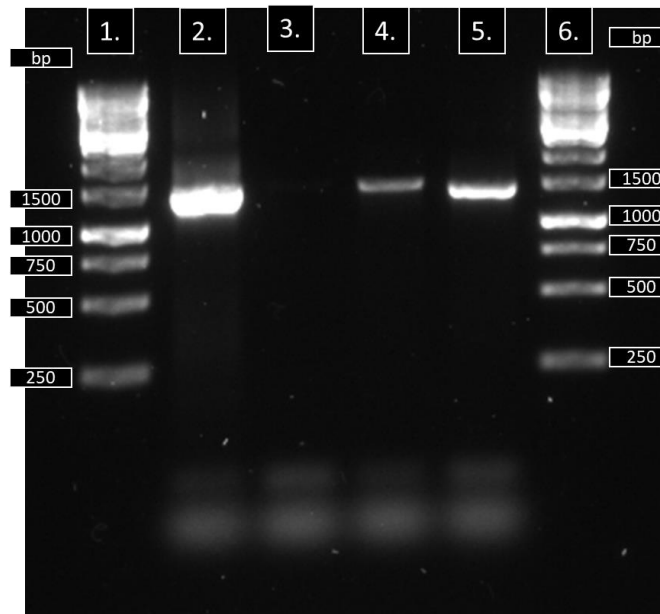


Abbildung 14: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK11NR und EK12NR mit den Primern (Bact-1492r und Bact-27f) für die 16S rRNA von Bakterien. Die Proben 1 und 6 sind der 1 kb Marker. Die Probe 2 ist die Positivprobe und die Probe 3 die Negativprobe. Die Probe 4 ist das PCR Produkt des Stammes EK11NR. Die Probe 5 ist das PCR Produkt des Stammes EK12NR; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 75 min.

In Abbildung 15 ist das PCR Produkt von den Stämmen EK1PA und EK2PA mit den Primern (A1000r und A337f) für die 16S rRNA von Archaeen dargestellt. Die Negativprobe (Probe 3) weist keine Bande auf. Die Positivprobe (Probe 2) weist eine Bande zwischen 500 und 750 Basenpaaren auf. Auf der gleichen Höhe sind in den Proben der Kulturen EK11NR (Probe 4) und EK12NR (Probe 5) ebenfalls starke Bande zu erkennen.

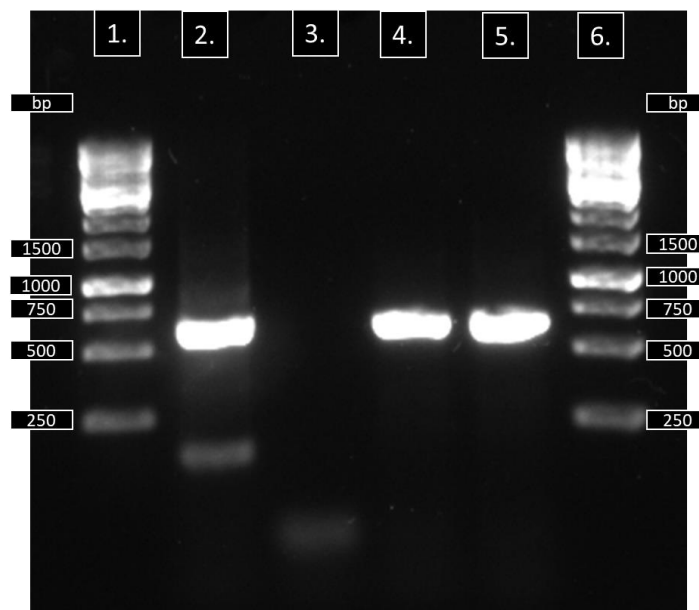


Abbildung 15: Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten 16S rRNA Genabschnitte der Kulturen EK11NR und EK12NR mit den Primern (A1000r und A337f) für die 16S rRNA von Archaeen. Die Proben 1 und 6 sind der 1 kb Marker. Die Probe 2 ist die Positivprobe und die Probe 3 die Negativprobe. Die Probe 4 ist das PCR Produkt des Stammes EK11NR. Die Probe 5 ist das PCR Produkt des Stammes EK12NR; Gellauf: 1 %Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 75 min.

Die Kulturen EK1PA und EK2PA enthalten keine Bakterienstämme, dafür aber mindestens einen Archaeenstamm. Die Kulturen EK11NR und EK12NR enthalten beide Bakterien. Die Konzentration an Bakterien ist in der Kultur EK11NR geringer als in der EK12NR. Beide enthalten mindestens einen Archaeenstamm. Die Konzentration an Archaeen in den Kulturen ist weit größer als die Konzentration an Bakterien. Beide Kulturen sind stark angereicherte Archaeenkulturen mit mindestens einem Archaeenstamm. Da die Kulturen EK11NR und EK12NR unter Verwendung einer konstant angelegten Spannung, mittels eines Netzteils, von 0,5 Volt isoliert worden sind, konzentriert sich die Arbeit auf diese beiden Stämme.

5.2.3 Sangersequenzierung

Es wurden die PCR Produkte der archaealen 16S rRNA untersucht. Die Sangersequenzierung lieferte für die beiden Stämme EK11NR und EK12NR eine eindeutige Sequenz. Unter Verwendung der Primer A337f und A1000r ergab sich ein DNA-Fragment von der Länge von ca. 500 Basenpaaren (siehe Abbildung 15). Mit der Sangersequenzierung konnten für EK12NR eine Sequenz von 493 Basenpaaren und für EK11NR eine von 494 Basenpaaren bestimmt werden. Die Sequenzen sind in Anhang 2 Anhang angefügt. Zur Identifizierung der beiden Sequenzen wurden die BLAST-Suche des NCBI verwendet (Stand: 28.12.2021) und die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Ergebnisse der BLAST-Suche

Bezeichnung	Länge der Sequenz (bp)	Nächste verwandte Art	Übereinstimmung der Sequenzlänge	Sequenz-übereinstimmung
EK11NR	494	<i>Methanobacterium formicicum</i>	99%	100,00%
EK12NR	493	<i>Methanobacterium formicicum</i>	100%	99,59%

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Stämme zu der Gattung *Methanobacterium* gehören. Wahrscheinlich sind beide Isolate Stämme von *Methanobacterium formicicum*. Dennoch handelt es sich bei den Isolaten EK11NR und EK12NR um zwei unterschiedliche Stämme. Eine Aussage über die Spezies eines Organismus auf Grundlage der 16S rRNA zu treffen ist nur bedingt möglich. Die 16S rRNA ist für derartig genaue Bestimmungen zu stark konserviert. Außerdem wurde nur ein Teil der 16S rRNA bestimmt. Für eine genauere Klassifizierung müsste die gesamte 16S rRNA, welche ca. eine Länge von 1540 Basenpaaren aufweist (Kim et al. 2011), untersucht werden. Für eine ergänzende Klassifizierung könnten charakteristische Gene, welche als phylogenetische Marker fungieren können (Schleifer 2009), zusätzlich ana-

lysiert werden. Bei Archaeen werden dafür vermehrt die *mcrA* Gene verwendet. Diese codieren die methyl-coenzym M Reduktase, welche am finalen Schritt der Methanogenese beteiligt ist. Die Datenbank der *mcrA* Gene ist nicht so umfangreich wie die der 16S rRNA (Luton et al. 2002; Schleifer 2009).

5.3 Spannungsversuch

In der Publikation von Cai *et al.* 2016 konnte gezeigt werden, dass sich hydrogenotrophe Methanogene an der Kathode in einem anaeroben Fermenter anreichern, wenn an diesem eine Spannung angelegt wird. Dabei nahm das Anlegen einer Spannung Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb des Reaktors bzw. an den Elektroden. Der relative Anteil an hydrogenotrophen Methanogenen nahm im Kathodenkompartiment zu. An der Kathode selbst reichern sich die hydrogenotrophen Methanogenen weiter an, vor allem die Gattung *Methanobacterium* (Cai et al. 2016).

Durch das Anlegen einer Spannung sollte es theoretisch möglich sein hydrogenotrophe Methanogene an der Kathode anzureichern und diese durch das Überführen der Kathode zu isolieren. Gleichzeitig würden sich durch die Spannung ebenfalls Bakterien an der Kathode anreichern, diese sollten durch die Zugabe von fünf Antibiotika größtenteils gehemmt sein.

Die Kulturen EK11NR und EK12NR sind durch diese Methode isoliert worden. Dennoch stammen sie weder aus dem Ansatz, in welcher die Kathode überführt wurde, noch aus dem Ansatz von welchen ein Stück der Kathode überführt wurde. Statt sich durch die Spannung an der Kathode anzureichern, könnte die Spannung einen selektiven Effekt gehabt haben

Wenn die Methanogenen der Isolate die Elektronen von der Kathode nicht aufnehmen konnten, standen ihnen keine Elektronen zur Verfügung und waren somit nicht in der Lage die Methanogenese durchzuführen. Gleichzeitig verfügten die anderen Organismen ebenfalls über keinen Elektronendonator und konnten somit ebenfalls keinen Stoffwechsel betreiben. Diese Zeitintervall, ohne aktiven Stoffwechsel, könnten die Methanogenen in den Isolaten besser ausgehalten haben.

Um den Einfluss der Spannung zu untersuchen, wurde das Wachstum der isolierten methanogenen Kulturen unter den Isolierungsbedingungen beobachtet. Wie in 4.8 beschrieben wurden jeweils 4 unterschiedliche Bedingungen mit jeweils 3 Ansätzen untersucht. Ein Ansatz wurde mit Kohlenstoffdioxid begast und zusätzlich wurde eine Spannung angelegt. Es gab zwei Ansätze mit H₂: CO₂ Gas (80:20). Einer mit und einer ohne Spannung. Der Ansatz mit Stickstoffgas diente als Negativprobe, da hier kein Wachstum möglich sein sollte. Bei den Ansätzen wurde die Zellzahl einerseits über die Autofluoreszenz bestimmt. Hierbei leuchten nur stoffwechselaktive Zellen. Außerdem wurden zur Bestimmung der Gesamtzellzahl die Zellen mit SYBR Green angefärbt, dieses interkaliert in die DNA und färbt die doppelsträngige DNA

an (Dragan et al. 2012). Zusätzlich wurde der pH-Wert der Ansätze gemessen, diese Ergebnisse sind in Anhang 3 angefügt. Die Zellzahlen sind in Abbildung 16 bis Abbildung 19 dargestellt.

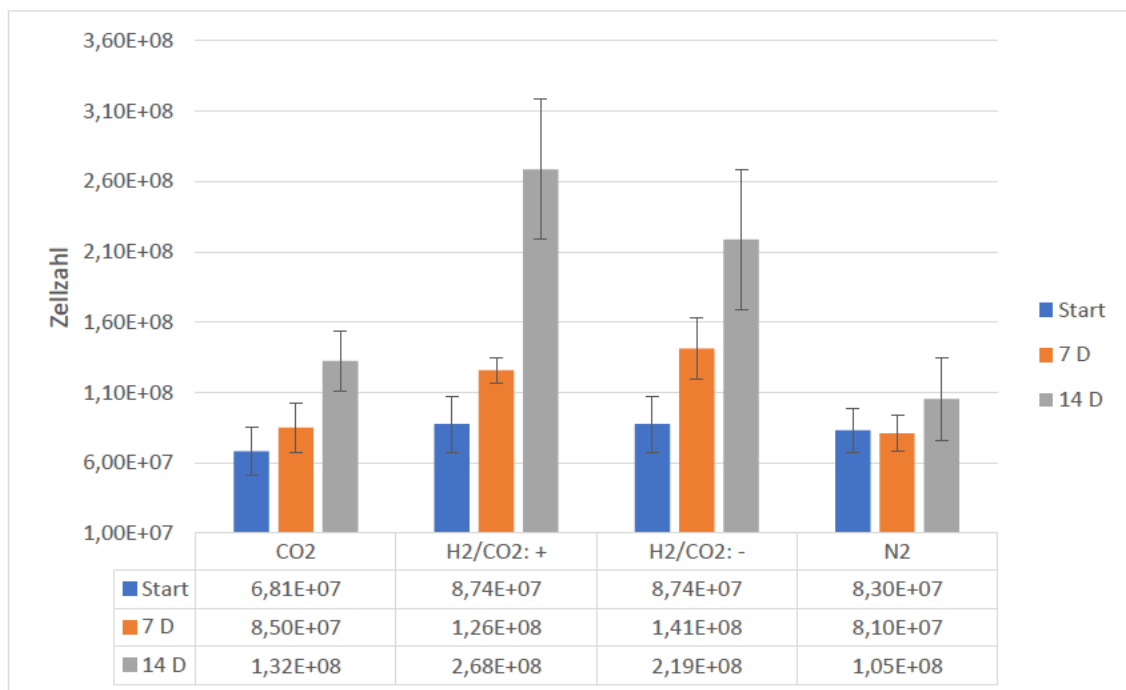


Abbildung 16: Mittelwerte der Gesamtzellzahl der Kultur EK11NR im Verlaufe des Versuches, bestimmt über die Anfärbung durch SYBR Green. An den Ansatz H_2/CO_2+ wurde wie bei den anderen Ansätzen ebenfalls eine Spannung angelegt. An den Ansatz H_2/CO_2- wurde keine Spannung angelegt. Die Zellzahl wurde zum Beginn, nach 7 Tagen (7 D) und 14 Tagen (14 D) bestimmt.

In Abbildung 16 sind die Gesamtzellzahlen der Kultur EK11NR dargestellt. Der pH-Wert von dem Ansatz mit CO_2 weist ein starkes Absinken des pH-Wertes auf. Der pH-Wert sinkt bereits zu Beginn des Versuches auf 6,5 ab. Nach einer Woche steigt er leicht wieder an und ist nach zwei Wochen auf pH 6 abgesunken. Die pH-Werte der anderen drei Ansätze bleiben nach einer Woche konstant bei ca. 7,3. Die Negativprobe mit Stickstoffgas zeigt kein Wachstum nach einer Woche. Nach zwei Wochen zeigt sich ein kleines Wachstum. Aufgrund keiner vorhandenen Kohlenstoffquelle sollte kein Wachstum möglich sein. Daher wird es sich wahrscheinlich um den Abbau von Stoffwechselprodukten abgestorbener Zellen handeln. Der Ansatz mit Kohlenstoffdioxid weist nach einer Woche und nach zwei Wochen Wachstum auf. Sowohl nach einer Woche als auch nach zwei Wochen ist das Wachstum geringer, als das der beiden Ansätze mit $H_2: CO_2$. In den beiden Ansätzen mit H_2/CO_2 konnte in beiden Wochen eine Zunahme des Wachstums detektiert werden. Das Wachstum des Ansatzes mit angelegter Spannung (H_2/CO_2+) weist nach zwei Wochen eine größere Zunahme der Zellzahl auf als die Zellzahl des Ansatzes ohne Spannung (H_2/CO_2-). Die Spannung hat einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen. Der große Fehler bei den beiden Werten relativiert diesen Einfluss.

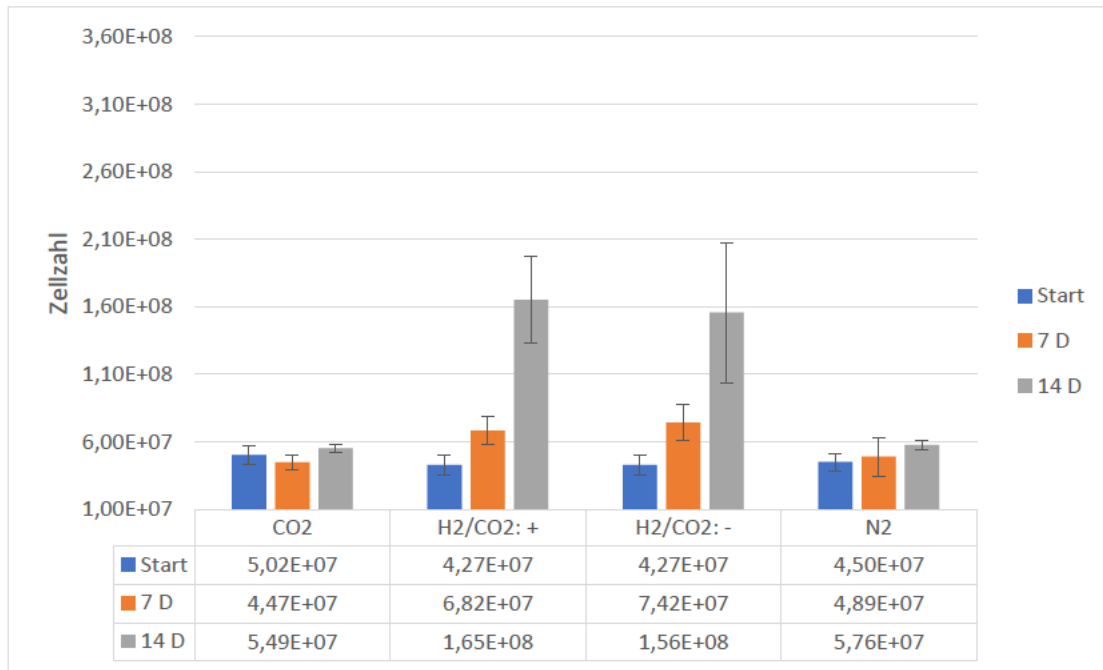


Abbildung 17: Mittelwerte der methanogenen Zellzahl der Kultur EK11NR im Verlaufe des Versuches, bestimmt über die Autofluoreszenz der Methanogenen. An den Ansatz H_2/CO_2+ wurde wie bei den anderen Ansätzen ebenfalls eine Spannung angelegt. An den Ansatz H_2/CO_2- wurde keine Spannung angelegt. Die Zellzahl wurde zum Beginn, nach 7 Tagen (7 D) und 14 Tagen (14 D) bestimmt.

In Abbildung 17 wurde die methanogene Zellzahl über die Autofluoreszenz der Methanogenen bestimmt. Nur Methanogene verfügen durch das Coenzym F_{420} über eine Autofluoreszenz im betrachteten Spektrum. Somit wird bei dieser Bestimmungsmethode nur die Zellzahl der Methanogenen erfasst und nicht die gesamte Anzahl an Mikroorganismen. Bei dieser Bestimmungsmethode ist kein Anstieg der Zellzahl im Ansatz mit CO_2 zu beobachten. Somit hat nur die Zellzahl an Bakterien zugenommen, nicht die Zellzahl der Methanogenen. Bei den beiden Ansätzen mit H_2/CO_2 ist ein konstanter Anstieg der Zellzahl an Methanogenen über die zwei Wochen zu beobachten. Der Ansatz mit Spannung (H_2/CO_2+) weist, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, keinen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Spannung (H_2/CO_2-) auf. Somit ist ein möglicher Einfluss der Spannung bei der vorliegenden Genauigkeit der Methode nicht zu erfassen.

Das Anlegen einer Spannung hat einen positiven Effekt auf das Wachstum der Bakterien in der Kultur. Hingegen hat die Spannung weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf das Wachstum der Methanogenen.

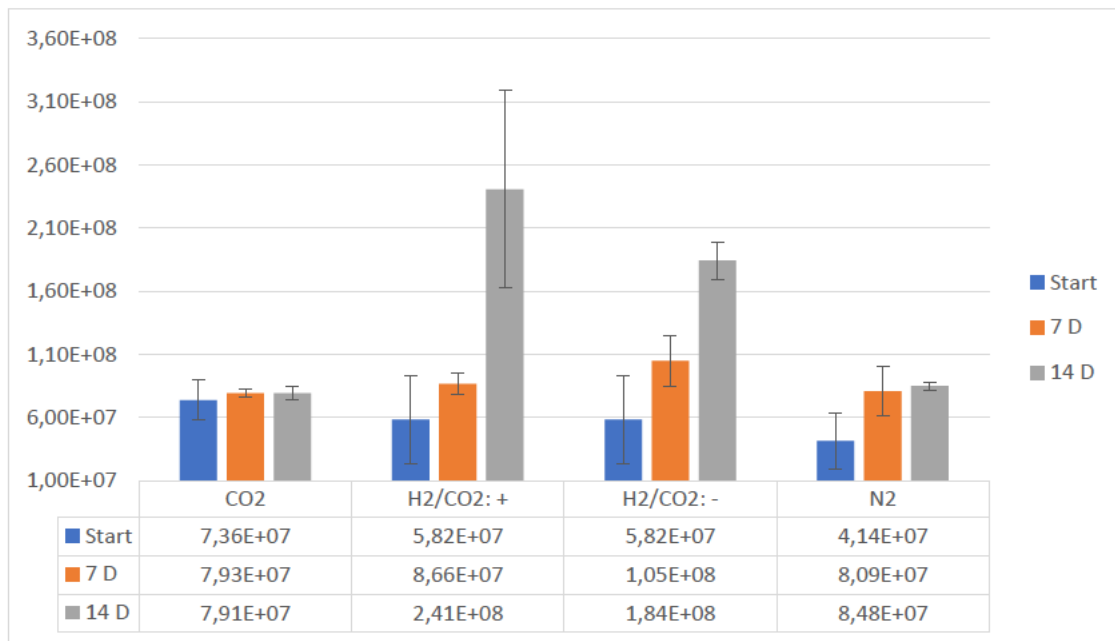


Abbildung 18: Mittelwerte der Gesamtzellzahl der Kultur EK12NR im Verlaufe des Versuches, bestimmt über die Anfärbung durch SYBR Green. An den Ansatz H₂/CO₂+ wurde wie bei den anderen Ansätzen ebenfalls eine Spannung angelegt. An den Ansatz H₂/CO₂- wurde keine Spannung angelegt. Die Zellzahl wurde zum Beginn, nach 7 Tagen (7 D) und 14 Tagen (14 D) bestimmt.

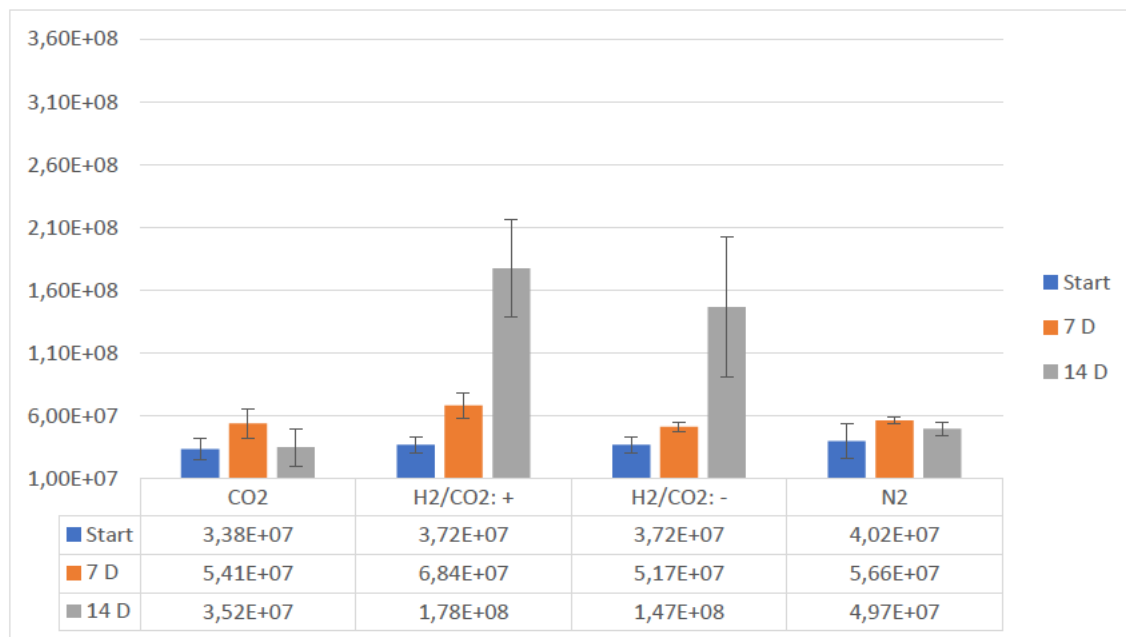


Abbildung 19: Mittelwerte der methanogenen Zellzahl der Kultur EK12NR im Verlaufe des Versuches, bestimmt über die Autofluoreszenz der Methanogenen. An den Ansatz H₂/CO₂+ wurde wie bei den anderen Ansätzen ebenfalls eine Spannung angelegt. An den Ansatz H₂/CO₂- wurde keine Spannung angelegt. Die Zellzahl wurde zum Beginn, nach 7 Tagen (7 D) und 14 Tagen (14 D) bestimmt.

Weder die Gesamtzellzahl (siehe Abbildung 18), noch die methanogene Zellzahl (siehe Abbildung 19) der Kultur EK12NR des Ansatzes mit CO₂ nimmt signifikant zu. Jegliche Schwankungen der Mittelwerte liegen unterhalb der Standardabweichung der Werte oder unterhalb der Negativprobe. Bei den beiden Ansätzen mit H₂/CO₂ Gas nimmt die Zellzahl unabhängig von der Bestimmungsmethode konstant über die zwei Wochen zu. Jedoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen zu erkennen. Somit ist der mögliche Einfluss der

Spannung bei der vorliegenden Genauigkeit der Methode nicht zu erfassen. Den Einfluss auf das Bakterienwachstum, welchen die Spannung bei den Ansätzen mit der Kultur EK11NR aufweist, ist bei den Ansätzen mit der Kultur EK12NR nicht zu sehen.

Bei beiden Kulturen ist kein positiver Effekt der Spannung auf das Wachstum der Methanogenen zu beobachten. Daher wird das Anlegen einer Spannung bei der Isolierung nicht direkt zu einer Anreicherung der Methanogenen geführt haben. Die Kulturen sind nicht aus dem Isolierungsschritt der Kathoden isoliert worden, sondern aus dem Medium der MEC Zellen. Wenn die Spannung zur Anreicherung der Methanogenen geführt haben sollte, hätten diese sich vorwiegend an der Kathode anreichern müssen (Cai et al. 2016). Der Vorteil der Isolierung mit den MECs könnte wahrscheinlich darauf zurückzuführen sein, dass die Methanogenen die Woche ohne aktiven Stoffwechsel besser überstehen konnten als die meisten anderen Mikroorganismen in den Umweltproben.

5.4 Charakterisierung

Ein weitverbreitetes System zur Klassifizierung ist der polyphasischer Ansatz. Dieser Ansatz verbindet phänotypische, chemotaxonomische und genotypische Daten miteinander. Zusätzlich werden phylogenetische Informationen berücksichtigt. Die genotypischen Informationen stammen meist aus der Untersuchung der 16S rRNA (siehe 5.2.3). Aus diesen lässt sich die phylogenetische Beziehung zu anderen Mikroorganismen ableiten. Die chemotaxonomische Untersuchung z.B. die Bestimmung des GC-Gehaltes wurde, aufgrund von fehlender Ausrüstung, im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt. Parameter der phänotypischen Daten ist hauptsächlich die Morphologie (Schleifer 2009).

5.4.1 Morphologie

Die Morphologie ist einer der ersten Parameter, welche zur Identifizierung von Mikroorganismen verwendet wurden. Als alleinstehender Parameter wird die Morphologie heute nicht mehr verwendet, da die Aussagekraft dieses Parameters nicht ausreichend ist. So können Bakterien und Archaeen morphologisch nahezu identisch wirken, obwohl sie zwei unterschiedlichen Domänen angehören. Als ergänzender Parameter, um die Identifizierung einzugrenzen, wird die Morphologie heute noch verwendet (Schleifer 2009).

5.4.1.1 EK11NR

In Abbildung 20 und Abbildung 21 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Kultur EK11NR dargestellt. Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Weder im Phasenkontrast noch bei der Fluoreszenzaufnahme sind andere Morphotypen zu erkennen. Unterschiedliche Morphotypen können auf unterschiedliche Organismen hindeuten. Dennoch sind manche Zellen nur im Phasenkontrast zu erkennen. Diese Zellen könnten Bakterienzellen sein, da diese über keine Autofluoreszenz verfügen und somit nur im Phasenkontrast sichtbar sind. Hingegen könnten diese Zellen der Methanogenen auch über einen schwachen Stoffwechsel verfügen. Dann wären diese Zellen nur schwach fluoreszierend und dadurch nicht sichtbar. DABCO wurde als Anti-Fading Reagenz verwendet. Durch dieses Reagenz wird das Verblasen verlangsamt, dennoch nimmt dadurch auch die Intensität ab (Longin et al. 1993). Dieser Effekt kann ebenfalls dafür sorgen, dass die Fluoreszenz mancher Zellen nicht identifizierbar ist. In Abbildung 21 sind die unterschiedlichen Intensitäten von den Zellen zu erkennen. Sowohl in Abbildung 20 als auch in Abbildung 21 sind Zelle nur im Phasenkontrast zu sehen. Dies könnte auf eine bakterielle Kontamination hinweisen. Dieses Phänomen kann ebenfalls auf schwache Intensitäten zurückzuführen sein. Somit könnte die Kultur EK11NR eher eine stark angereicherte Kultur statt einer Reinkultur sein.

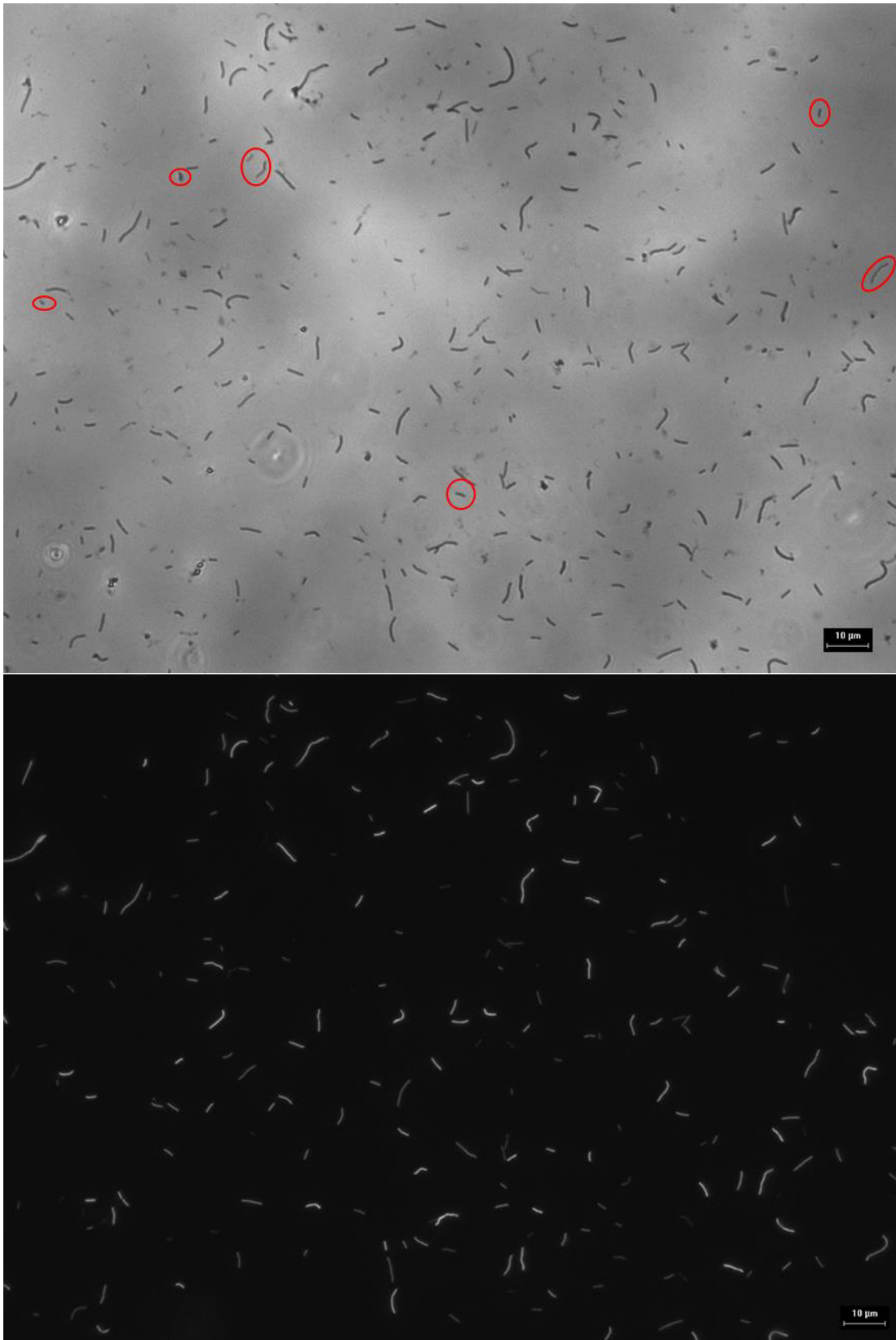


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK11NR mit einem 40xfach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 4,64 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Rot umrandete Zellen sind nur im Phasenkontrast zu erkennen und können daher ein Indiz für eine Kontamination darstellen.

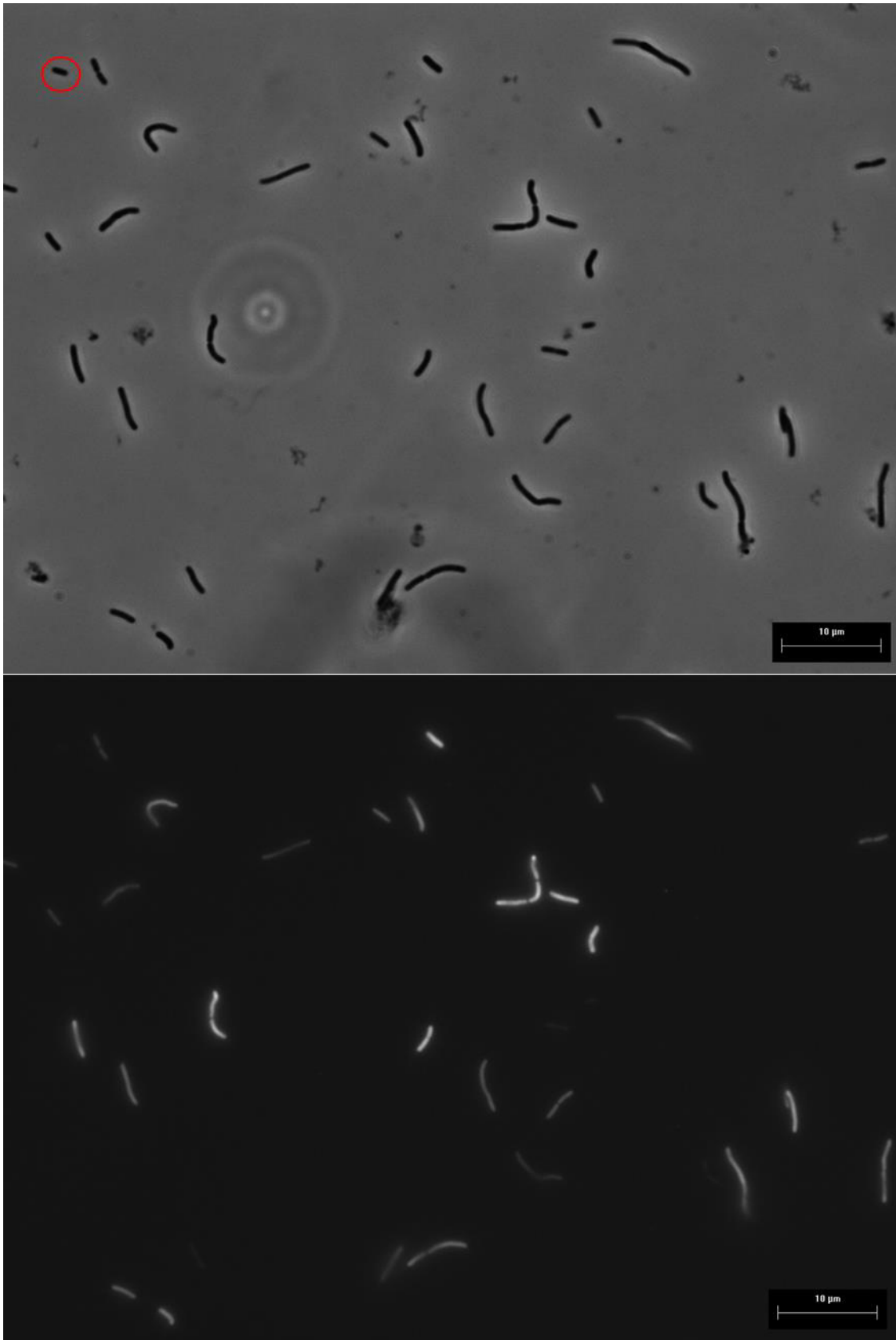


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK11NR mit einem 100fach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 32,6 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Außerdem leuchten die Zellen unterschiedlich intensiv. Die rot umrandete Zelle ist nur im Phasenkontrast sichtbar, dies könnte Indiz für eine Kontamination sein.

5.4.1.2 EK12NR

In Abbildung 22 (40x Objektiv) und Abbildung 23 (100x Objektiv) sind die morphologischen Aufnahmen der Kultur EK12NR dargestellt. Diese weisen ebenfalls eine stäbchenförmige Morphologie auf. Wie in der Kultur EK11NR sind keine anderen Morphotypen zu erkennen. Auch in dieser Kultur sind einige Zellen nur im Phasenkontrast zu erkennen, was ein Indiz auf eine Kontamination der Kultur durch bakterielle Zellen sein kann. Dennoch könnten dies auch besonders schwach leuchtende Zellen sein, welche aufgrund des DABCOs oder Fading-Effektes nicht sichtbar sind. Die stäbchenförmigen Zellen der Kultur EK12NR sind kürzer als die der Kultur EK11NR.

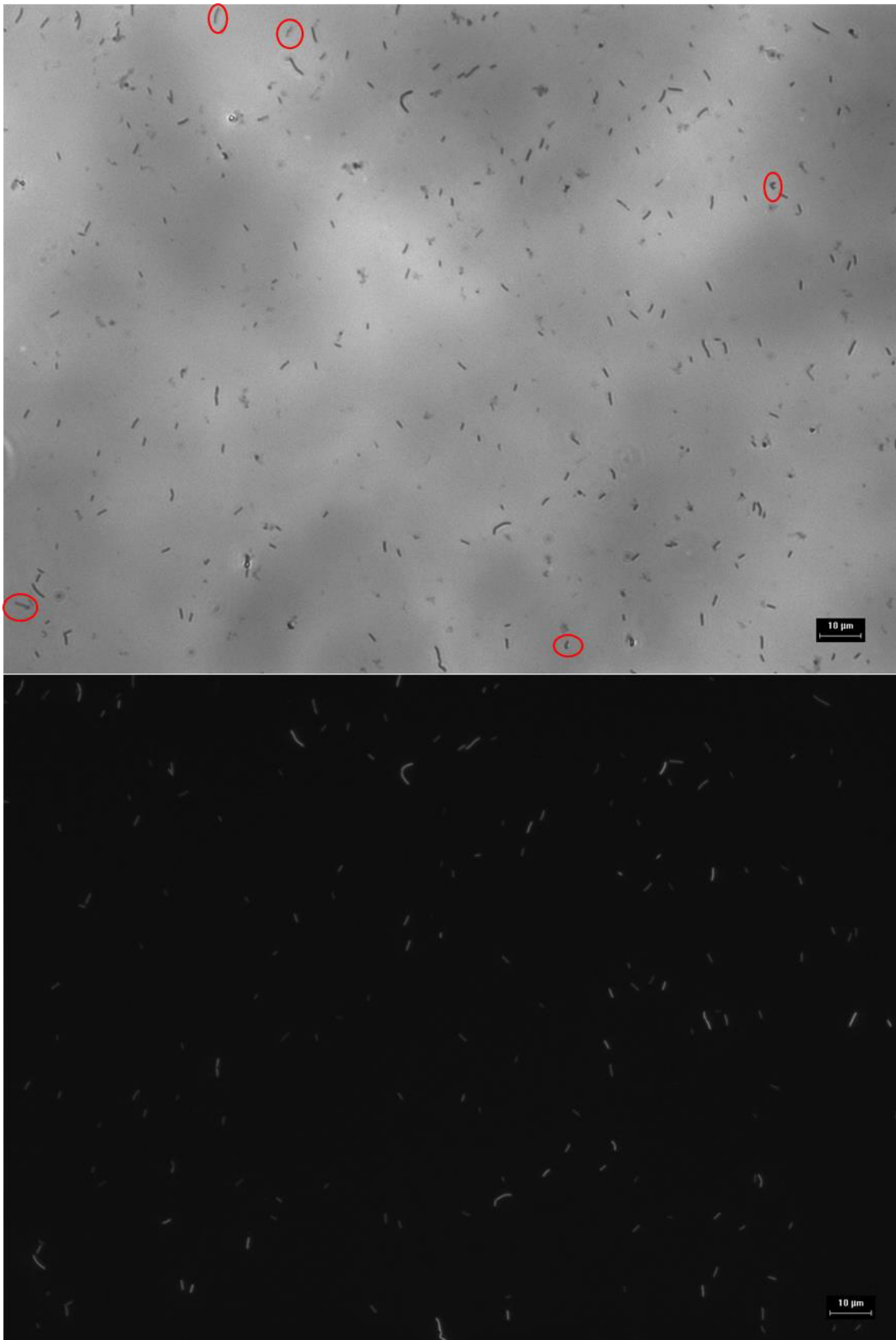


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK12NR mit einem 40xfach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 4,64 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Rot umrandete Zellen sind nur im Phasenkontrast sichtbar. Diese Zellen weisen keine sichtbare Fluoreszenz auf.

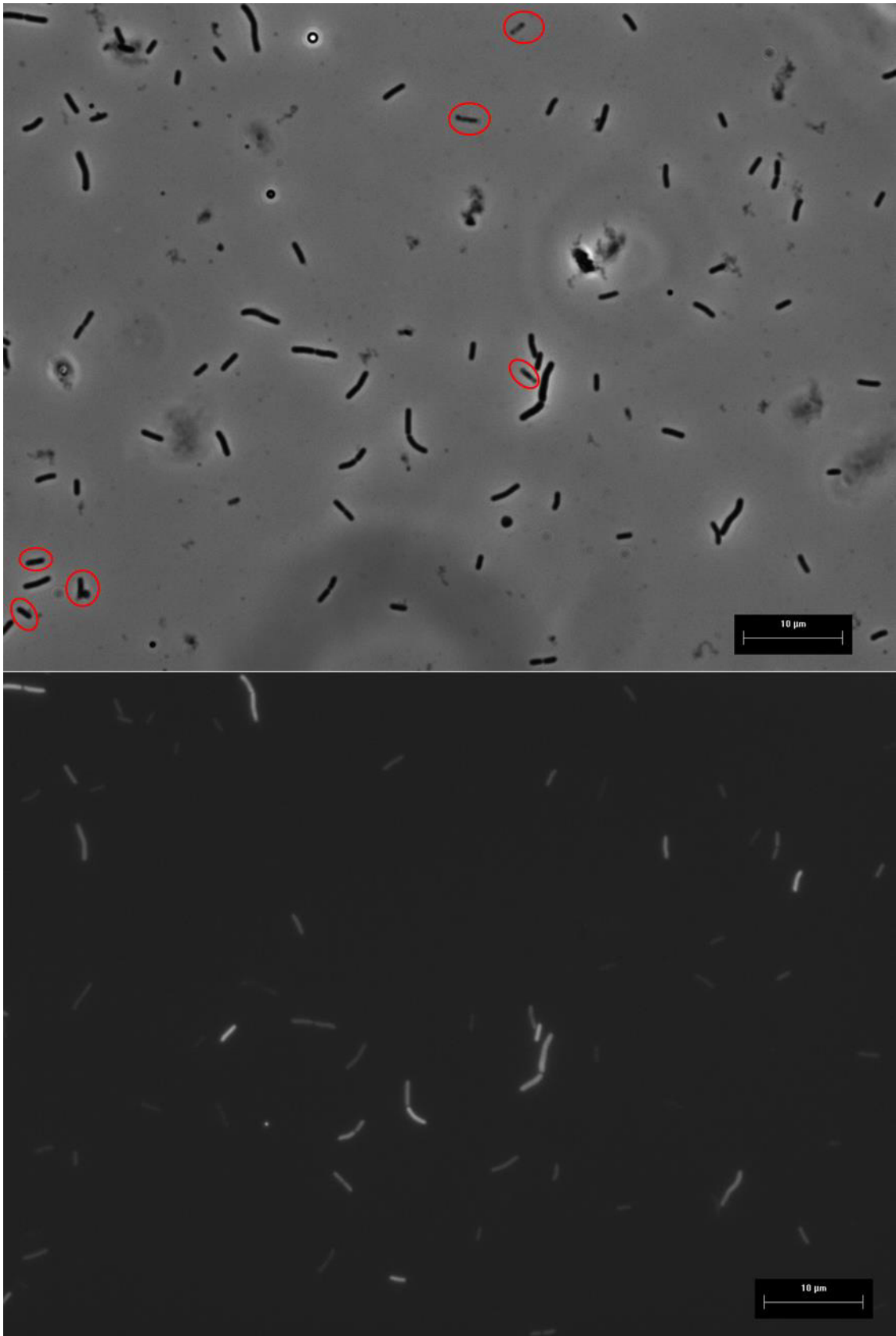


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen der Kultur EK12NR mit einem 100fach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 32,6 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Die Zellen leuchten unterschiedlich stark und manche Zellen sind nur im Phasenkontrast sichtbar (rot umrandet)

Neben der Unterscheidung der Morphologie unter dem Mikroskop können makroskopischen Unterschiede der Kulturen EK11NR und EK12NR beobachtet werden. Die Kultur EK11NR weist eine Trübung des Mediums auf. Die Kultur EK12NR weist zusätzlich nach einer Woche leicht adhäsive sichtbare Agglomerate auf (siehe Abbildung 24). Diese Agglomerate werden von der Kultur EK11NR auch nach einem längeren Zeitintervall nicht gebildet. Daher sind die Stämme der Kulturen wahrscheinlich unterschiedlich. Derartige Agglomerate wurden bereits in *M. formicicum* Kulturen beschrieben (Boone 2015).



Abbildung 24: Aufnahmen der Kulturen EK11NR (links) und EK12NR (rechts).

Die Agglomerate sind Ansammlungen von vielen Zellen. Lediglich ein Teil der Zellen in den Agglomeraten fluoreszieren (siehe Abbildung 25).

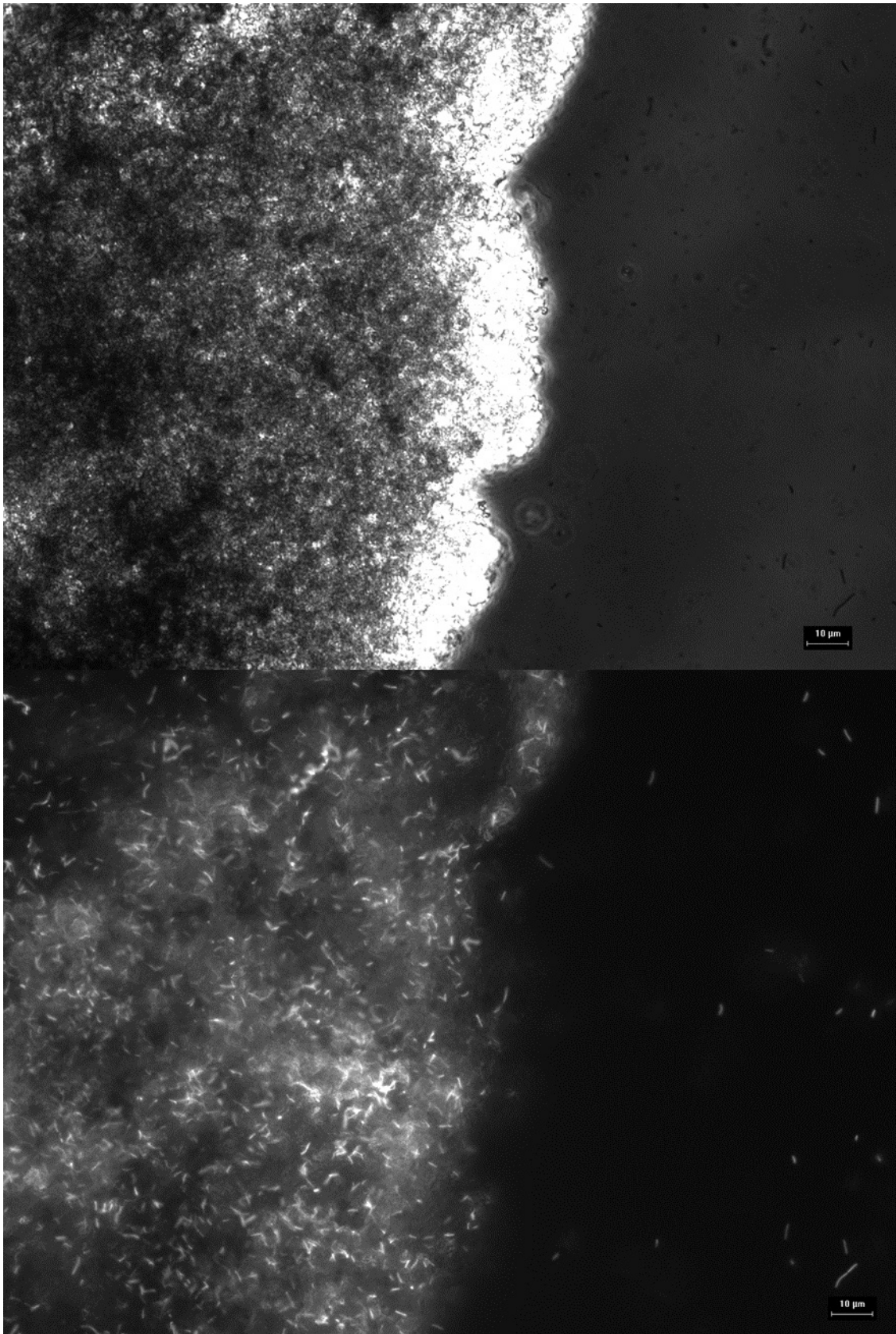


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der Agglomerate aus Kultur EK12NR mit einem 40xfach Objektiv. Oben ist der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 2,85 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms) dargestellt

5.4.1.3 *M. congolense*

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind die mikroskopischen Aufnahmen der *M. congolense* Kultur dargestellt, welche eine Reinkultur von der DSMZ ist. Diese Zellen weisen ebenfalls eine stäbchenförmige Morphologie auf. Die Stäbchen sind dennoch weitaus länger als die der Kulturen EK11NR und EK12NR. Bei der morphologischen Untersuchung konnten ebenfalls nur manche Zellen nur im Phasenkontrast beobachtet werden. Dies kann ein Indiz für eine Kontamination der Reinkultur darstellen. Jedoch beschreibt Cuzin *et al.* das *M. congolense* in der stationären Wachstumsphase eine geringere Autofluoreszenz hat (Cuzin et al. 2001). Somit können die Zellen auch aufgrund einer geringen Wachstumsgeschwindigkeit oder einer anderen Wachstumsphase nur im Phasenkontrast sichtbar sein.

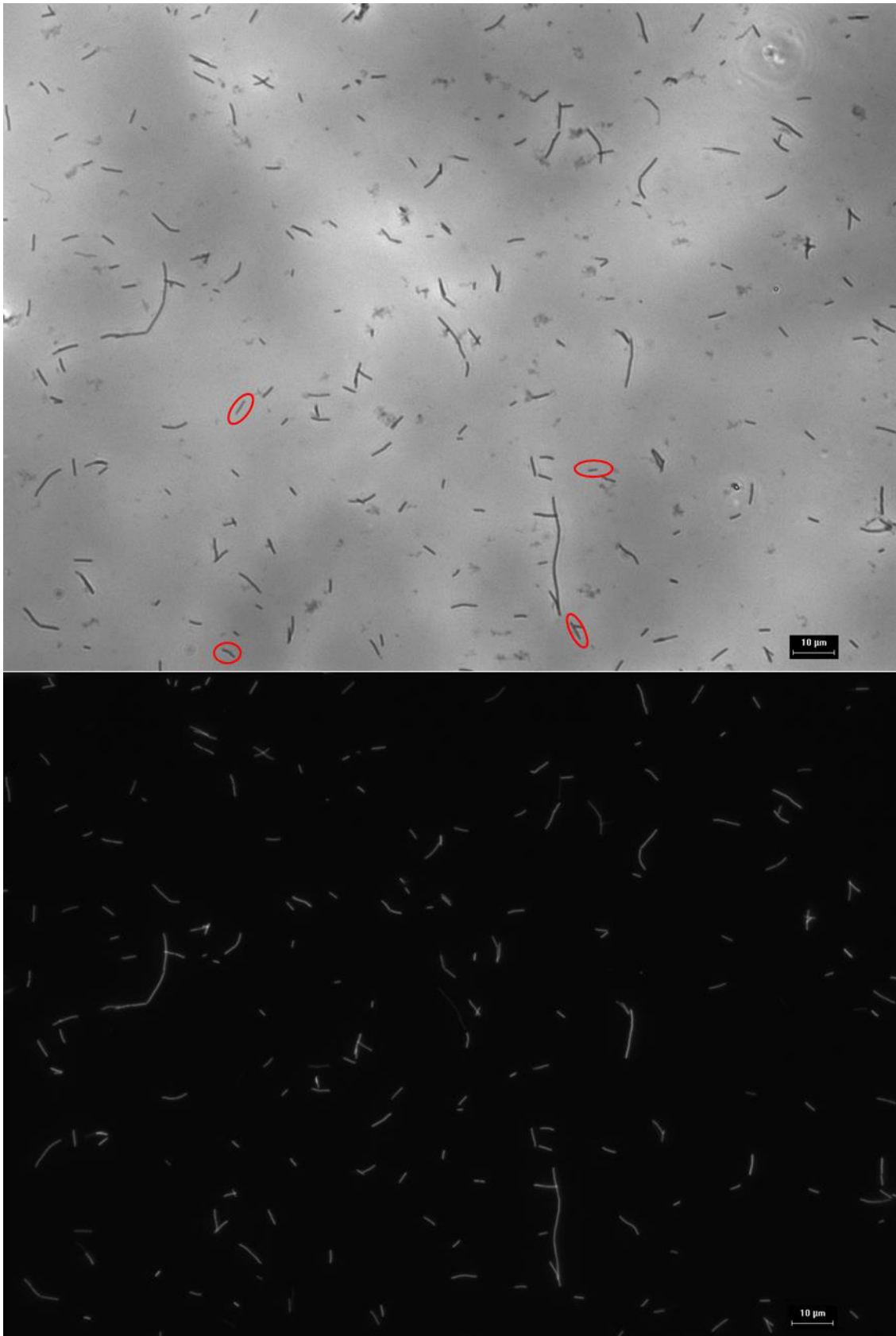


Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen der *M. congolense* Kultur mit einem 40xfach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 4,64 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf, wobei die Länge der Zellen stark variiert. Manche Zellen sind nur im Phasenkontrast sichtbar (rot umrandet)

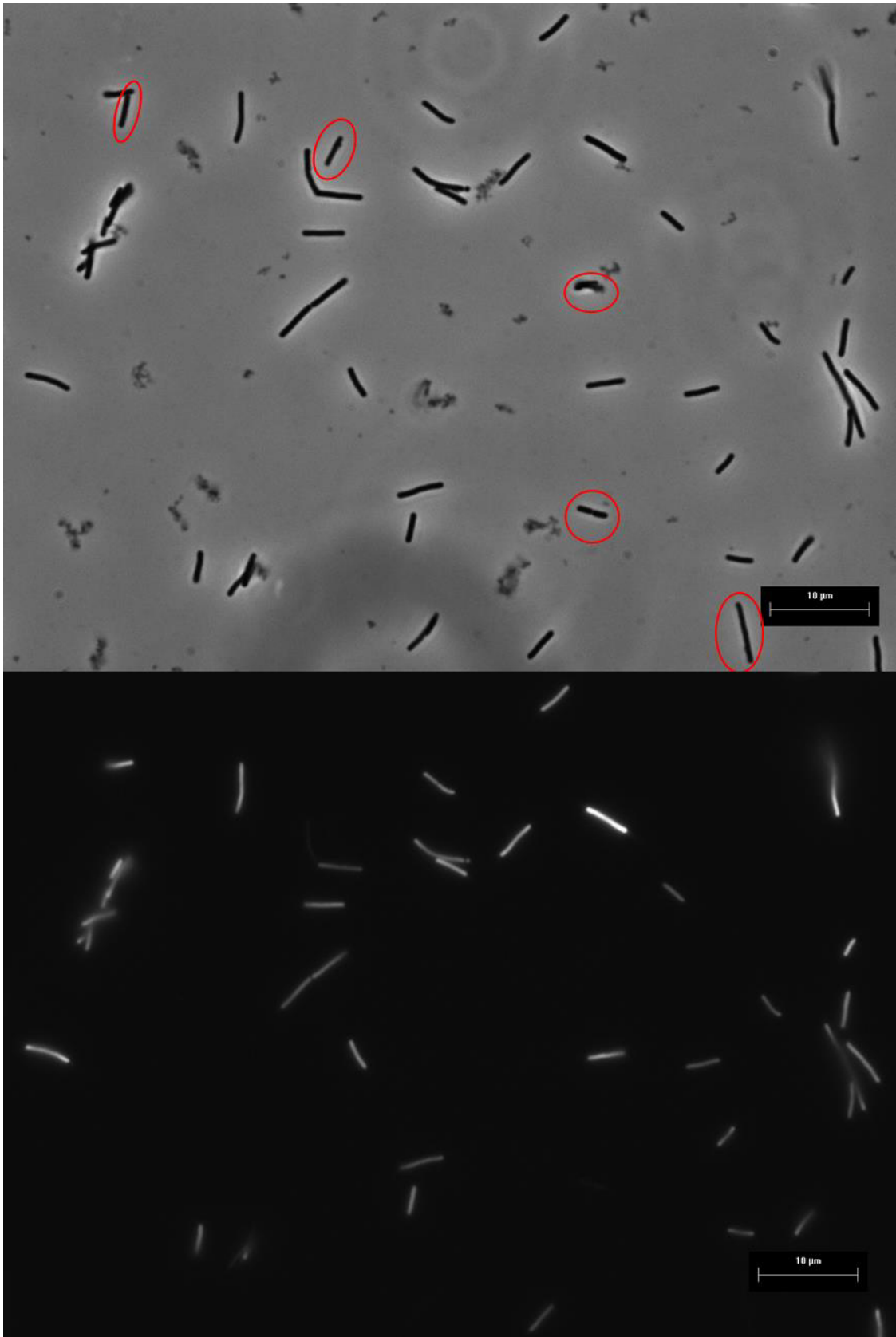


Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahmen der *M. congolense* Kultur mit einem 100xfach Objektiv. Oben der Phasenkontrast (Belichtungszeit: 32,6 ms) und unten die Fluoreszenz (Belichtungszeit: 82,4 ms). Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf und leuchten unterschiedlich intensiv. Manche Zellen sind nur im Phasenkontrast sichtbar (rot umrandet)

5.4.1.4 *M. formicicum*

Die *M. formicicum* Kultur vom DSMZ ist nicht im HAW Medium angewachsen. Die Zugabe von Hefeextrakt zum Medium hatte keinen Effekt. Die Zellzahl in dieser Kultur war sehr gering. Die Zellen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf. Die Stäbchen sind kürzer als die *M. congolense* Stäbchen. Von der Länge entsprechen sie eher den Stäbchen der Kultur EK11NR.

5.4.1.5 Maße der Zellen der Kulturen

Die eigens gemessenen Zelllängen der *M. formicicum* Kultur der DSMZ waren aufgrund der geringen Zellzahl nicht aussagekräftig genug. Es wurden daher die Literaturwerte der Publikation von Battumur *et al.* 2016 herangezogen. Die Zellen der Kulturen *M. congolense* (*Mc*), EK11NR und EK12NR wurden mittels mikroskopischer Längenbestimmung ausgewertet (siehe Abbildung 28). Es wurden pro Kultur zwei Objektträger angesetzt.

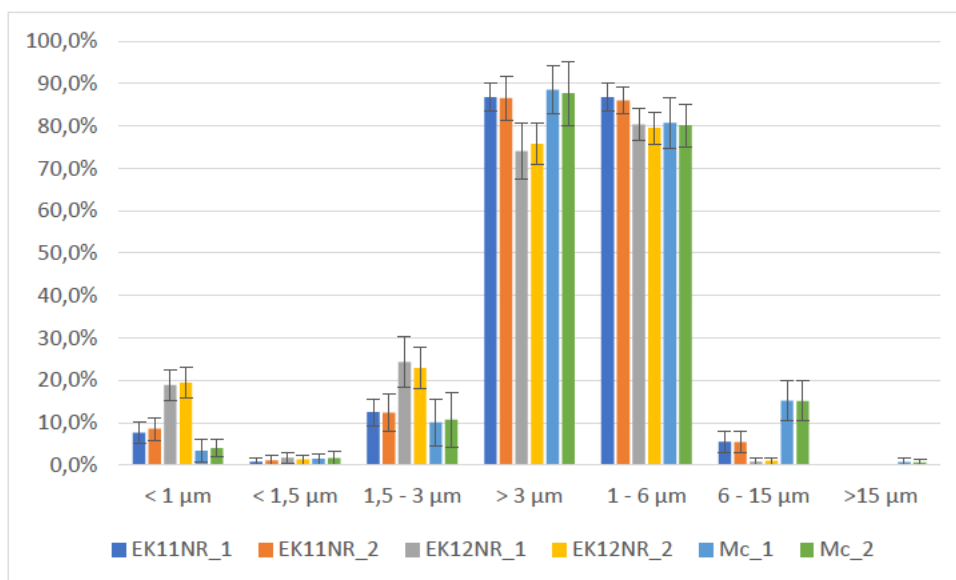


Abbildung 28: Histogramm der Länge der Zellen in den Kulturen EK11NR, EK12NR und *M. congolense* (*Mc*)

Die Kultur EK12NR weist mehr Zellen auf, welche kleiner <1 µm und zwischen 1,5 bis 3 µm sind als die beiden anderen Kulturen. Die Kultur hat eine ähnliche Häufigkeit an Zellen mit der Länge größer 3 µm. Und mehr Zellen in dem Intervall von 1 – 6 µm. Die Kultur *Mc* hat von allen Kulturen den höchsten Anteil von Zellen in dem Intervall von 6 – 15 µm. Im Durchschnitt sind die Zellen der Kultur EK12NR 1,9 µm lang und damit die kürzesten Zellen der drei Kulturen. Die Zellen der Kultur *Mc* sind 3,9 µm lang und sind damit die längsten Zellen. Die Zellen der Kultur EK11NR bilden mit 3,0 µm die Mitte der drei Kulturen. Die Mittelwerte der Länge und die Breite der Zellen der drei Kulturen ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Zellen der Kultur *Mc* sind mit 0,8 µm die Breitesten. An zweiter Stelle sind die Zellen der Kultur EK11NR mit 0,7 µm. Die dünnsten Zellen sind mit 0,5 µm die Zellen der Kultur EK12NR.

Gemäß der Publikation von Cuzin et al. 2001 weist der Typ Strain eine Breite von 0,4 bis 0,5 μm und eine Länge von 2 – 10 μm auf. Die Ergebnisse bezüglich der Länge von *M. congolense* entsprechen den Angaben in der Literatur. Die ermittelte Breite liegt etwas über den Angaben in der Literatur. Das verwendete Medium in der Publikation unterscheidet sich von dem verwendeten HAW Medium in dieser Arbeit. Im Medium der Publikation wurde ein Phosphatpuffer anstelle eines Imidazolpuffers verwendet. Darüber hinaus wurde dem Medium der Publikation neben Kohlenstoffdioxid eine weitere Kohlenstoffquelle in Form von Natriumacetat hinzugegeben (Cuzin et al. 2001). Die Umgebungsbedingungen, sowie eine andere Zusammensetzung des Kulturmediums, könnten einen Einfluss auf die Morphologie haben. Darüber hinaus wurden die Daten in der Publikation mit einem Elektronenmikroskop erfasst und liefern dadurch genauere Ergebnisse.

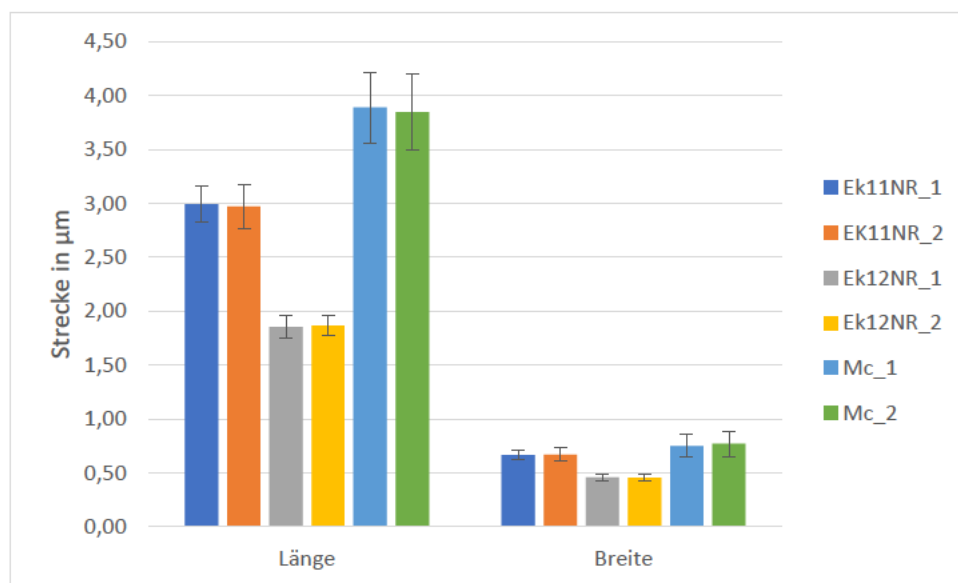


Abbildung 29: Mittelwerte der Breite und Länge der Zellen in den Kulturen EK11NR, EK12NR und *M. congolense* (Mc)

5.4.2 Physiologie

Die physiologischen Daten wurden früher als Ergänzung zu den morphologischen Daten verwendet (Schleifer 2009). Für die weitere Nutzung und Kultivierung der Kulturen sind diese Informationen besonders relevant, da dadurch optimale Wachstumsbedingungen gefunden werden können. Darüber hinaus können mögliche physiologische Unterschiede zu nah verwandten Stämmen oder Arten als weiteres Abgrenzungskriterium entdeckt werden.

5.4.2.1 Temperatur-Optima

Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der Kulturen EK11NR, EK12NR wurde bei den Temperaturen 4, 20, 30, 34, 37, 40, 43, 47, 50, 55 und 60 °C untersucht. Bei der Kultur *M. congolense* wurde die Temperaturen 4 °C und 55 °C nicht betrachtet.

Pro Temperatur wurden drei Kulturen angesetzt. Von diesen drei Kulturen wurde der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahlen aller drei Kulturen und die dazugehörigen pH-Werte sind im Anhang 4 angefügt. Die Physiologie der Kultur *M. congolense* wurde bereits in Publikationen beschrieben und sind daher bekannt. Die Kultur dient unter anderem dazu die Verfahren zu verifizieren. Die Kulturen EK11NR, EK12NR und *M. congolense* weisen kein Wachstum bei 60 °C auf. Die Kultur EK11NR hat einen Wachstumsbereich von 4 °C bis 50 °C (siehe Abbildung 30). Wie sich das Wachstum bei Temperaturen unterhalb von 4 °C verhält wurde nicht untersucht. Die Maximaltemperatur bei dem Wachstum noch stattfindet liegt oberhalb von 50 °C und unterhalb von 55 °C. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C. Die pH-Kurve wird bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C durchgeführt.

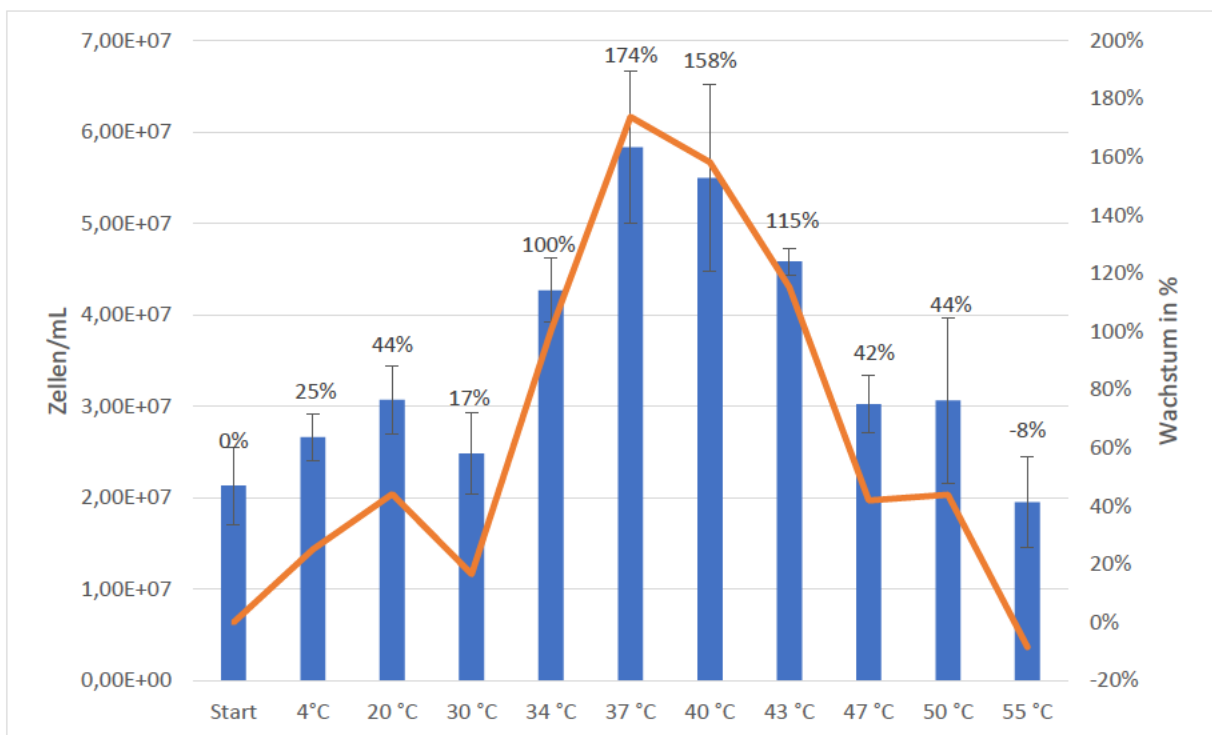


Abbildung 30: Wachstum der Kultur EK11NR im Temperaturbereich von 4 °C bis 55 °C. Dargestellt ist die Zellzahl (blau) und das prozentuale Wachstum (orange) der Kultur.

Die Kultur EK12NR hat einen Wachstumsbereich von 4 °C und 50 °C (siehe Abbildung 31). Das Wachstum bei 4 °C ist mit 67 % relativ hoch, im Gegensatz zur Kultur EK11NR, welche nur ein Wachstum von 25 % bei der Temperatur aufweist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Kultur EK12NR auch noch unterhalb von 4 °C bedingt gut wachsen wird. Im Gegenteil zur

Kultur EK11NR konnte bei der Kultur EK12NR bei 55 °C kein Wachstum detektiert werden. Gleichzeitig weist die Kultur bereits bei 50 °C weniger Wachstum auf. Daher wird die obere Schranke des Wachstumsbereiches von der Kultur EK12NR eher in der Nähe von 50 °C liegen. Die optimale Wachstumstemperatur der Kultur EK12NR liegt ebenfalls bei 37 °C. Die pH-Kurve wird ebenfalls bei 37 °C durchgeführt.

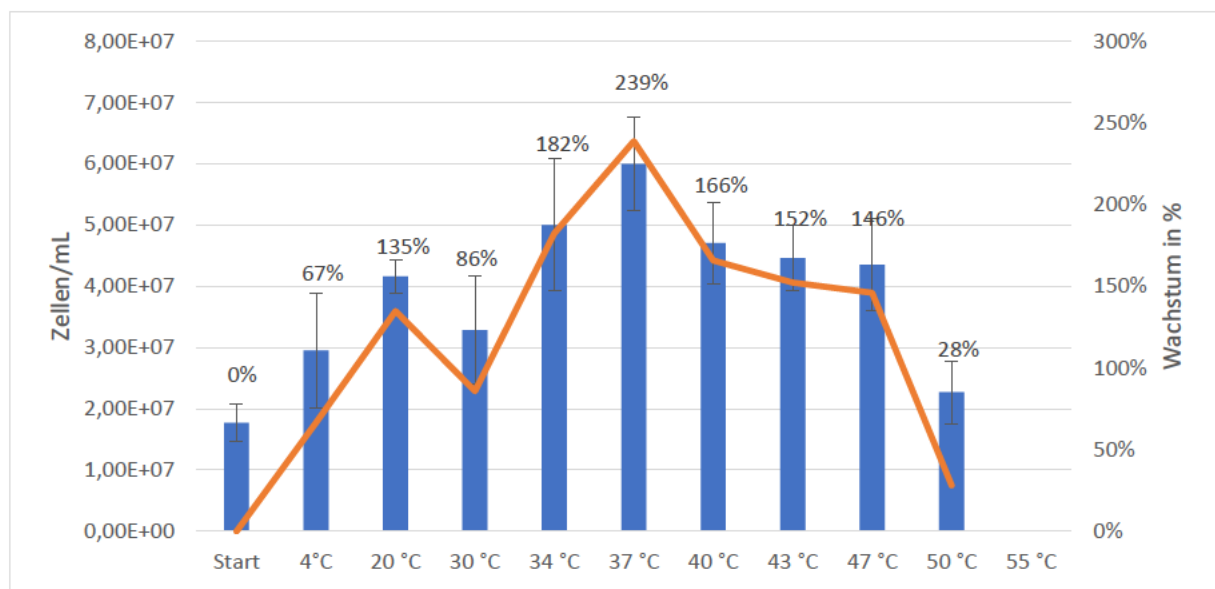


Abbildung 31: Wachstum der Kultur EK12NR im Temperaturbereich von 4 °C bis 55 °C. Dargestellt ist die Zellzahl (blau) und das prozentuale Wachstum (orange).

Die *M. congolense* Kultur weist einen Wachstumsbereich von 20 bis 43 °C auf. In der Literatur wird ein Wachstumsbereich von 25 bis 50 °C angegeben (Cuzin et al. 2001). In dieser Publikation wurde das Wachstum sowohl mit dem Mikroskop als auch über die Methanproduktion ermittelt. Die genauen Zellzahlen als auch die Methanproduktionsraten sind in der Publikation nicht explizit angegeben. Es werden nur der Temperaturbereich und das Optimum der Kultur angegeben. Daher ist nicht ersichtlich, ob es oberhalb von 43 °C noch zu einer Zunahme der Zellzahl kam oder nur Methan produziert wurde. Daher widersprechen die hier ermittelten Daten nicht zwangsläufig der Literatur, obwohl Abweichungen im Wachstumsbereich vorliegen. In der Literatur wird die optimale Wachstumstemperatur mit 37 bis 42 °C angegeben. Gemäß den Daten dieser Arbeit liegt die optimale Wachstumstemperatur bei 37 °C. Diese Temperatur wurde für die pH-Kurve verwendet.

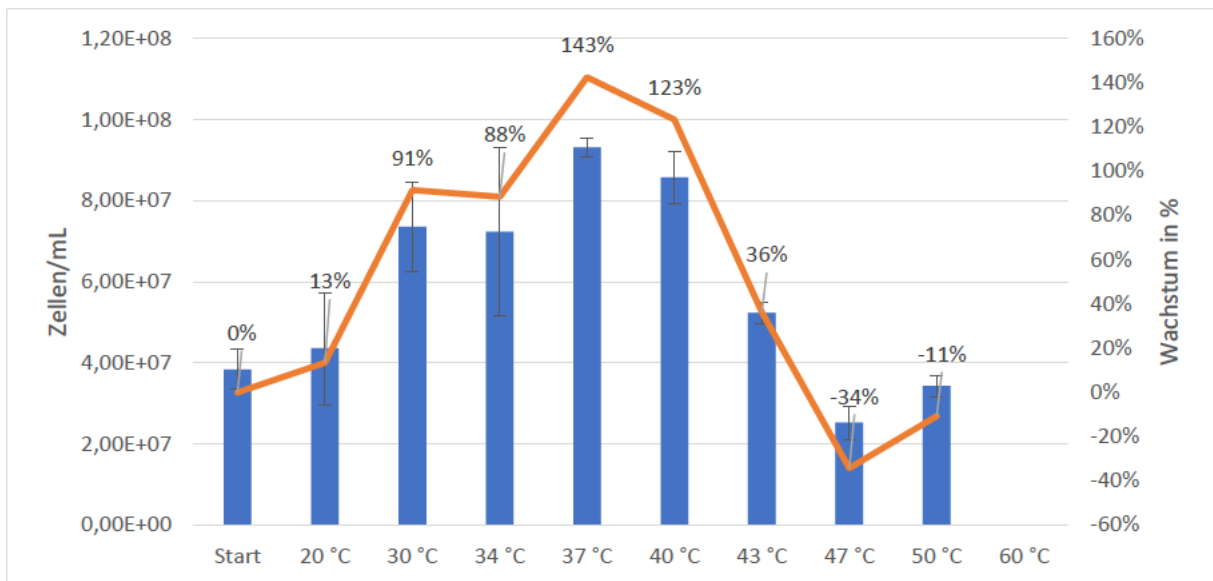


Abbildung 32: Wachstum der Kultur *M. congolense* im Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C. Dargestellt ist die Zellzahl (blau) und das prozentuale Wachstum (orange).

In Abbildung 33 sind alle Temperaturkurven zusammengefügt. Bei der Kultur EK12NR wurde bei der optimalen Wachstumstemperatur mit 239 % das höchste Wachstum beobachtet. *M. congolense* weist mit 143 % das geringste Wachstum auf.

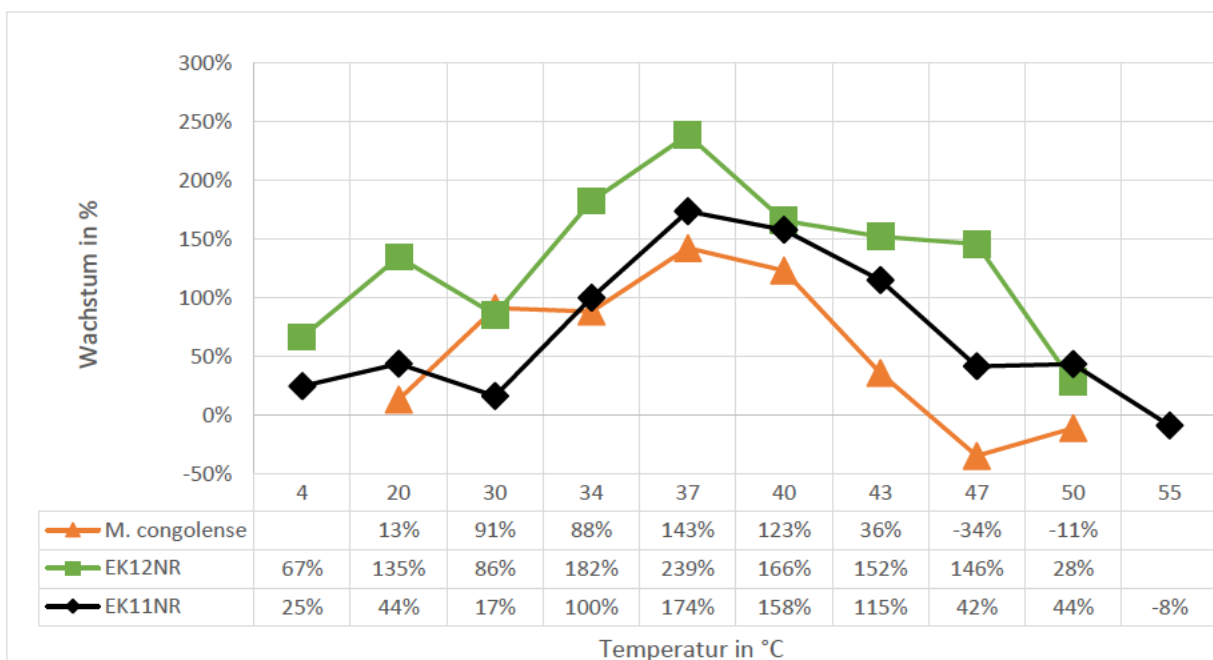


Abbildung 33: Wachstum der drei Kulturen EK11NR, EK12NR und *M. congolense* im Temperaturbereich von 4 °C bis 55 °C

5.4.2.2 pH-Optima

Das HAW Medium enthält einen 20 mM Imidazol Puffer. Die Pufferkapazität war nicht ausreichend um das Absinken des pH-Wertes bei der Zugabe von H₂: CO₂ (80:20) zu verhindern. Daher wurde die Pufferkonzentration auf 100 mM erhöht. Die in 4.1 beschriebene Herstellung des HAW Mediums daraus folgend geändert. Bei der Herstellung wurde kein Imidazol hinzugegeben (siehe Abbildung 3, Schritt 2). Der pH-Puffer wurde erst beim Ansetzen der Kulturen hinzugefügt (siehe 4.11.2). Es wurde ein pH-Bereich von 6 bis 8,5 untersucht. Der Imidazolpuffer wurde für den pH-Bereich von 6,0 bis 7,5, der Tris-HCl-Puffer von pH 7,5 bis 8,5 und der HEPES-Puffer für die pH-Werte 6,5, 7,0, 7,5 und 8 verwendet.

Bei einer Pufferkonzentration von 100 mM war die Pufferkapazität ausreichend, um einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten (siehe Anhang). Lediglich bei den pH-Wert von 7,5 beim Imidazolpuffer und den pH-Wert von 8,5 beim Trispuffer sind größer Abweichungen aufgetreten.

Bei der Pufferkonzentration von 100 mM konnte bei *M. congolense* kaum signifikantes Wachstum ermittelt werden (siehe Anhang 5). Bei der Kultur EK11NR wäre das Optimum bei pH 6 und der Wachstumsbereich würde bis pH 7,5 gehen.

Gemäß der Literatur liegt der optimale pH-Wert von *M. formicicum* zwischen 6,6 und 7,8 (Battumur et al. 2016). Also in dem Bereich in dem EK11NR kein Wachstum aufweist. Gleichzeitig weisen die Ergebnisse der Kultur *M. congolense* auf systematische Probleme der Methode hin. Außerdem wurde bei der gleichen Temperatur und einer Pufferkonzentration von 20 mM bis zu 174 % (EK11NR) bzw. 143 % (*M. congolense*) Wachstum erreicht. Somit wird das eingeschränkte Wachstum auf die veränderte Pufferkonzentration bzw. unterschiedliche Herstellung des Mediums zurückzuführen sein.

Der Imidazolring kann durch anaerobe Organismen reduziert werden. Dadurch entstehen biologisch aktive Produkte. Diese binden an DNA-Regionen, welche reich an Adenin und Thymin sind. Dies hat eine oxidative Spaltung zur Folge, welche bei höheren Konzentrationen zum Tod der Bakterien und Archaeen führen können (Khelaifia und Drancourt 2012).

Die antimikrobielle Wirkung von Stoffen ist konzentrationsabhängig, sodass sie bei einer Konzentration von 100 mM das Wachstum hemmen können. Gleichzeitig können die Stoffe bei 20 mM keinen signifikanten Effekt haben. Eine vergleichbare Wirkung ist für Tris-HCl nicht bekannt, daher kann dieser Einfluss nicht der Hauptgrund für das eingeschränkte Wachstum sein. Zum Einstellen der pH-Werte der pH Puffer wurden NaOH und HCl verwendet. Diese Ionen werden bei der normalen Mediumherstellung 1:100 verdünnt. Bei der alternativen Herstellung werden diese nur 1:10 verdünnt und liegen somit in weitaus höherer Konzentration im Medium vor.

Um den direkten und indirekten Einfluss der erhöhten Pufferkonzentration zu verringern, wurde die Pufferkonzentration auf 50 mM herabgesetzt. Wie in Anhang 6 zu sehen, reichte die Pufferkapazität nicht aus, um den pH-Wert stabil zu halten. Lediglich die pH-Werte 6; 6,5 und 7,0 beim Imidazolpuffer und pH 8,0 beim Trispuffer zeigten eine gewisse Stabilität. Darüber hinaus hatte die Veränderung in der Herstellung des Mediums (Herstellung und Zusammensetzung) auch in der Änderung noch einen signifikanten negativen Einfluss. Dennoch gab es ein leichtes Wachstum der Kulturen (siehe Abbildung 34 bis Abbildung 36).

In Abbildung 34 ist die pH-Kurve der Kultur EK11NR dargestellt. Die Kultur EK11NR wies ein Wachstum zwischen den pH-Werten 6,5 und 8 auf. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass bei pH 6 und pH 8,1 (als pH 8,5 angesetzt) kein Wachstum vorlag. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen pH 6,5 und 7. Diese Werte passen zu der Literatur des Typen Stammes *M. formicicum*. Dort wird ein Optimum bei pH 6,6 bis 7,8 angegeben (Battumur et al. 2016). Einerseits wurde in der Literatur ein anderes Medium verwendet, andererseits handelt es sich bei EK11NR zwar um *M. formicicum*, aber wahrscheinlich nicht um den Typ Stamm.

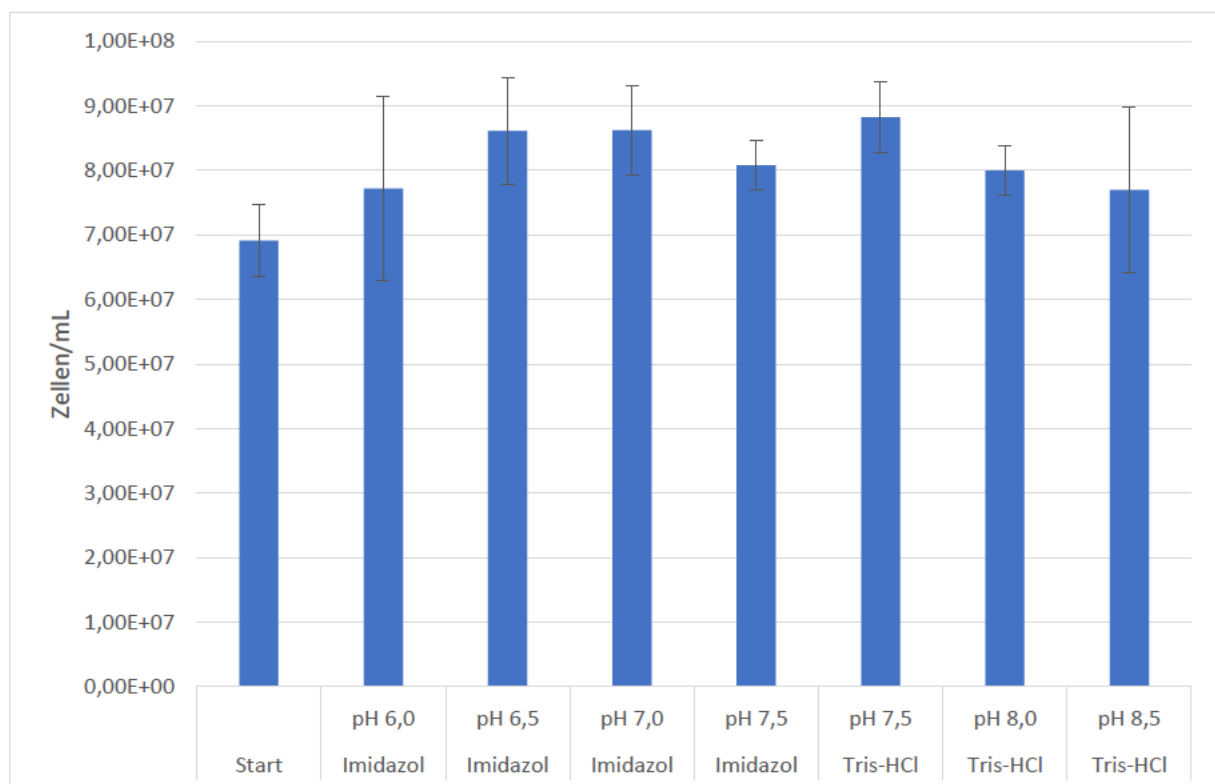


Abbildung 34: Wachstum der Kultur EK11NR im pH-Bereich von 6 bis 8,5 bei einer Pufferkonzentration von 50 mM. Es wurden Imidazolpuffer für den pH-Bereich 6 bis 7,5 und Tris-HCl Puffer für den pH-Bereich 7,5 bis 8,5 verwendet.

In Abbildung 35 ist die pH-Kurve der Kultur EK12NR dargestellt. In Anhang 6 sind die Zellzahlen der einzelnen Ansätze dargestellt. Die Zellzahlen der Ansätze pH 7 K2, pH 7 K3 und pH 7,5 Tris-HCl wurden aus der Berechnung ausgeschlossen, da die Serumröhrchen dieser Ansätze undicht waren. Es wurde über den gesamten Bereich ein Wachstum der Kultur festgestellt. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,5 und 7,5 im Imidazolpuffer. Die Werte deuten auf

ein Optimum bei pH 7 hin, dennoch besteht dieser Wert nur aus einem Wert, statt aus drei Werten, da die anderen Röhren undicht waren. Dieser Versuch müsste wiederholt werden. EK12NR unterscheidet sich somit nicht von EK11NR in Bezug auf den pH-Bereich.

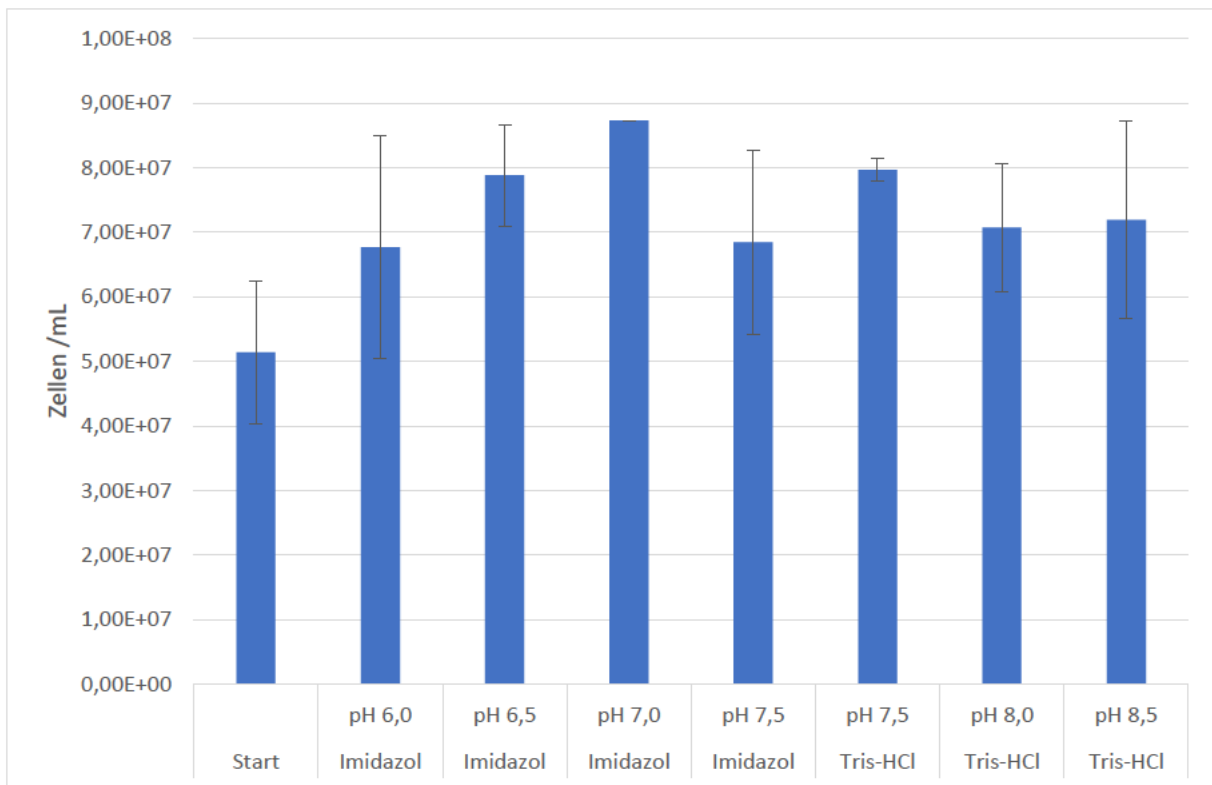


Abbildung 35: Wachstum der Kultur EK12NR im pH-Bereich von 6 bis 8,5 bei einer Pufferkonzentration von 50 mM. Es wurden Imidazolpuffer für den pH-Bereich 6 bis 7,5 und Tris-HCl Puffer für den pH-Bereich 7,5 bis 8,5 verwendet.

In Abbildung 36 ist die pH-Kurve der *M. congolense* Kultur dargestellt. Bei den pH-Werten 6,0 und 6,5 ist kein Wachstum beobachtet worden, sondern ein Abfallen der Zellzahl. Bei den anderen untersuchten pH-Werten weist die Kultur ein positives Wachstum auf. Somit wird der Wachstumsbereich zwischen pH 7,0 und pH 8,0 (Soll von pH 8,5) liegen. Das Wachstum auf dem Tris Puffer liegt über dem Wachstum auf dem Imidazolpuffer. Das Wachstumsoptimum liegt bei einem pH von 7,5 (welches am Ende des Versuchs bei pH 7,3 lag). In der Literatur wird ein optimaler pH-Wert von 7,2 angegeben und ein Wachstumsbereich von pH 5,9 bis 8,2 (Cuzin et al. 2001). Der optimale pH-Wert und die obere Grenze des Wachstumsbereichs stimmt mit den Literaturwerten überein. Bei der unteren Wachstumsgrenze gibt es Abweichungen zwischen den vorliegenden Daten und der Literatur. Jedoch ist in der Literatur nicht klar erkennbar inwiefern das Wachstum mikroskopisch bestimmt wurde und wie stark die Methanproduktion gewichtet wurde. Je nach verwendetem Medium ist außerdem der Einfluss auf Parameter wie pH- und Temperaturoptima signifikant.

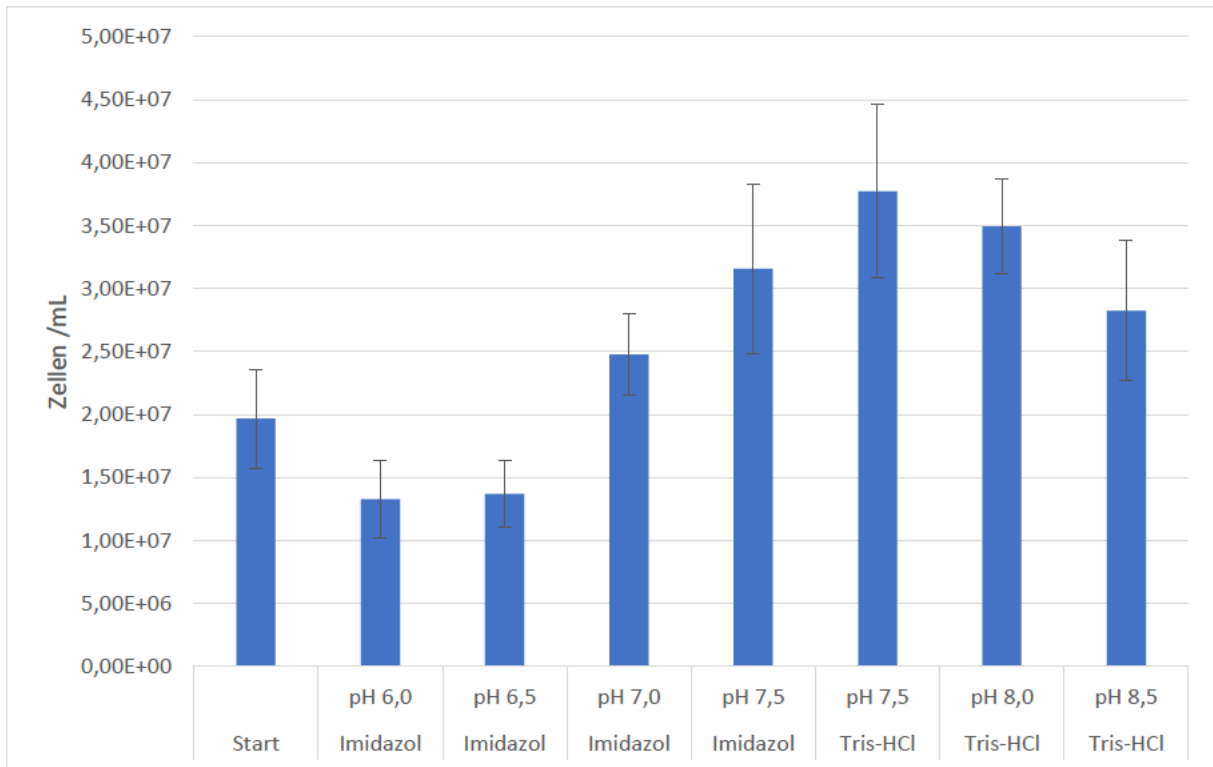


Abbildung 36: Wachstum der *M. congolense* Kultur im pH-Bereich von 6 bis 8,5 bei einer Pufferkonzentration von 50 mM. Es wurden Imidazolpuffer für den pH-Bereich 6 bis 7,5 und Tris-HCl Puffer für den pH-Bereich 7,5 bis 8,5 verwendet.

Imidazol könnte einen negativen Effekt auf das Wachstum haben (siehe Abbildung 36). Um diesen möglichen Effekt zu umgehen, wurde Imidazol durch HEPES ersetzt. Dieser Ansatz liefert nur bedingt verwertbare Ergebnisse (siehe Anhang 7).

HEPES hat einen Einfluss auf die Medienbestandteile. Sobald der pH-Wert oberhalb von 7 liegt, fällt das Medium aus. Bei einem pH-Wert von 6,9 ist der Phasenkontrast klar, bei einem pH-Wert von 7,1 sind ausgefallene Medienbestandteile zu erkennen (siehe Abbildung 37). Bei steigenden pH-Werten sinkt der pH-Wert durch die Zugabe von H_2/CO_2 (80:20) immer stärker ab (siehe Anhang 7). HEPES eignet sich maximal für den pH-Bereich 6,5 bis 7, da bei diesen pH-Werten keine Medienbestandteile ausfallen und der pH-Wert stabiler gehalten wird. Dennoch puffert der HEPES Puffer nicht so gut wie der Imidazolpuffer.

In vielen Publikationen werden Phosphatpuffer verwendet. Diese Puffer weisen einen Pufferbereich von 5,8 bis 8,0 auf (ITW Reagents). Viele Methanogene haben ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7 (Burdukiewicz et al. 2018). Somit würde sich ein Phosphatpuffer für die pH-Untersuchung eignen. Dennoch fallen Medienbestandteile des HAW-Mediums aus, wenn ein Phosphatpuffer bei der Herstellung verwendet wird. Daher eignet sich ein Phosphatpuffer nicht in Verbindung mit dem HAW Medium.

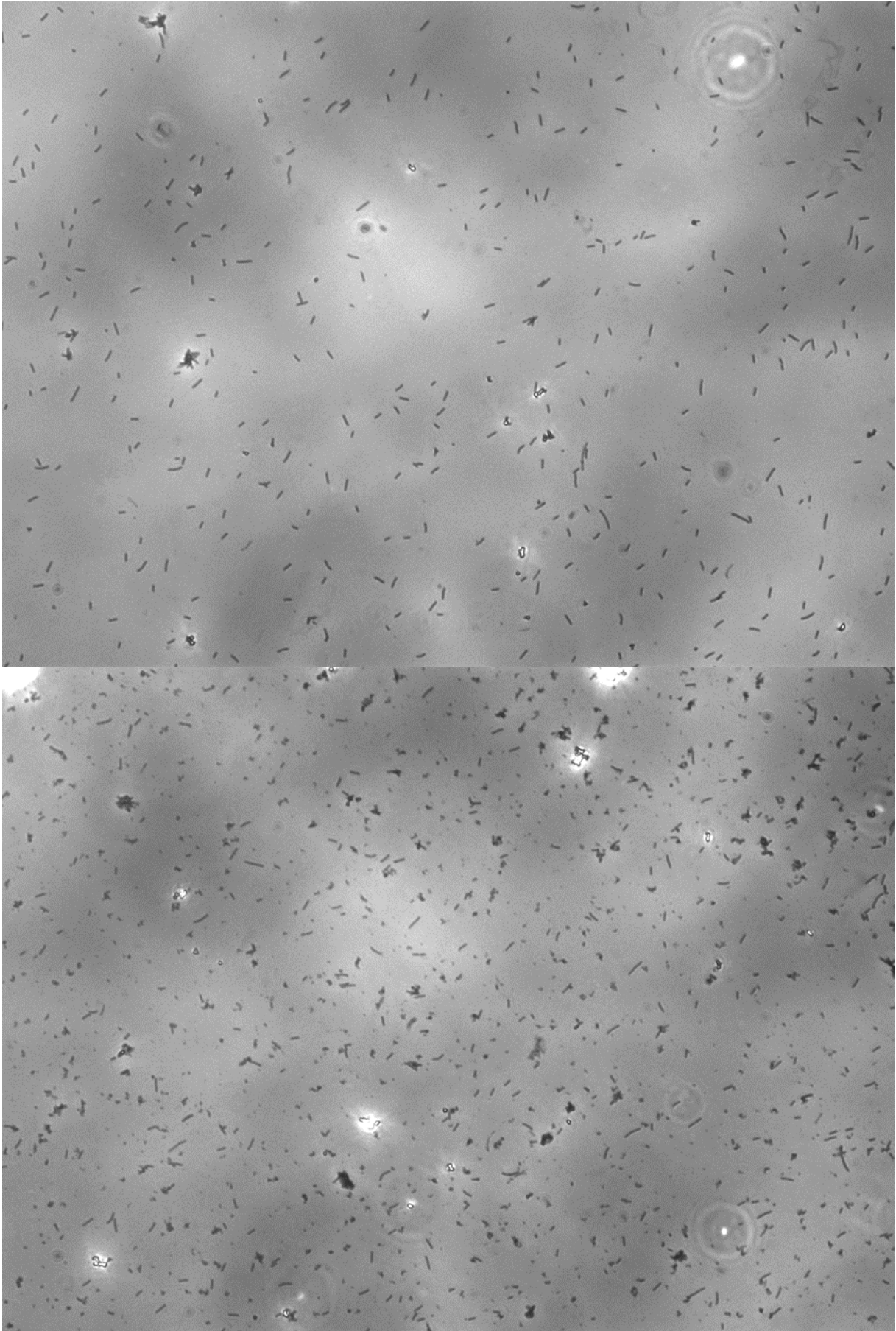


Abbildung 37: Phasenkontrast des HAW Mediums mit 50 mM HEPES Puffer. Oben hat das Medium einen pH-Wert von 6,92 und unten einen pH-Wert von 7,09. In der unteren Abbildung sind Bestandteile des Mediums ausgefallen.

5.5 Ergebnistabelle

Die Ergebnisse des Sangerverfahrens, der Morphologie und der Physiologie der Kulturen EK11NR, EK12NR, *M. congolense* und *M. formicicum* sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Der Typ Stamm *M. formicicum* wuchs nicht auf dem HAW Medium, daher werden die Daten aus der Publikation von Battumur et al. 2016 entnommen. Die Kulturen EK11NR unterschieden sich in ihrer Morphologie von der Kultur *M. congolense*. Die Kulturen EK11NR und EK12NR sind mit einer durchschnittlichen Länge von 3,0 μm bzw. 1,9 μm kürzer als die Zellen der Kultur *M. congolense*, welche im Durchschnitt 3,9 μm lang sind. Sie gleichen *M. formicicum* sowohl in der Länge als auch in der Breite. Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede der Kulturen EK11NR und EK12NR werden im Folgenden aufgezählt.

Die Kulturen EK11NR und EK12NR weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf und können H_2 nutzen. Eine derartige Morphologie und gleichzeitige die Fähigkeit H_2 nutzen zu können, weisen Vertreter der Gattungen *Methanothermobacter*, *Methanothermus*, *Methanopyrus*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanomicrobium*, *Methanolacinia* und *Methanobacterium* auf. Die Gattungen *Methanothermobacter*, *Methanothermus* und *Methanopyrus* sind thermophile bzw. hyperthermophile Methanogene (Boone 2015). Die Kulturen EK11NR und EK12NR sind mit einem Temperaturoptimum von 37 °C mesophile Methanogene und gehören somit nicht zu den Vertretern dieser Gattungen. Die Vertreter der Gattungen *Methanospirillum*, *Methanomicrobium* und *Methanolacinia*, welche die oben genannten Parameter erfüllen, sind im Gegensatz zu den Vertretern der Gattung *Methanobacterium mobil*. Die Zellen der Kulturen EK11NR und EK12NR weisen keine sichtbare Mobilität auf (Boone 2015). Die stäbchenförmigen Zellen der Vertreter der Gattung *Methanobrevibacter* sind mit 0,8 – 1,4 μm Länge kürzer als die Zellen der Gattung *Methanobacterium*. Diese Ergebnisse bestätigen die Zuordnung der Kulturen EK11NR und EK12NR als Vertreter der Gattung *Methanobacterium* durch das Sangerverfahren.

In den physiologischen Untersuchungen gibt es in den Wachstumsbereichen und Wachstumsoptima bezogen auf Temperatur und pH-Wert keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen. Dennoch verhalten sich die Kulturen bei den untersuchten Temperaturen nicht identisch.

Tabelle 24: Ergebnistabelle. Angaben zum *M. formicicum* gemäß Battumur et al. 2016

Charakterisierung	EK11NR	EK12NR	<i>M. congolense</i>	<i>M. formicicum</i>
Gattung	Methanobacterium	Methanobacterium	Methanobacterium	Methanobacterium
Spezies	formicicum	formicicum	congolense	formicicum
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Zellbreite (µm)	0,67	0,46	0,75 - 0,77	0,4 - 0,8
Zelllänge (µm)	2,97 - 2,99	1,85 - 1,87	3,84 - 3,89	2,0 - 15,0
< 1 µm	7,7 - 8,6 %	18,9 - 19,5 %	3,4 - 4,0 %	
1 - 6 µm	85,9 - 86,7 %	79,5 - 80,3 %	80,2 - 80,7 %	
6 - 15 µm	5,4 - 5,5 %	0,8 - 1,0 %	15,1 - 15,2 %	
> 15 µm	0,0 - 0,1 %	0,00%	0,7	
< 1,5 µm	0,8 - 1,1 %	1,3 - 1,7 %	1,5 - 1,6 %	
1,5 - 3 µm	12,4 - 12,5 %	22,9 - 24,2 %	10,1 - 10,7 %	
> 3 µm	86,5 - 86,7 %	74,0 - 75,8 %	87,7 - 88,5 %	
Wachstum				
Temperaturbereich (°C)	4 - 50	4 - 50	20 - 43	-
Temperaturoptimum (°C)	37	37	37	37 - 45
pH-Bereich	6,5 - 8,0	6,0 - 8,0	7,0 - 8,5	-
pH-Optimum	6,5 - 7,0	6,5 - 7,5	7,3	6,6 - 7,8

6 Zusammenfassung

6.1 Isolierung

Es wurden vier hoch angereicherte Kulturen isoliert. Die Kulturen EK1PA und EK2PA scheinen frei von Bakterien zu sein, dennoch können diese mehrere Archaeenstämme enthalten. Die Kulturen EK11NR und EK12NR sind stark angereicherte Archaeenkulturen, welche aber immer noch Bakterien aufweisen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kulturen mehrere Archaeenstämme enthalten können. Die Primer A1000r und A337f binden selektiv an einen Bereich der 16S rRNA von Archaeen. Durch eine Elektrophorese des PCR Produktes lässt sich nur aussagen, ob Archaeen vorhanden sind, nicht wie viele unterschiedliche Stämme. Das nachfolgende Sangerverfahren bestätigt die Annahme, dass nur ein Archaeenstamm in der Kultur vorhanden ist. Dennoch ist es möglich, dass die Kultur mehrere Unterarten des Archaeensstammes *M. formicium* enthält. Um dies auszuschließen könnte die gesamte 16S rRNA oder die *mcrA* Gene untersucht werden. Aufgrund des Isolierungsverlaufes der beiden Kulturen könnte es sich in den Kulturen um die gleichen Stämme handeln. Dieser Annahme widersprechen die Ergebnisse des Sangerverfahrens, da sich die Sequenzen dieser beiden Kulturen etwas unterscheiden.

Die Kulturen EK11NR und EK12NR stammen aus den Isolierungsansätzen, in welchen eine Spannung genutzt wurde. Theoretisch sollte, unter der Verwendung der Elektromethanogenese, ein Vorteil bei der Isolierung bzw. eine Verkürzung der benötigten Zeit bis zu Reinkultur erreicht werden. Ein solcher Effekt konnte nicht bestätigt werden, zumindest nicht aufgrund der Elektromethanogenese. Dennoch kann die Isolierungsmethode mit Spannung einen Vorteil gegenüber der klassischen Isolierungsmethode haben. Dieser Vorteil würde darauf beruhen, dass die Methanogenen die Zeit ohne Stoffwechsel besser überstehen als die Bakterien. Um diese Annahme zu bestätigen, müsste untersucht werden, inwiefern sich das Wachstum der Begleitorganismen der Umweltprobe verändert, wenn der Stoffwechsel für eine gewissen Zeitspanne ausgesetzt ist.

6.2 Charakterisierung

Die beiden Kulturen EK11NR und EK12NR sind nicht die gleichen Stämme. Sie zeigen signifikante Unterschiede in dem untersuchten 16S rRNA Fragment, der Morphologie und der Physiologie. Gleichzeitig weisen beide Kulturen auch Unterschiede zum Typ Stamm *M. formicium* auf, obwohl die Analyse des Sangerverfahrens diese als eben diesen Organismus ausweist. Der größte Unterschied sind die unterschiedliche Anforderungen an das Kulturmedium. Die

Kulturen EK11NR und EK12NR können im HAW Medium wachsen, der Typ Stamm *M. formicicum* ist dazu, bei aktueller Zusammensetzung des HAW Mediums, nicht in der Lage. Dementsprechend kann es sich bei den Kulturen EK11NR und EK12NR wahrscheinlich um zwei unterschiedliche Stämme der Spezies *M. formicicum* handeln.

7 Literaturverzeichnis

Abendroth, Christian; Vilanova, Cristina; Günther, Thomas; Luschig, Olaf; Porcar, Manuel (2015): Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. In: *Biotechnology for biofuels* 8, S. 87. DOI: 10.1186/s13068-015-0271-6.

Adam, Panagiotis S.; Borrel, Guillaume; Brochier-Armanet, Céline; Gribaldo, Simonetta (2017): The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. In: *The ISME journal* 11 (11), S. 2407–2425. DOI: 10.1038/ismej.2017.122.

Aydin, Sevcan; Cetecioglu, Zeynep; Arikan, Osman; Ince, Bahar; Ozbayram, E. Gozde; Ince, Orhan (2015): Inhibitory effects of antibiotic combinations on syntrophic bacteria, homoacetogens and methanogens. In: *Chemosphere* 120, S. 515–520. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.045.

Balat, M.; Balat, H. (2009): Biogas as a Renewable Energy Source—A Review. In: *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 31 (14), S. 1280–1293. DOI: 10.1080/15567030802089565.

Battumur, Urantulkuur; Yoon, Young-Man; Kim, Chang-Hyun (2016): Isolation and Characterization of a New Methanobacterium formicicum KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. In: *Asian-Australasian journal of animal sciences* 29 (4), S. 586–593. DOI: 10.5713/ajas.15.0507.

Bibra, Mohit; Wang, Jia; Squillace, Phillip; Pinkelman, Rebecca; Papendick, Sam; Schneiderman, Steven et al. (2015): Biofuels and Value-added Products from Extremophiles.

Boone, David R. (2015): Methanobacterium. In: William B. Whitman, Fred Rainey, Peter Kämpfer, Martha Trujillo, Jonsik Chun, Paul DeVos et al. (Hg.): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: Wiley, S. 1–8.

Burdukiewicz, Michał; Przemysław, Gagat; Sławomir, Jabłoński; Chilimoniuk, Jarosław; Gaworski, Michał; Mackiewicz, Paweł; Łukaszewicz, Marcin (2018): PhyMet2 : a database and toolkit for phylogenetic and metabolic analyses of methanogens. In: *Environmental microbiology reports* 10 (3), S. 378–382. DOI: 10.1111/1758-2229.12648.

Cai, Weiwei; Liu, Wenzong; Yang, Chunxue; Wang, Ling; Liang, Bin; Thangavel, Sangeetha et al. (2016): Biocathodic Methanogenic Community in an Integrated Anaerobic Digestion and Microbial Electrolysis System for Enhancement of Methane Production from Waste Sludge. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4 (9), S. 4913–4921. DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b01221.

Cavicchioli, Ricardo (2011): Archaea--timeline of the third domain. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (1), S. 51–61. DOI: 10.1038/nrmicro2482.

- Cheng, D. L.; Ngo, H. H.; Guo, W. S.; Chang, S. W.; Nguyen, D. D.; Kumar, S. Mathava et al. (2018): Problematic effects of antibiotics on anaerobic treatment of swine wastewater. In: *Bio-resource technology* 263, S. 642–653. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.010.
- Cuzin, N.; Ouattara, A. S.; Labat, M.; Garcia, J. L. (2001): *Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51 (Pt 2), S. 489–493. DOI: 10.1099/00207713-51-2-489.
- DeLong, Edward F.; Pace, Norman R. (2001): Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. In: *Systematic Biology* 50 (4), S. 470–478. DOI: 10.1080/10635150118513.
- Doddema, H. J.; Vogels, G. D. (1978): Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. In: *American Society for Microbiology Journals* 36 (5), S. 752–754.
- Dombrowski, Nina; Lee, Jun-Hoe; Williams, Tom A.; Offre, Pierre; Spang, Anja (2019): Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. In: *FEMS microbiology letters* 366 (2). DOI: 10.1093/femsle/fnz008.
- Dragan, A. I.; Pavlovic, R.; McGivney, J. B.; Casas-Finet, J. R.; Bishop, E. S.; Strouse, R. J. et al. (2012): SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. In: *Journal of fluorescence* 22 (4), S. 1189–1199. DOI: 10.1007/s10895-012-1059-8.
- Ferry, J. G. (1992): Biochemistry of methanogenesis. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 27 (6), S. 473–503. DOI: 10.3109/10409239209082570.
- Geppert, Florian; Liu, Dandan; van Eerten-Jansen, Mieke; Weidner, Eckhard; Buisman, Cees; Heijne, Annemiek ter (2016): Bioelectrochemical Power-to-Gas: State of the Art and Future Perspectives. In: *Trends in biotechnology* 34 (11), S. 879–894. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.08.010.
- Grinter, Rhys; Greening, Chris (2021): Cofactor F420: an expanded view of its distribution, biosynthesis, and roles in bacteria and archaea. In: *FEMS microbiology reviews*. DOI: 10.1093/femsre/fuab021.
- Hassa, Julia; Maus, Irena; Off, Sandra; Pühler, Alfred; Scherer, Paul; Klocke, Michael; Schlüter, Andreas (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 102 (12), S. 5045–5063. DOI: 10.1007/s00253-018-8976-7.
- Haumaier, Julian; Hauser, Philipp; Hobbie, Hannes; Möst, Dominik (2020): Grünes Gas für die Gaswirtschaft – Regionale Power-to-Gas-Potentiale aus Onshore-Windenergie in Deutschland. In: *Z Energiewirtschaft* 44 (2), S. 61–83. DOI: 10.1007/s12398-020-00274-w.

Hilpert, R.; Winter, J.; Hammes, W.; Kandler, O. (1981): The sensitivity of archaeobacteria to antibiotics. In: *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 2 (1), S. 11–20. DOI: 10.1016/S0721-9571(81)80014-2.

ITW Reagents: Biologische Puffer - Übersicht. Online verfügbar unter https://www.itwreagents.com/germany/de/gb-bb_puffer-de, zuletzt geprüft am 03.01.2022.

Jabłoński, Sławomir; Rodowicz, Paweł; Łukaszewicz, Marcin (2015): Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65 (Pt 4), S. 1360–1368. DOI: 10.1099/ijs.0.000065.

Khelaifia, S.; Drancourt, M. (2012): Susceptibility of archaea to antimicrobial agents: applications to clinical microbiology. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (9), S. 841–848. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03913.x.

Kim, Minseok; Morrison, Mark; Yu, Zhongtang (2011): Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. In: *Journal of microbiological methods* 84 (1), S. 81–87. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.10.020.

Kim, Yong Sung; Westerholm, Maria; Scherer, Paul (2014): Dual investigation of methanogenic processes by quantitative PCR and quantitative microscopic fingerprinting. In: *FEMS microbiology letters* 360 (1), S. 76–84. DOI: 10.1111/1574-6968.12592.

Kohanski, Michael A.; Dwyer, Daniel J.; Collins, James J. (2010): How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (6), S. 423–435. DOI: 10.1038/nrmicro2333.

Lambrecht, Johannes; Cichocki, Nicolas; Hübschmann, Thomas; Koch, Christin; Harms, Hauke; Müller, Susann (2017): Flow cytometric quantification, sorting and sequencing of methanogenic archaea based on F420 autofluorescence. In: *Microbial cell factories* 16 (1), S. 180. DOI: 10.1186/s12934-017-0793-7.

Lee, Beom; Park, Jun-Gyu; Shin, Won-Beom; Tian, Dong-Jie; Jun, Hang-Bae (2017): Microbial communities change in an anaerobic digestion after application of microbial electrolysis cells. In: *Bioresourcetechnology* 234, S. 273–280. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.022.

Lee, Pei Yun; Costumbrado, John; Hsu, Chih-Yuan; Kim, Yong Hoon (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (62). DOI: 10.3791/3923.

Longin, A.; Souchier, C.; Ffrench, M.; Bryon, P. A. (1993): Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. In: *The*

journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 41 (12), S. 1833–1840. DOI: 10.1177/41.12.8245431.

Luton, Philip E.; Wayne, Jonathan M.; Sharp, Richard J.; Riley, Paul W. (2002): The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. In: *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 11), S. 3521–3530. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3521.

McInerney, Michael J.; Sieber, Jessica R.; Gunsalus, Robert P. (2009): Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. In: *Current opinion in biotechnology* 20 (6), S. 623–632. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.10.001.

Scherer, P.; Neumann, L.; Kim, Y. S. (2012): Schnellmethode zur biologischen Aktivitätsbestimmung in Biogasanlagen: Quantitativer mikroskopischer Fingerabdruck (QMF). In: *Bornimer Agrartechnische Berichte* (79), S. 34–44.

Schleifer, Karl Heinz (2009): Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. In: *Systematic and Applied Microbiology* 32 (8), S. 533–542. DOI: 10.1016/j.syapm.2009.09.002.

Stute, Andreas (2015): Konzept der Biogasanlage. In: Andreas Stute (Hg.): Biogasanlagen im Handels- und Steuerrecht. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, S. 1–5.

Sun, Yihua; Liu, Yang; Pan, Jie; Wang, Fengping; Li, Meng (2020): Perspectives on Cultivation Strategies of Archaea. In: *Microbial ecology* 79 (3), S. 770–784. DOI: 10.1007/s00248-019-01422-7.

Thauer, Rudolf K. (2012): The Wolfe cycle comes full circle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (38), S. 15084–15085. DOI: 10.1073/pnas.1213193109.

Thauer, Rudolf K.; Kaster, Anne-Kristin; Seedorf, Henning; Buckel, Wolfgang; Hedderich, Reiner (2008): Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. In: *Nature reviews. Microbiology* 6 (8), S. 579–591. DOI: 10.1038/nrmicro1931.

Weizsäcker, Carl Christian von; Lindenberger, Dietmar; Höffler, Felix (2016): Interdisziplinäre Aspekte der Energiewirtschaft. Wiesbaden: Springer Vieweg (Energie in Naturwissenschaft, Technik, Wirtschaft und Gesellschaft).

Wen, Xi; Yang, Sizhong; Horn, Fabian; Winkel, Matthias; Wagner, Dirk; Liebner, Susanne (2017): Global Biogeographic Analysis of Methanogenic Archaea Identifies Community-Shaping Environmental Factors of Natural Environments. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1339. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01339.

Woese, C. R.; Magrum, L. J.; Fox, G. E. (1978): Archaeobacteria. In: *Journal of molecular evolution* 11 (3), S. 245–251. DOI: 10.1007/BF01734485.

Xu, Heng; Giwa, Abdulmoseen Segun; Wang, Cuiping; Chang, Fengmin; Yuan, Quan; Wang, Kaijun; Holmes, Dawn E. (2017): Impact of Antibiotics Pretreatment on Bioelectrochemical CH₄ Production. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5 (10), S. 8579–8586. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b00923.

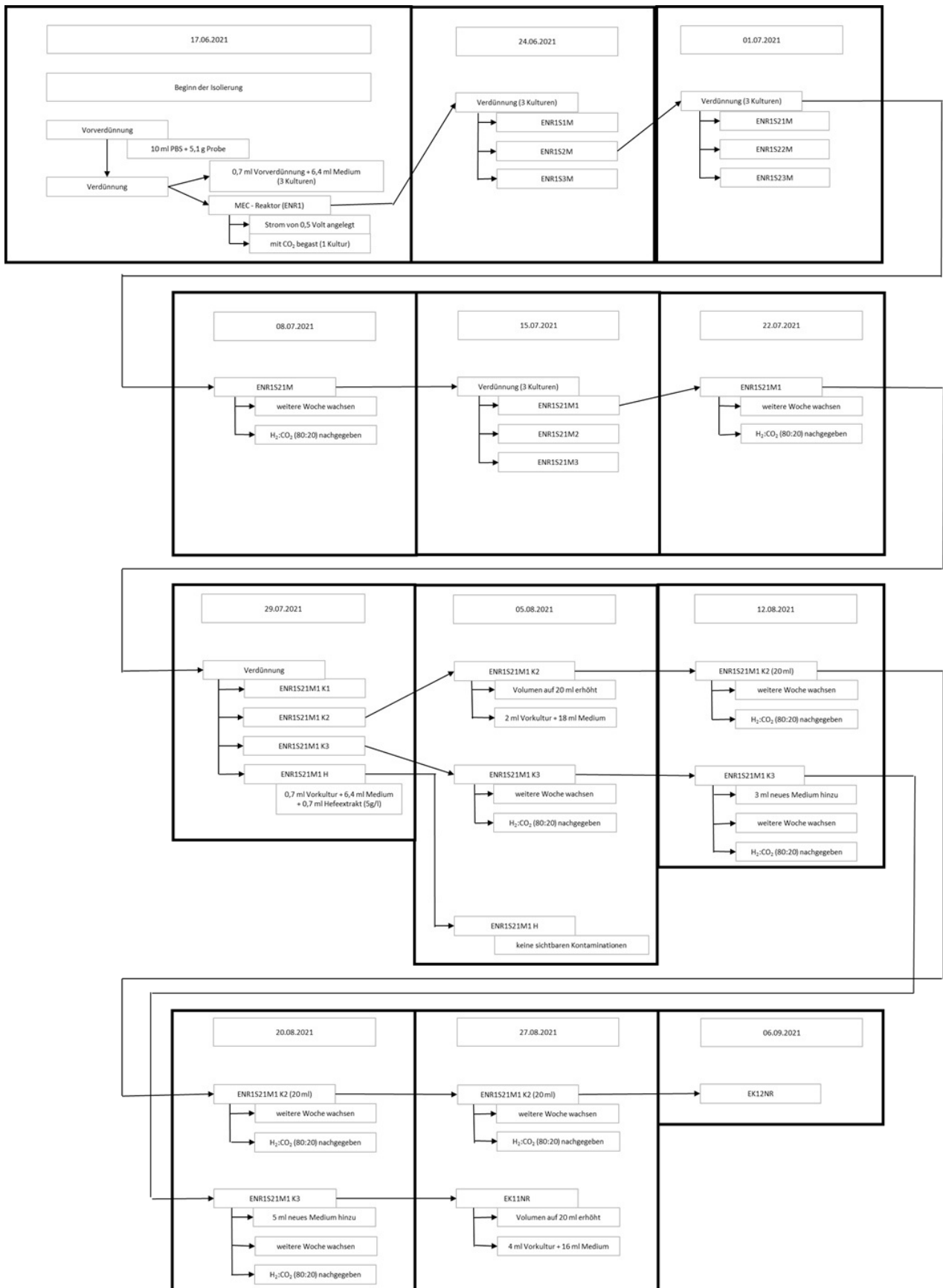
8 Anhang

8.1 Anhang 1

Timeline der Kulturen, welche aus der Sedimentprobe vom Peenestrom (PA) isoliert wurden



Timeline der Kulturen, welche aus dem Nachgärer (NR) der Biogasanlage Reitbrook isoliert wurden



8.2 Anhang 2

Sequenzen von EK11NR und EK12NR (5'-3')

>EK11NR

TTCCAGGCGGTGGACTTAACAGCTTCCCTTCGGCACTGGGGCAGCTCGGAGCCATCCC
AACACCAAGTCCACATCGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGCGC
CCCTGGCTTTCGTTACTCACCGTCAGGTCCGTTCCAGTTAGCCGCCTTCGCCACAGGTG
GTCCTCCCGGGATTATAGGATTTACCCCTACCCCGGGAGTACCGCTAACCTCTCCCG
GCCTCAAGCCTAATAGTATCTCCAGCAATTCTCACGGTTAAGCCGTGAGATTTACCAG
AGACTTATCAAGCCGGCTACGAACGCTTTAGGCCCAATAAAAACGGCCACCACTTGAGC
TGCCGGTGTTACCGCGGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCAGCTCTTATTCCAAAAGCTT
TTTACACTTAAGAAAAGCCACCCCGTTAAGAGTGGCACTTGGGTTTCCCCCGTCGCACT
TTCGTGCATTGCGGAGGTTTCGCGC

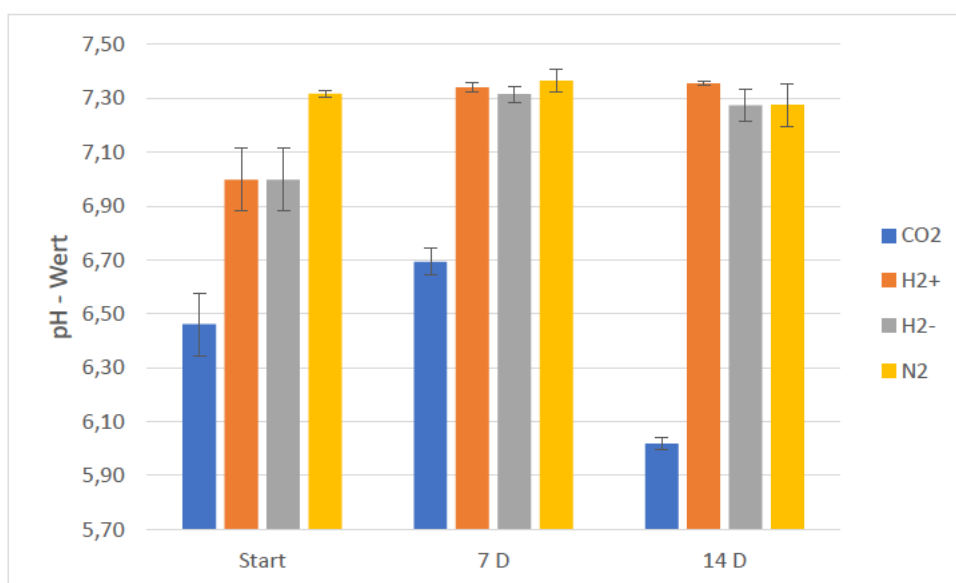
>EK12NR

GGCGGTGGACTTAACAGCCTTCCCTTACGGCACTGGGGCAGCTCGGAGCCATCCCAAC
ACCAAGTCCACATCGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGCGCCC
CTGGCTTTCGTTACTCACCGTCAGGTCCGTTCCAGTTAGCCGCCTTCGCCACAGGTGGT
CCTCCCGGGATTATAGGATTTACCCCTACCCCGGGAGTACCGCTAACCTCTCCCGGC
CTCAAGCCTAATAGTATCTCCAGCAATTCTCACGGTTAAGCCGTGAGATTTACCAGAG
ACTTATCAAGCCGGCTACGAACGCTTTAGGCCCAATAAAAACGGCCACCACTTGAGCTG
CCGGTGTTACCGCGGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCAGCTCTTATTCCAAAAGCTTTTT
ACACTTAAGAAAAGCCACCCCGTTAAGAGTGGCACTTGGGTTTCCCCCGTCGCACTTTC
GTGCATTGCGGAGGTTTCGCGCCT

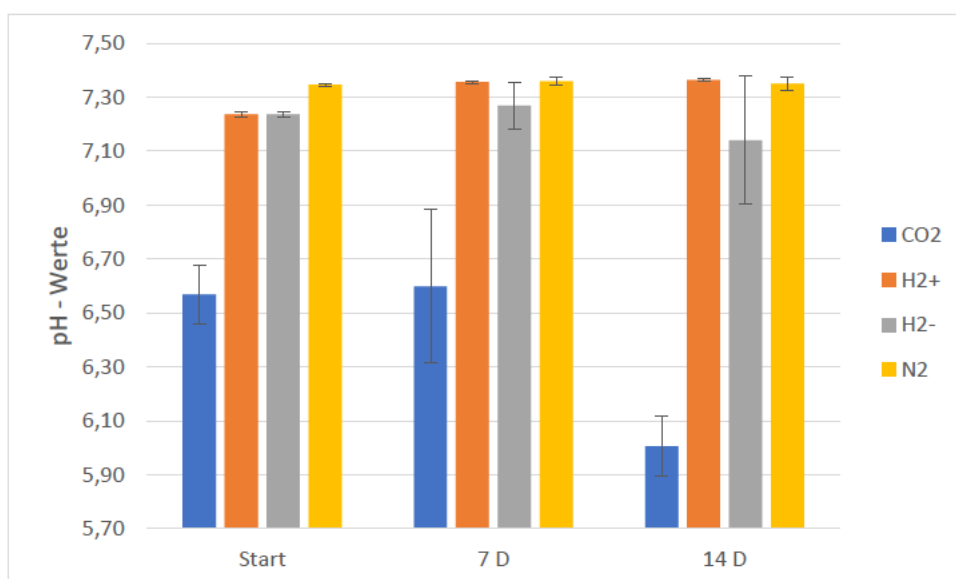
8.3 Anhang 3

Hier aufgeführt sind die pH-Werte der Ansätze der Untersuchung inwiefern eine angelegte Spannung das Wachstum der Kultur EK11NR bzw. EK12NR beeinflusst. Der pH-Wert wurde zu Beginn (Start), nach einer Woche (7 D) und nach zwei Wochen (14 D) untersucht. Es gab vier unterschiedliche Ansätze, einen mit Kohlenstoffdioxid (CO₂), einen mit Stickstoff (N₂) und zwei mit H₂: CO₂ (H₂⁺) und N₂ (H₂⁻). Bei dem einen der beiden H₂: CO₂ wurde keine Spannung angelegt (H₂⁻).

Mittelwerte der pH-Werte von der Kultur EK11NR in der Spannungsuntersuchung

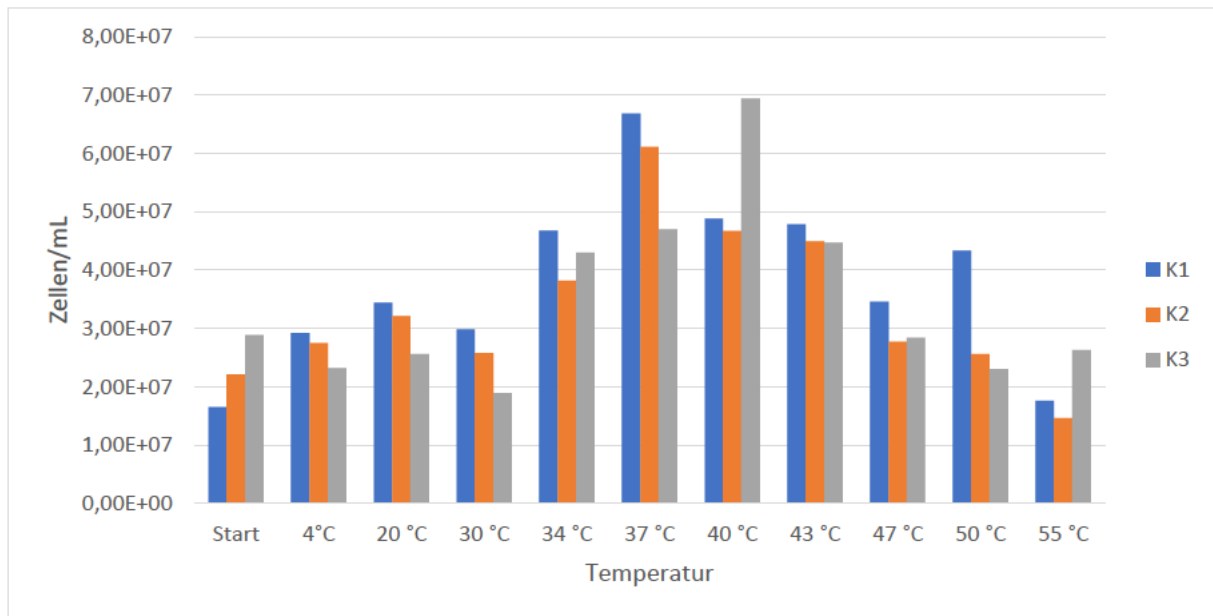


Mittelwerte der pH-Werte von der Kultur EK12NR in der Spannungsuntersuchung

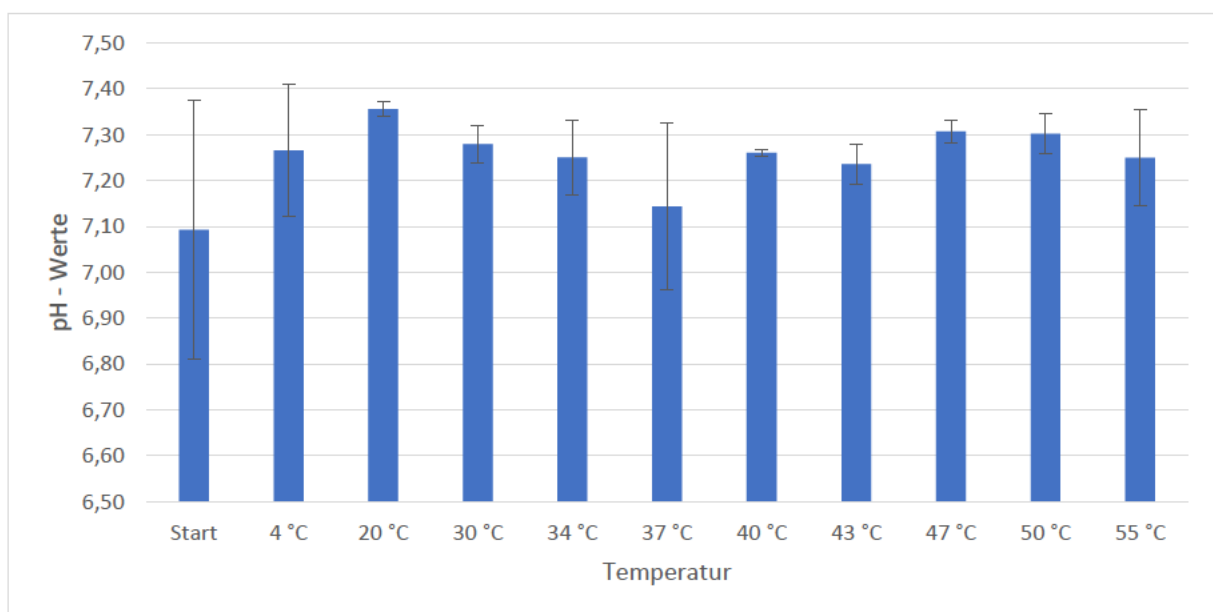


8.4 Anhang 4

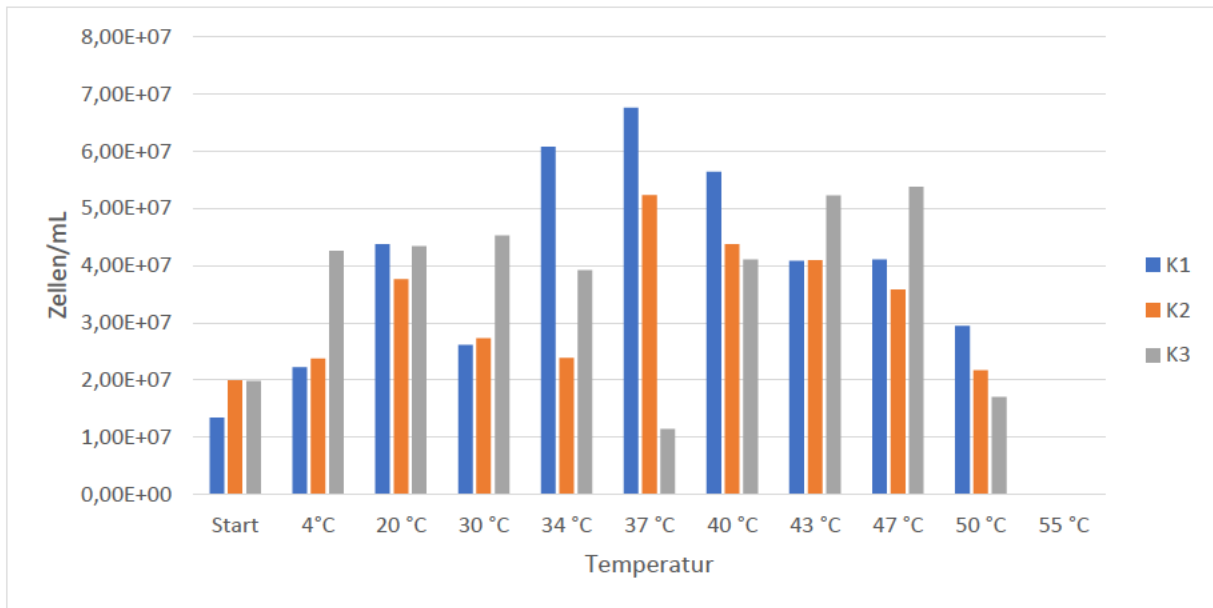
Temperaturkurve von EK11NR



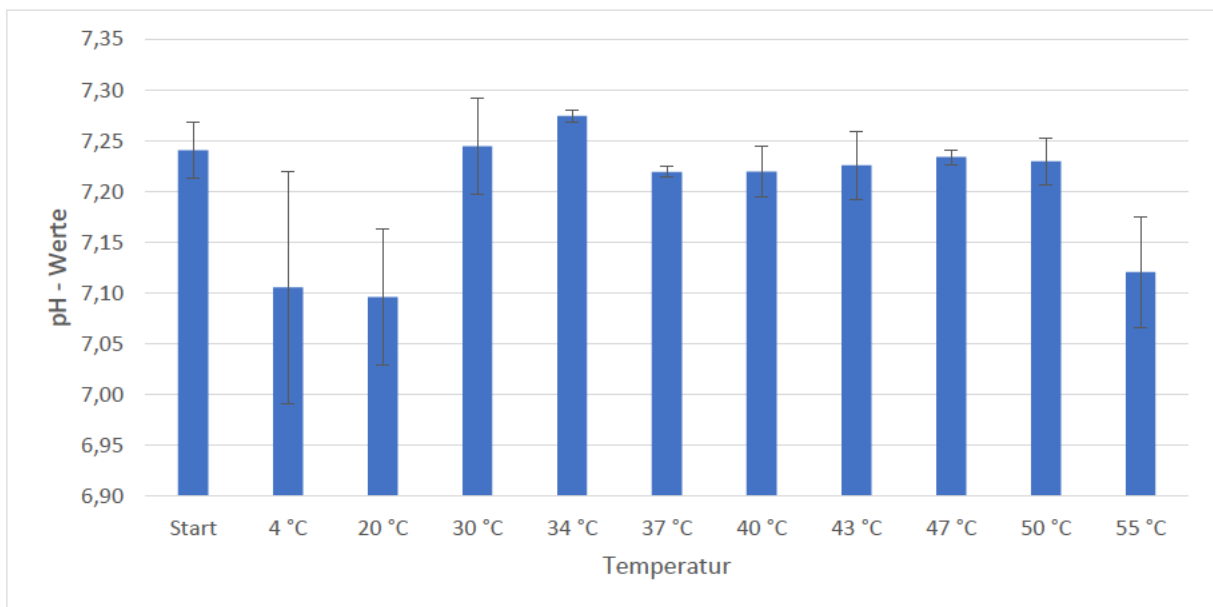
pH-Werte der Kulturen der Temperaturkurve von EK11NR



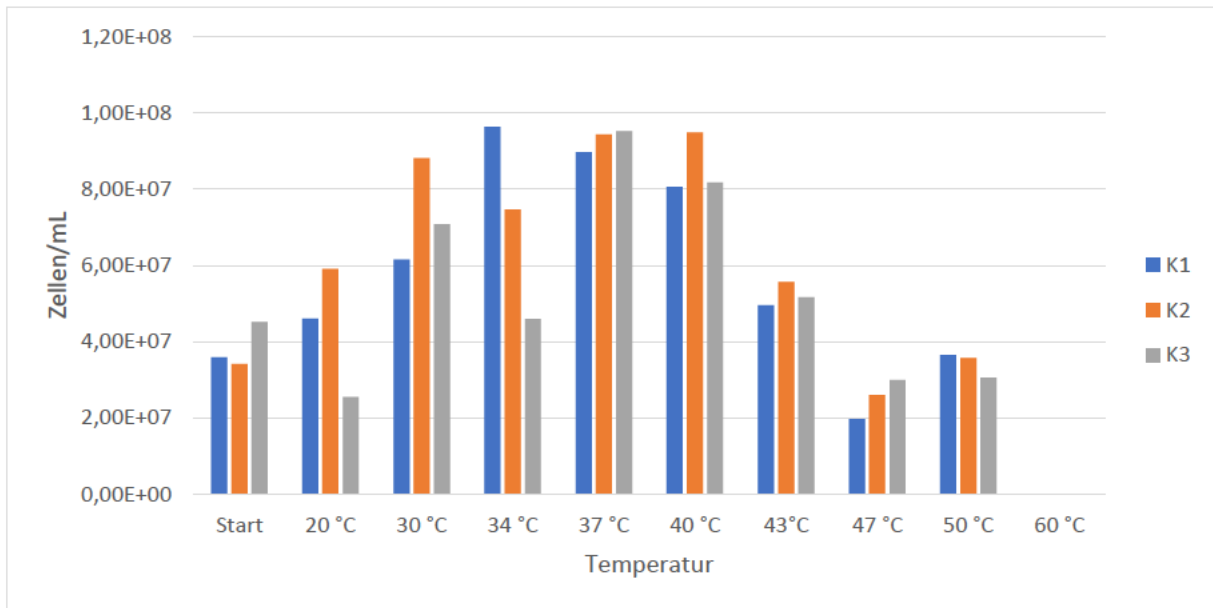
Temperaturkurve von EK12NR



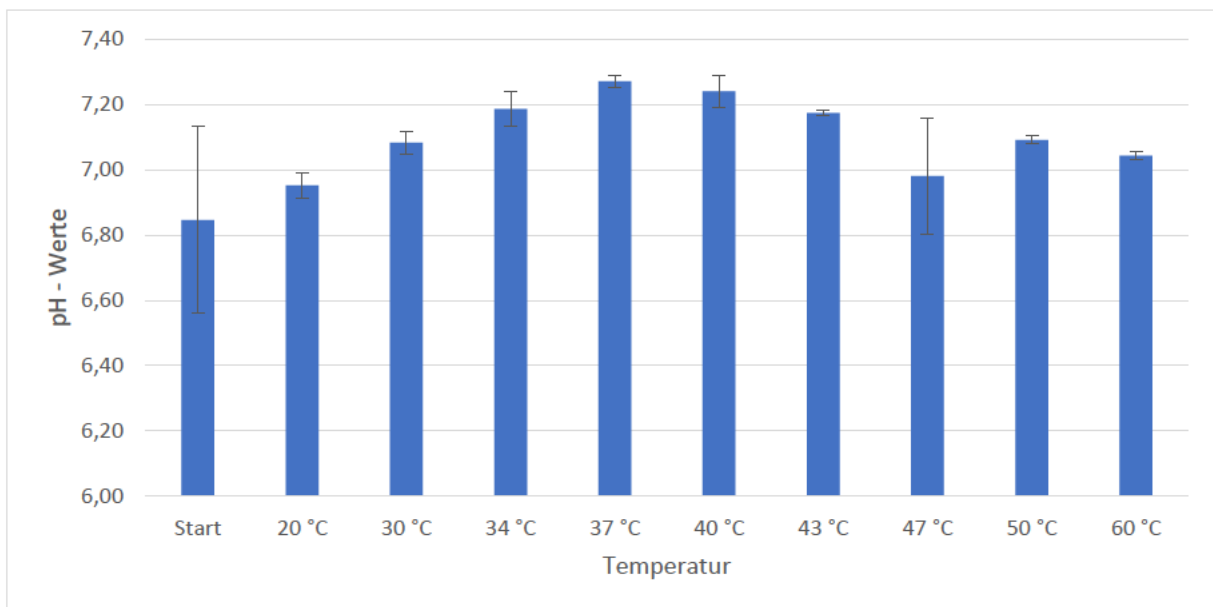
pH-Werte der Kulturen der Temperaturkurve von EK12NR



Temperaturkurve von *M. congolense*

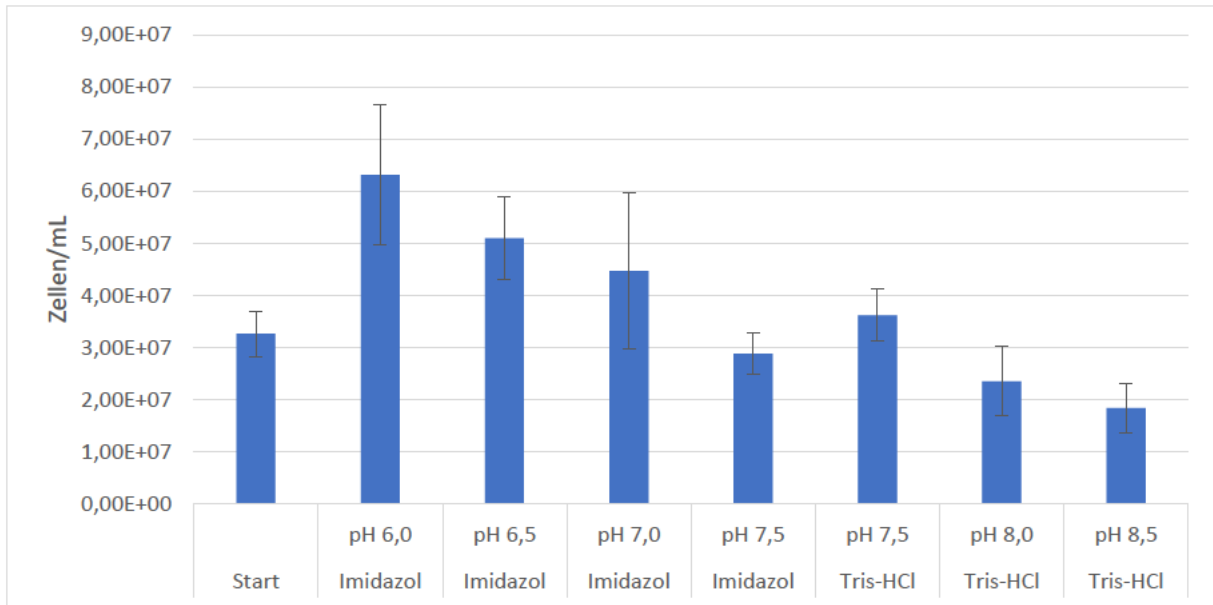


pH-Werte der Kulturen der Temperaturkurve von *M. congolense*

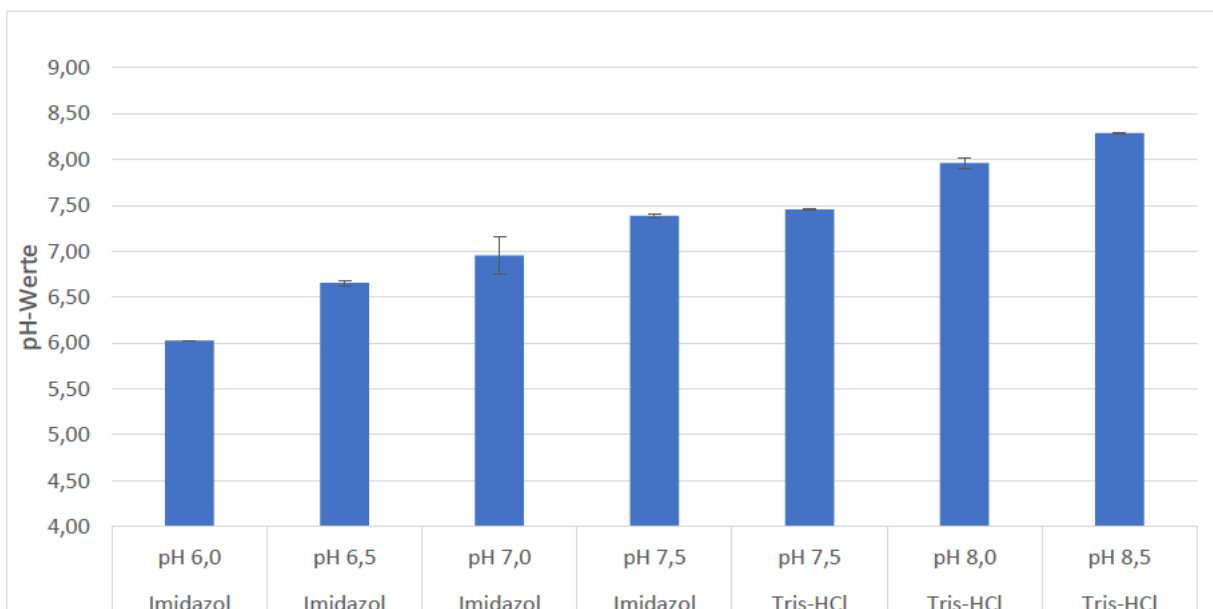


8.5 Anhang 5

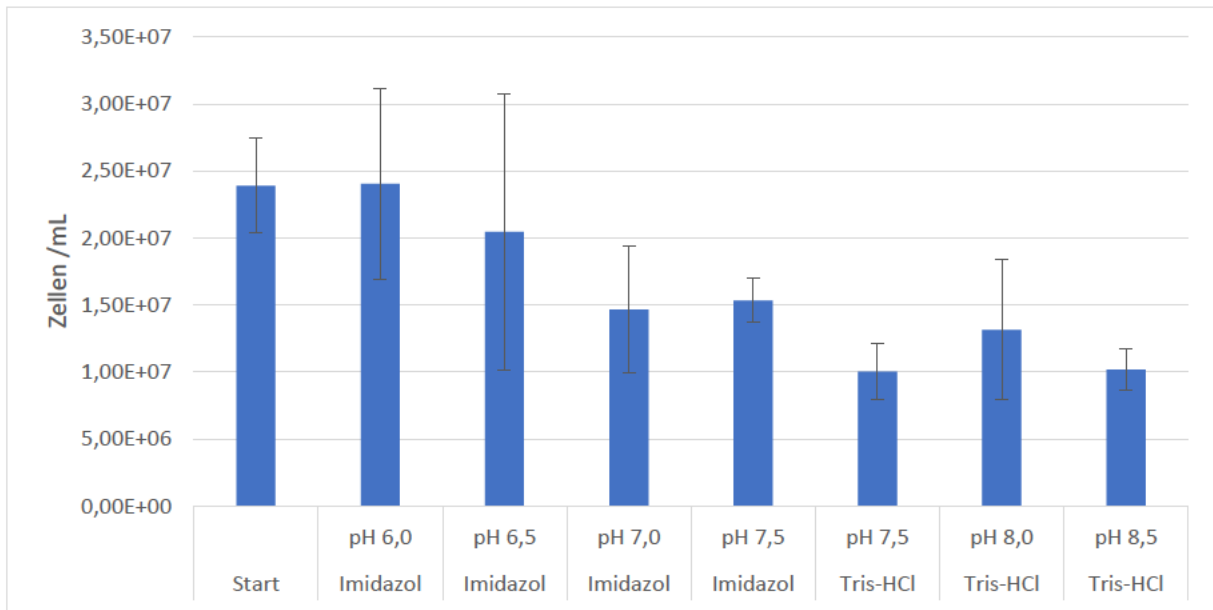
pH-Kurve von EK11NR mit 100 mM Pufferkonzentration



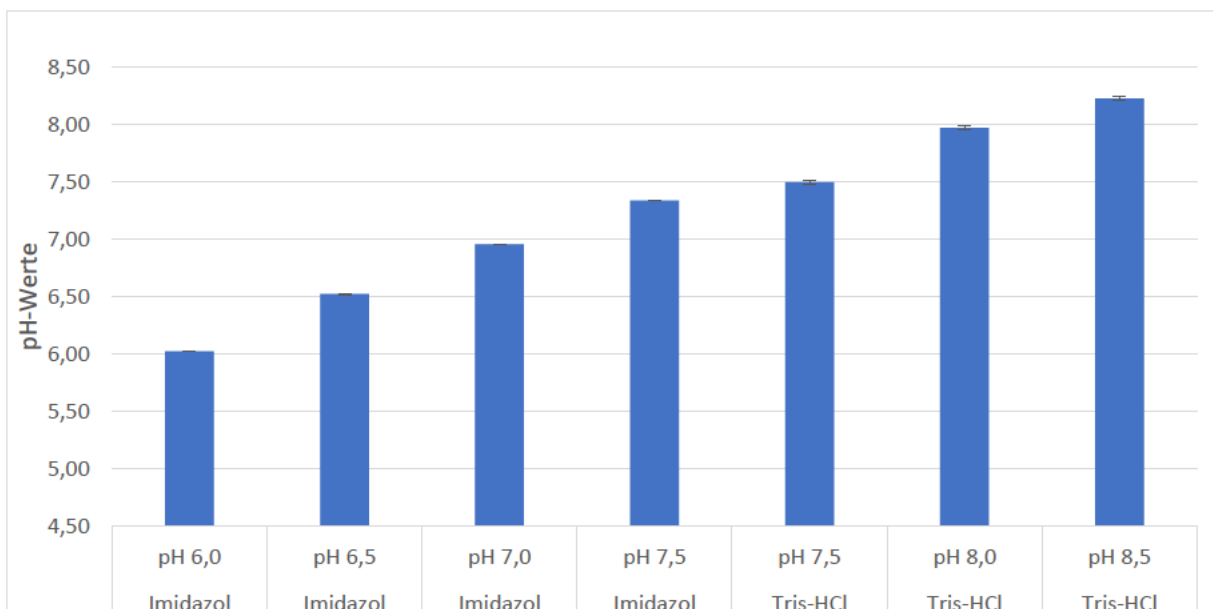
Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von EK11NR mit 100 mM Pufferkonzentration



pH-Kurve von *M. congolense* mit 100 mM Pufferkonzentration

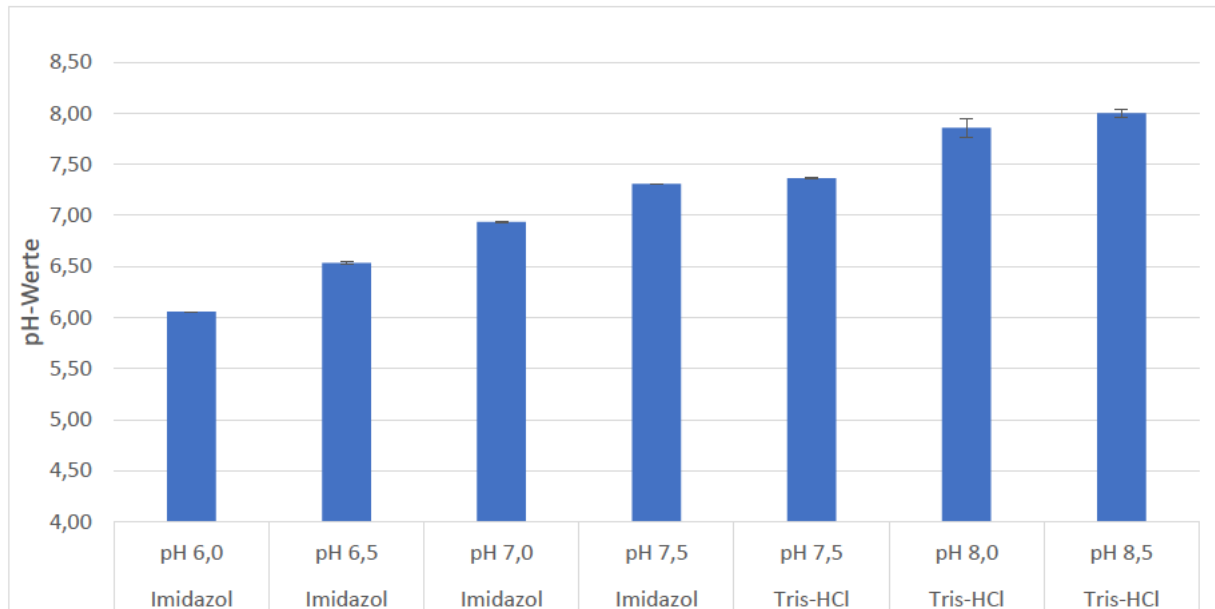


Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von *M. congolense* mit 100 mM Pufferkonzentration

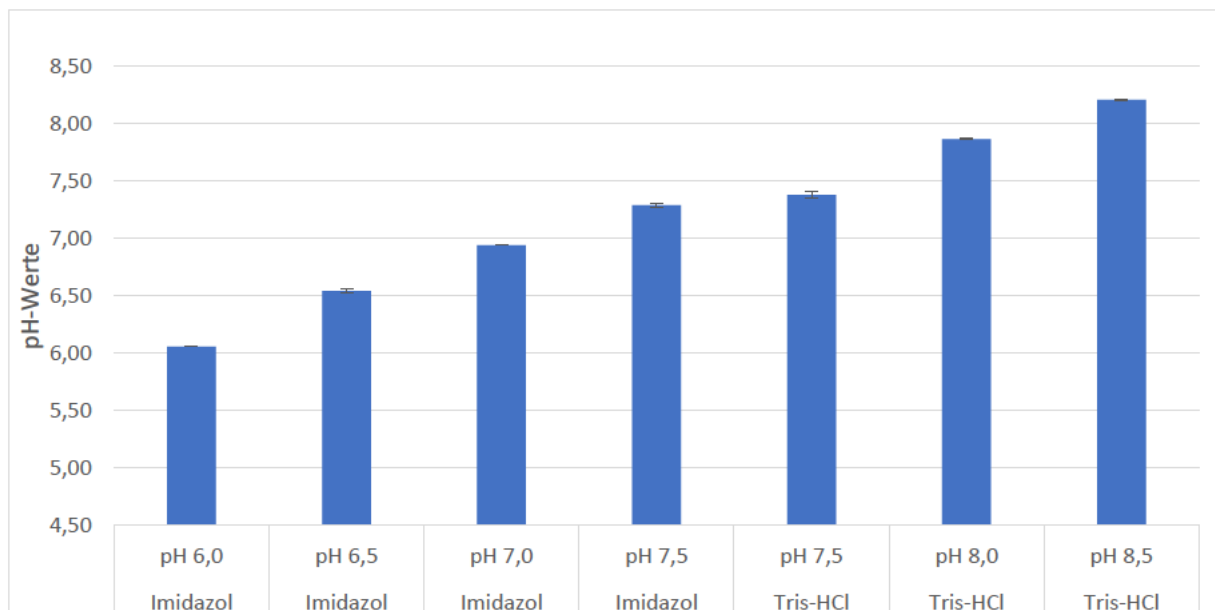


8.6 Anhang 6

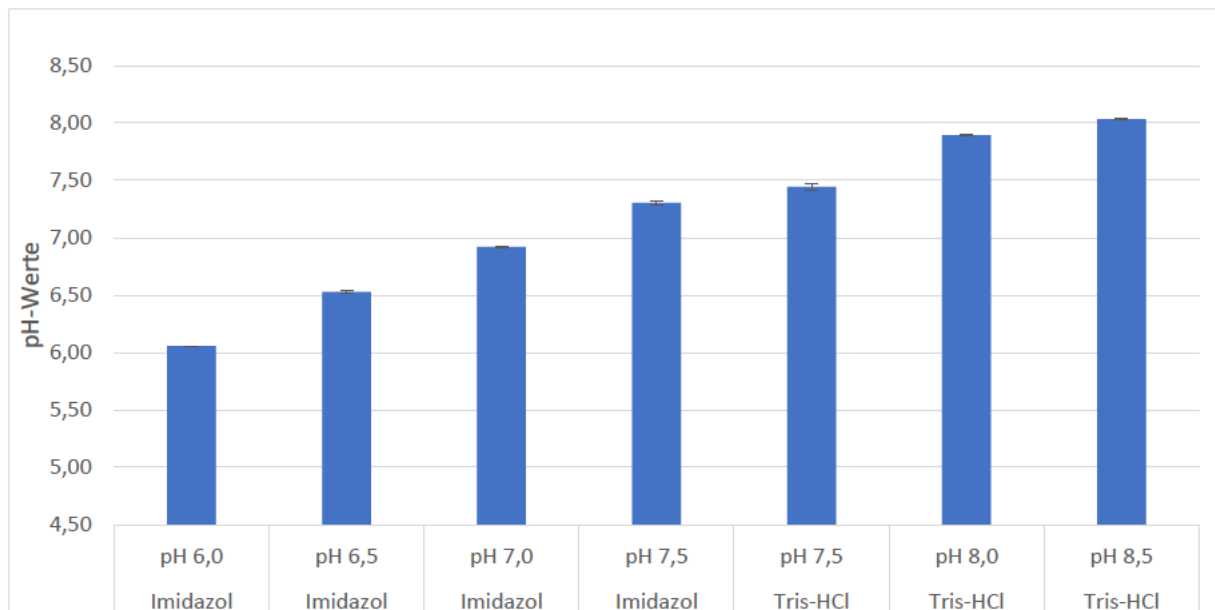
Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von EK11NR mit 50 mM Pufferkonzentration



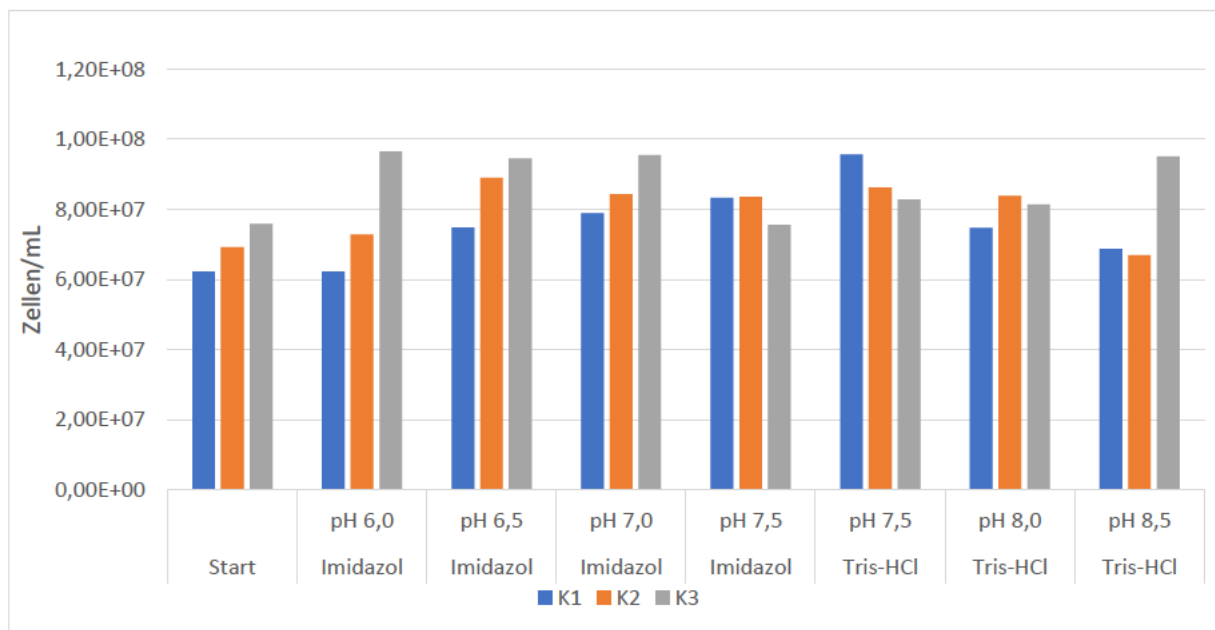
Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von EK12NR mit 50 mM Pufferkonzentration



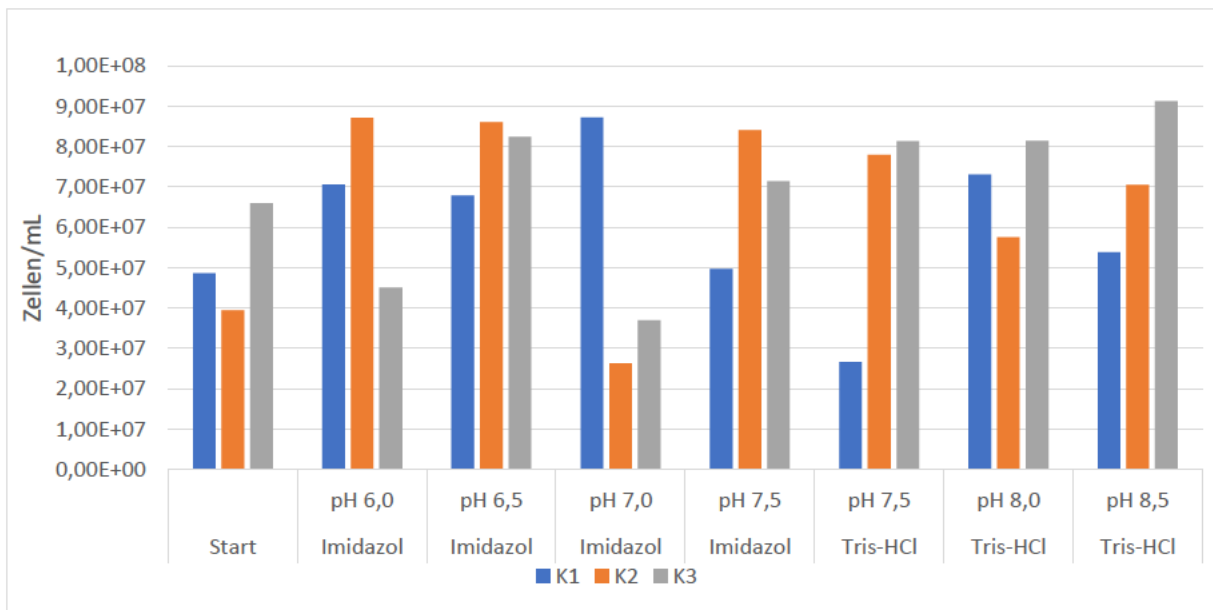
Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von *M. congolense* mit 50 mM Pufferkonzentration



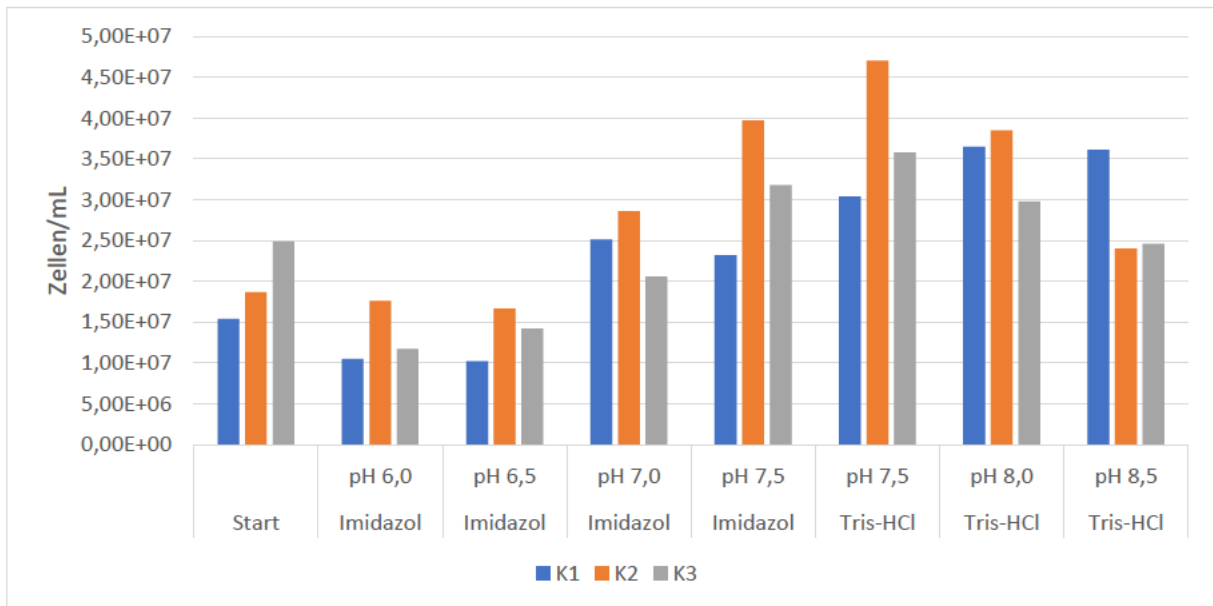
Zellzahlen der Kultur EK11NR bei einer Pufferkonzentration von 50 mM bei unterschiedlichen pH-Werten



Zellzahlen der Kultur EK12NR bei einer Pufferkonzentration von 50 mM bei unterschiedlichen pH-Werten

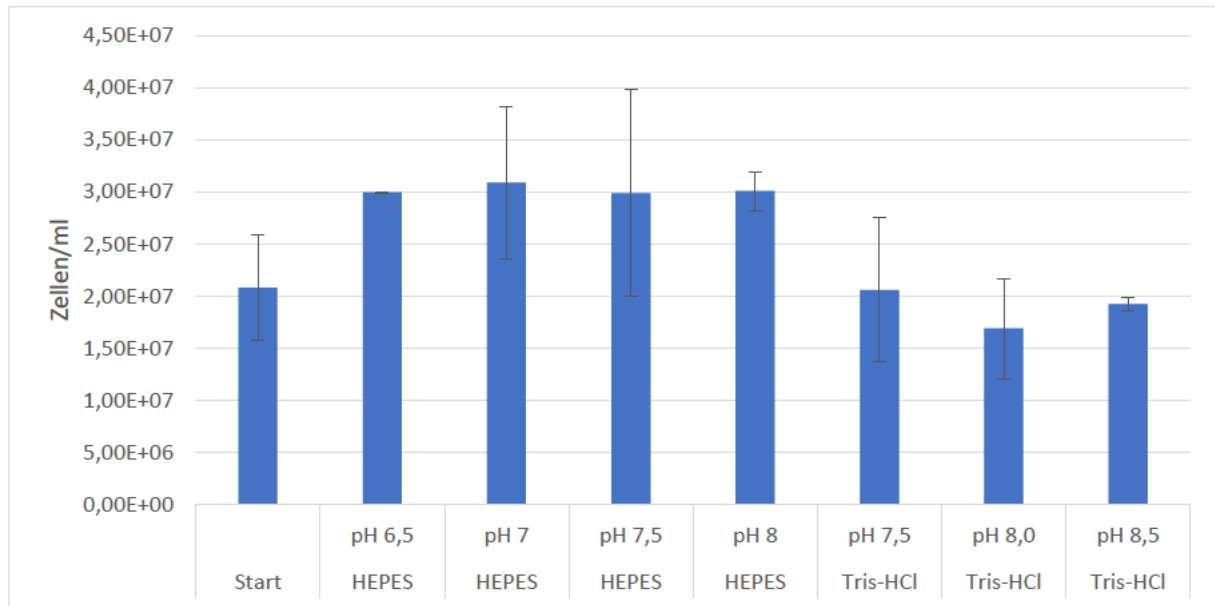


Zellzahlen der Kultur *M. congolense* bei einer Pufferkonzentration von 50 mM bei unterschiedlichen pH-Werten

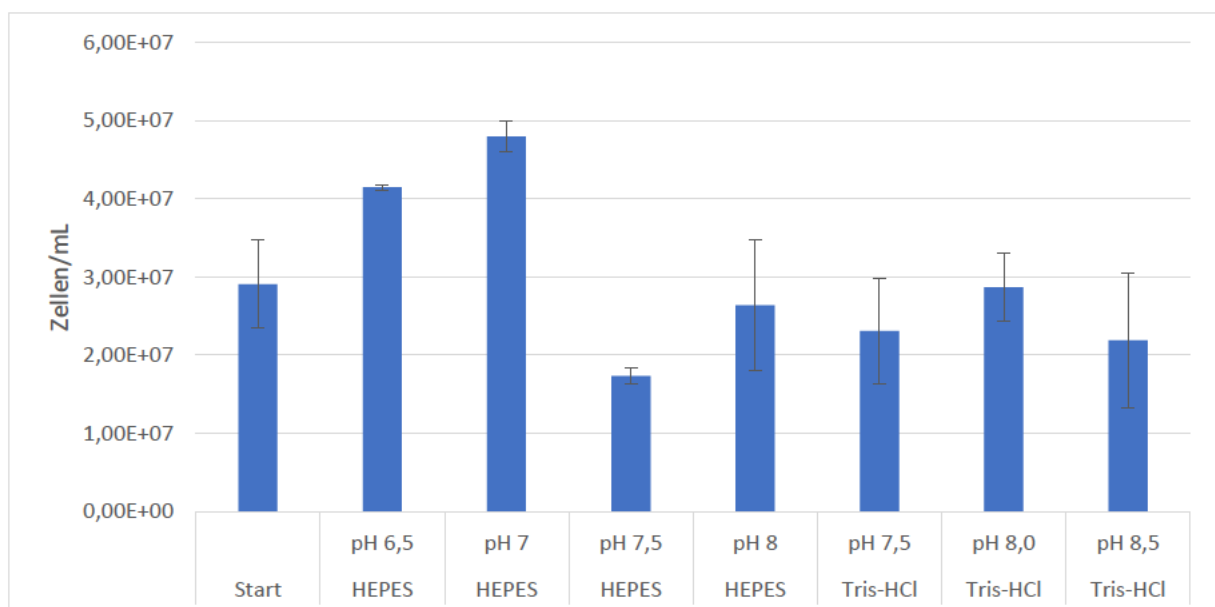


8.7 Anhang 7

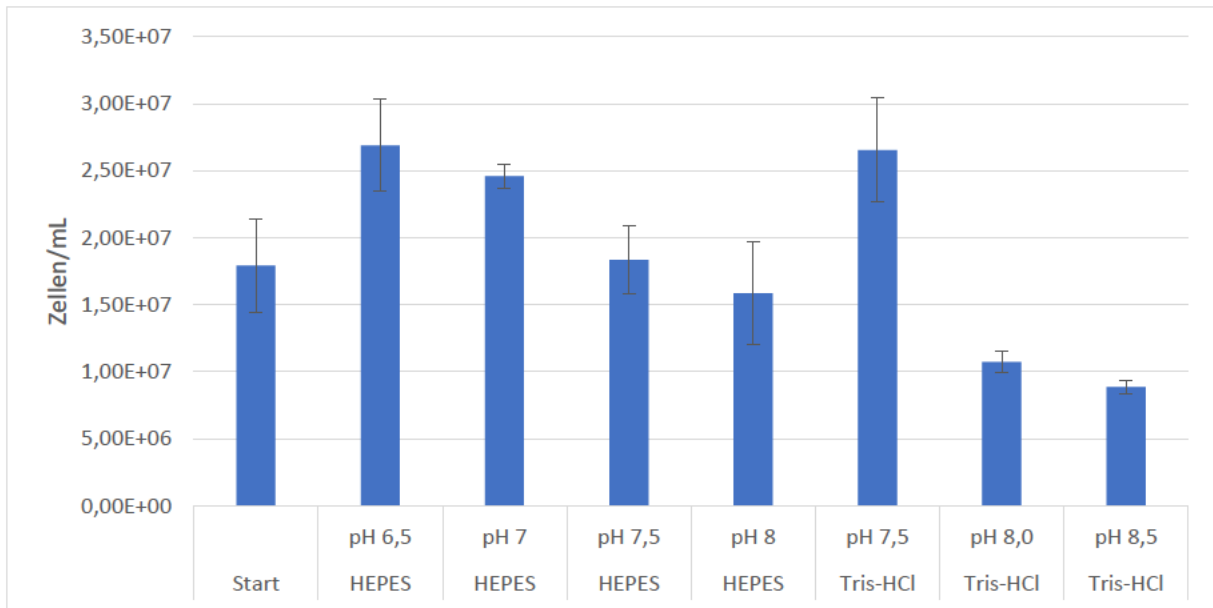
Zellzahlen der Kultur EK11NR bei einer Pufferkonzentration von 50 mM (HEPES) bei unterschiedlichen pH-Werten



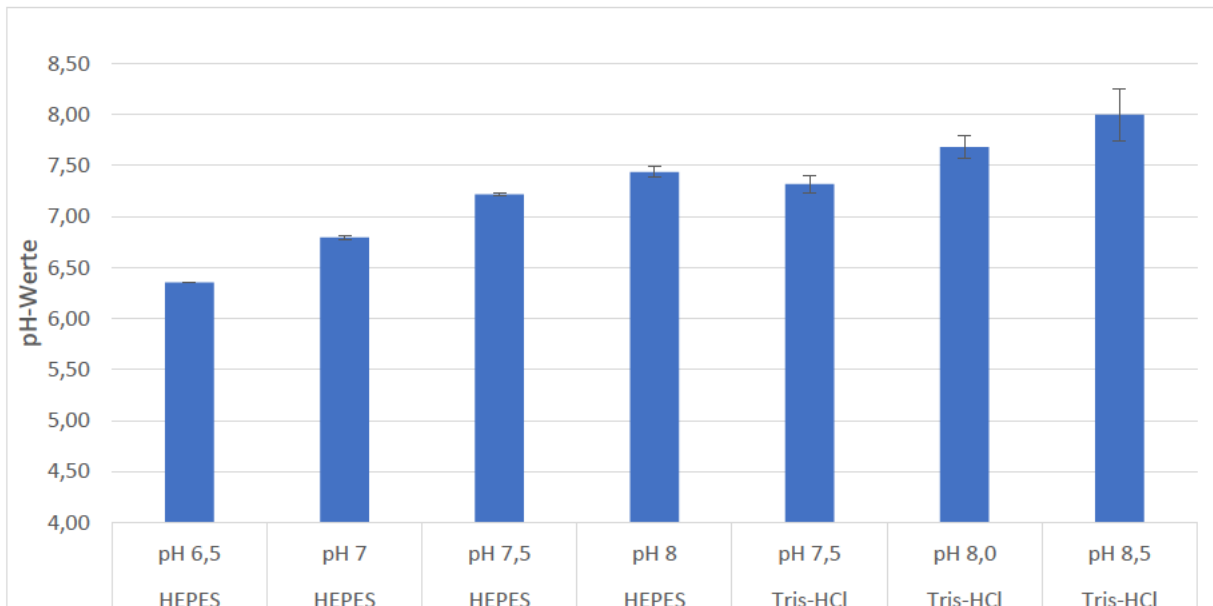
Zellzahlen der Kultur EK12NR bei einer Pufferkonzentration von 50 mM (HEPES) bei unterschiedlichen pH-Werten



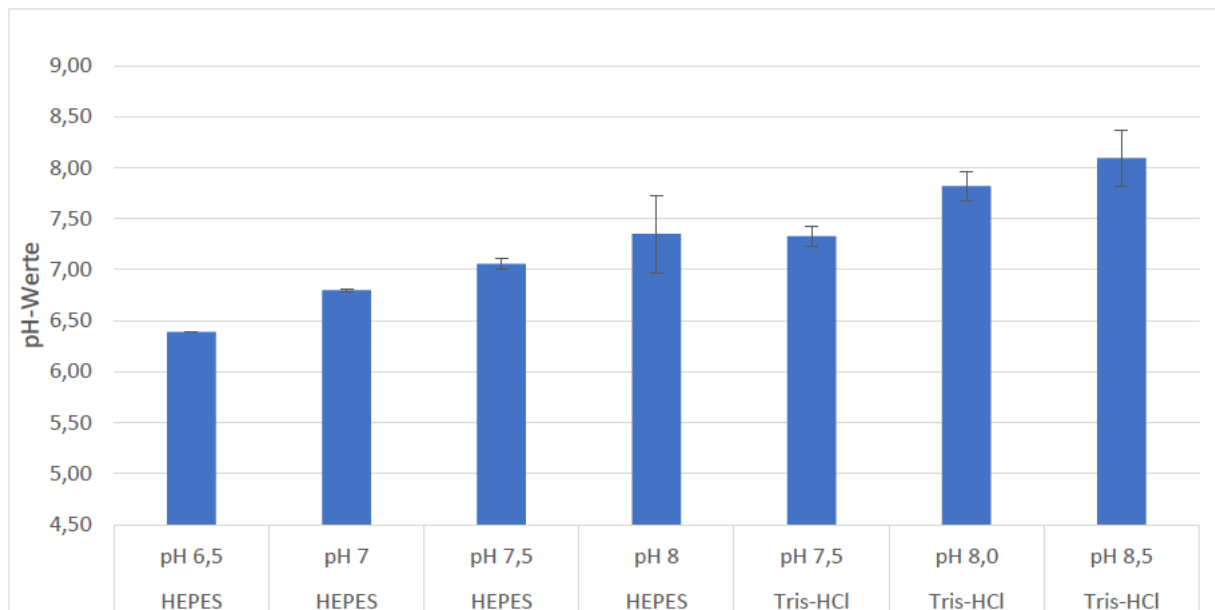
Zellzahlen der Kultur *M. congolense* bei einer Pufferkonzentration von 50 mM (HEPES) bei unterschiedlichen pH-Werten



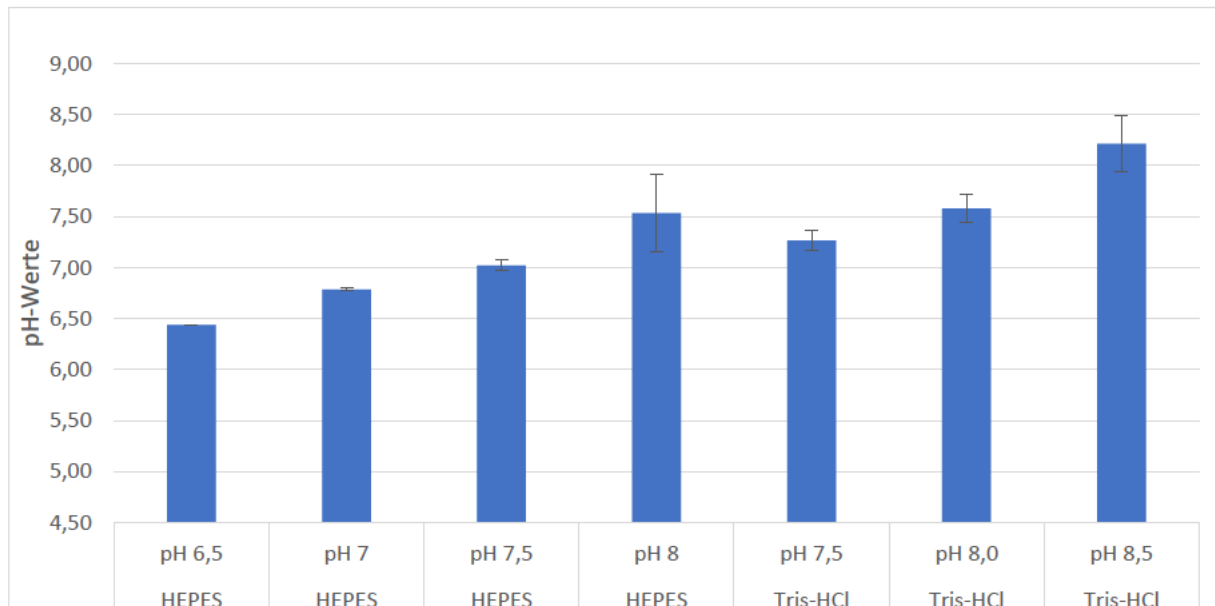
Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von EK11NR mit 50 mM (HEPES) Pufferkonzentration



Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von EK12NR mit 50 mM (HEPES) Pufferkonzentration



Mittelwert der pH-Werte der Kulturen der pH-Kurve von *M. congolense* mit 50 mM (HEPES) Pufferkonzentration



Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtliche oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum:

Jonas Niklas Oelbracht